

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 528**

51 Int. Cl.:

G01N 15/06 (2006.01)

B01D 39/12 (2006.01)

B01D 39/16 (2006.01)

G06K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.10.2008 PCT/EP2008/008541**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.04.2010 WO10040371**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2008 E 08874964 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2344860**

54 Título: **Método para analizar automáticamente microorganismos en una muestra**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.07.2019

73 Titular/es:
BIOTRACK HOLDING B.V. (100.0%)
Smidsstraat 2
8601 WB Sneek, NL

72 Inventor/es:
JANSEN, GIJSBERT, JOHAN

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 719 528 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para analizar automáticamente microorganismos en una muestra

La presente invención se refiere a un método para analizar automáticamente microorganismos en una muestra acuosa.

5 Se conoce una amplia variedad de métodos para detectar la presencia y/o recontar el número de microorganismos en muestras líquidas. La mayor parte de los ensayos microbiológicos se usan para aplicaciones clínicas e implican una etapa de incubación previa de los microorganismos a efectos de aumentar el número de microorganismos por encima del límite de detección del ensayo. Esto resulta especialmente importante en ensayos microbiológicos clínicos en los que se ensaya con muestras de pequeño volumen que comprenden niveles reducidos de
10 microorganismos, tales como muestras de fluidos corporales, por ejemplo, sangre, fluido cerebroespinal, esputo, orina, etc. El principal inconveniente de dichos ensayos consiste en que, debido a la etapa de incubación previa, estos ensayos requieren un tiempo considerable para llevarlos a cabo, normalmente al menos de 24 a 48 horas y, generalmente, son trabajosos.

15 Además, detectar y recontar el número de microorganismos también puede ser importante en entornos no clínicos, tales como, por ejemplo, en el control de la calidad del agua de bebida, y en la industria naviera, donde las descargas de agua de lastre contaminada pueden poner en riesgo ecosistemas naturales en todo el mundo, y el conocimiento del nivel y los tipos de microorganismos presentes en dicha agua de lastre puede resultar muy útil.

20 Los métodos convencionales de control de calidad de agua no resultan adecuados para la industria naviera, ya que el análisis debe llevarse a cabo por parte de personal especializado en laboratorios especializados. Además, estos métodos convencionales, en los que es necesario un cultivo previo de la muestra, pueden requerir varios días para su finalización. Por lo tanto, son necesarias técnicas más sencillas y rápidas.

WO 00/49391 describe un método para identificar y analizar tipos raros de células en una población mixta de células.

EP 1760634 describe un método para medir actividad mitótica, de forma específica, para detectar tejido canceroso.

25 US 2006/0024756 se refiere a un método para enumerar partículas microscópicas distribuidas en un plano de dos dimensiones.

El objetivo de la presente invención consiste en dar a conocer un método sencillo y/o fiable para analizar automáticamente microorganismos en una muestra acuosa.

30 Esto se consigue dando a conocer un método según la reivindicación 1. Además, el método comprende usar un dispositivo para analizar automáticamente microorganismos en una muestra acuosa usando citometría de filtro según la reivindicación 11.

35 En la primera etapa del proceso de citometría de filtro, el soporte de filtro se conecta a los medios de aplicación de muestras y un volumen predeterminado de la muestra líquida se aplica en el filtro. El líquido pasará a través del filtro y los microorganismos quedarán retenidos en el filtro, que tiene unos poros con un tamaño adecuado para que los microorganismos no pasen a través de los mismos. El filtrado como medio de obtención de microorganismos presentes en muestras líquidas es una técnica habitual conocida en microbiología. Normalmente el tamaño de los poros de un filtro para la obtención de bacterias oscila de 0,2 a 0,6 micrómetros. Los materiales de filtro adecuados que es posible usar comprenden silicio, policarbonato y/o vidrio.

40 Por ejemplo, para teñir los microorganismos retenidos en el filtro, los módulos de procesamiento comprenden preferiblemente medios de dispensación para aplicar fluidos de procesamiento en la muestra en el soporte de filtro. Después del filtrado de la muestra en los medios de aplicación de muestras, el soporte de filtro puede moverse a los medios de dispensación para teñir los microorganismos retenidos usando marcadores de color adecuados. Es posible conseguir marcar los nucleótidos en el interior de las células de los microorganismos usando un tinte fluorescente (p. ej., verde SYBR, naranja Acridin, yoduro de propidio, DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol). Dichos marcadores de color fluorescentes emiten luz visible (longitud de onda que depende de la naturaleza química exacta del tinte) después de ser irradiados por una fuente de luz ultravioleta, por ejemplo, de un microscopio de fluorescencia. Además, también es posible usar sondas de ADN de cepa única con marcado fluorescente centradas en el ARN ribosómico 16S o 18S de los microorganismos usando la tecnología FISH. El principio de esta tecnología denominada FISH (hibridación fluorescente in situ) es bien conocido. Otros fluidos de procesamiento pueden incluir
45 soluciones de lavado, fluidos de fijación (p. ej., formaldehído), fluidos de permeabilización que contienen enzimas líticas, (p. ej., lisozima, proteinasa K) y/o detergentes (triton X, Tween, etc.) y fluidos de deshidratación (p. ej., etanol).

50 A continuación, después de un breve periodo de incubación, si así se desea, es posible mover el soporte de filtro y unirlo a los medios de visualización. Los medios de visualización en la citometría de filtro incluyen normalmente
55 medios de iluminación para iluminar el filtro con luz ultravioleta para detectar los marcadores establecidos en los

microorganismos. Según otro aspecto de la invención, los medios de iluminación comprenden al menos un diodo emisor de luz (LED) ultravioleta, preferiblemente, un LED de alta capacidad. Usar un LED como fuente de luz asegura un suministro de luz instantáneo generalmente homogéneo al activar la luz. El brillo residual que se produce después de la desactivación de fuentes de luz convencionales usadas en citometría de filtro también se minimiza usando una fuente de luz LED.

En un ejemplo que no forma parte de la presente invención, los medios de visualización comprenden un microscopio para visualizar el filtro, estando dispuesto el microscopio para visualizar sustancialmente la totalidad de la superficie del filtro y siendo preferiblemente la magnificación del microscopio más pequeña que 500x, preferiblemente más pequeña que 100x. La visualización de sustancialmente la totalidad de la superficie del filtro hace que el uso de técnicas de escaneo XY resulte redundante, lo que aumenta la fiabilidad del dispositivo, ya que es conocido que las mesas de escaneo XY son sensibles a vibraciones.

El uso de una fuente de luz de alta capacidad, tal como la luz LED ultravioleta mencionada anteriormente, para iluminar la superficie del filtro asegura que una cantidad suficiente de luz es reflejada para realizar una detección usando esta magnificación relativamente pequeña.

Se entenderá que el uso de una fuente de luz LED de alta capacidad en combinación con una magnificación relativamente pequeña, por ejemplo, 100x, permite obtener un sistema de visualización fiable y sencillo sin los inconvenientes de los sistemas de iluminación convencionales, tales como los diafragmas de movimiento mecánico para interrumpir el haz de luz y las técnicas de escaneo XY sensibles al entorno. Debe observarse además que los medios de visualización también pueden usarse en otros dispositivos de análisis, por ejemplo, en dispositivos no autónomos.

Para la obtención de imágenes, el dispositivo está dotado preferiblemente de un dispositivo de obtención de imágenes digital y, más preferiblemente, el microscopio está dotado de un dispositivo de obtención integral. Normalmente, un dispositivo de obtención de imágenes de este tipo comprende un dispositivo CCD.

En otro ejemplo, que no forma parte de la invención, los medios de desplazamiento están dispuestos para mover una pluralidad de soportes de filtro entre los módulos de procesamiento. Esto permite análisis autónomos de diferentes fluidos de muestra o análisis del mismo fluido de muestra en un periodo de tiempo más largo, ya que se usa una pluralidad de filtros, siendo posible mover cada uno de los filtros al módulo de procesamiento respectivo. Y, preferiblemente, los módulos de procesamiento y los medios de desplazamiento están dispuestos para una conexión de una pluralidad de soportes de filtro a módulos de procesamiento respectivos simultáneamente. Esto permite obtener un proceso más eficaz en el tiempo. Por ejemplo, cuando se suministra un fluido de muestra a un primer filtro contenido en su soporte de filtro mediante los medios de aplicación de muestras y el mismo se mueve a un módulo siguiente, por ejemplo, a los medios de dispensación para marcar los microorganismos, los medios de aplicación de muestras pueden suministrar la muestra de fluido a un segundo filtro simultáneamente con respecto a la dispensación de tintes mediante los medios de dispensación al primer filtro.

En otro ejemplo, que no forma parte de la presente invención, los medios de desplazamiento comprenden un elemento en forma de disco dispuesto para soportar al menos un soporte de filtro, y el elemento en forma de disco está dispuesto para girar a efectos de mover el soporte de filtro entre los módulos de procesamiento y, preferiblemente, el elemento en forma de disco está dispuesto para soportar una pluralidad de soportes de filtro. Mediante el giro de un elemento en forma de disco para soportar los soportes de filtro se obtienen unos medios de desplazamiento fiables. Resulta ventajoso disponer el elemento en forma de disco para soportar cada uno de los soportes de filtro a distancias sustancialmente iguales con respecto al eje de giro del elemento de giro, es decir, en una ubicación radial sustancialmente igual con respecto al eje de giro del disco. E incluso más preferiblemente, los módulos de procesamiento se extienden en un segmento sustancialmente circular para una conexión amovible al soporte de filtro en movimiento. Mediante el uso de este conjunto, los diferentes módulos se extienden de forma muy próxima a los soportes de filtro en el elemento en forma de disco, permitiendo una conexión adecuada entre los módulos respectivos y los soportes de filtro. El giro del disco resultará en el movimiento de cada uno de los soportes de filtro soportados en el disco para su movimiento a la siguiente ubicación en el dispositivo, preferiblemente a un siguiente módulo de procesamiento.

En otro ejemplo, que no forma parte de la presente invención, el soporte de filtro es móvil entre un primer estado, en donde el filtro está sustancialmente relajado, y un segundo estado, en donde el filtro está tensado. Preferiblemente, el soporte de filtro se mueve del primer estado al segundo estado mediante una conexión o acoplamiento amovible a un módulo de procesamiento. El tensado o estiramiento hasta tensar el filtro mejora el procesamiento en los módulos de procesamiento, por ejemplo, al aplicar tintes o al visualizar el filtro.

En otro ejemplo, que no forma parte de la presente invención, el soporte de filtro comprende dos elementos de unión en forma de anillo, en donde el filtro está dispuesto entre los elementos en forma de anillo. De este modo, es posible disponer fácilmente un filtro en un elemento en forma de anillo y el soporte de filtro queda listo para su uso después de la conexión del segundo elemento en forma de anillo. Preferiblemente, los elementos en forma de anillo están dispuestos para una conexión de encaje a presión.

- Preferiblemente, los elementos en forma de anillo comprenden unas nervaduras de unión para la unión del filtro entre las mismas, extendiéndose las nervaduras en segmentos circulares en los elementos en forma de anillo y moviéndose las nervaduras de unión axialmente hacia abajo al moverse del primer al segundo estado, tensando el filtro. De este modo, el filtro dispuesto entre los elementos en forma de anillo se une a las nervaduras de unión, de modo que la nervadura de un único elemento en forma de anillo se une al filtro en al menos dos ubicaciones opuestas axialmente, permitiendo el tensado de dicho filtro. Más preferiblemente, las nervaduras son circulares. Preferiblemente, las nervaduras de los diferentes elementos en forma de anillo se unen al filtro en lados opuestos de dicho filtro, reteniendo el filtro entre las nervaduras de unión. Al moverse del primer al segundo estado, las nervaduras se mueven axialmente hacia fuera, tensando el filtro.
- Preferiblemente, los elementos en forma de anillo se fabrican a partir de un material elástico que permite la flexión de los elementos en forma de anillo. Resulta ventajoso que, cuando los elementos en forma de anillo tienen una forma curvada en sección en el primer estado y, al aplicar fuerza en la dirección axial de los elementos en forma de anillo, dichos elementos se deformen hasta una forma en sección menos curvada, moviendo axialmente las nervaduras. Preferiblemente, el elemento en forma de anillo que forma el soporte de filtro se deforma al conectarse o acoplarse de forma amovible a los módulos de procesamiento.
- En otro ejemplo, que no forma parte de la presente invención, el filtro se fabrica a partir de policarbonato. Y, preferiblemente, el filtro tiene un tamaño de poros de aproximadamente $0,4 \mu\text{m}$. Dichos filtros presentan buenos resultados al ser usados, por ejemplo, en dispositivos de filtración de vacío, y su disponibilidad es amplia. Para poder usar un filtro de policarbonato en dispositivos que no son de vacío, el filtro está dotado de una malla, preferiblemente en forma de un revestimiento. La malla otorga rigidez al filtro, permitiendo obtener una superficie sustancialmente plana durante su visualización, p. ej., durante el tensado o estiramiento hasta el tensado mencionado anteriormente. La malla soporta el filtro relativamente flexible.
- Preferiblemente, la malla se fabrica a partir de aluminio. El aluminio pesa poco y permite otorgar un buen soporte y rigidez al filtro. Preferiblemente, el espesor de alambre de la malla es entre 5 y $20 \mu\text{m}$, y más preferiblemente aproximadamente $10 \mu\text{m}$. Y, preferiblemente, la distancia entre alambres de la malla es entre 20 y $100 \mu\text{m}$, y más preferiblemente aproximadamente $40 \mu\text{m}$.
- Debe observarse que también es posible usar la unidad de filtro y/o el soporte de filtro descritos anteriormente en otros dispositivos de filtrado, por ejemplo, en dispositivos de filtrado no autónomos.
- La invención se refiere a un método para analizar automáticamente microorganismos en una muestra acuosa usando citometría de filtro según la reivindicación 1.
- Normalmente, la visualización de filtraciones de membrana da como resultado imágenes con una amplia variedad en brillo general, es decir, el fondo de la imagen puede variar entre gris y negro. El brillo de los objetos, es decir, de los microorganismos, en la imagen también varía, por ejemplo, entre los colores blanco y gris. Por lo tanto, puede ser posible que los objetos grises sean visualizados ante un fondo gris solamente con una ligera diferencia en el valor de gris. Designando el umbral que muestra una relación óptima entre objetos seleccionados y no seleccionados, el método es independiente de la diferencia en valores de gris entre los objetos y el fondo, minimizando la posibilidad de que un objeto pase desapercibido.
- La creación de un umbral en la etapa i comprende aplicar un intervalo de umbrales con un valor de gris en aumento, por ejemplo, de 0 (negro) a 1 (blanco).
- Preferiblemente, el umbral inferior está entre $0,1 \mu\text{m}^2$ y $1 \mu\text{m}^2$, más preferiblemente entre $0,35 \mu\text{m}^2$ y $0,75 \mu\text{m}^2$, e incluso más preferiblemente, el umbral inferior es aproximadamente $0,5 \mu\text{m}^2$.
- En una realización preferida, en la etapa ii, un objeto con un tamaño más grande que un umbral superior se considera como un objeto seleccionado. De esta manera, las micro colonias de un único microorganismo se tratan como un microorganismo, en vez de ser excluidas del análisis. Preferiblemente, el umbral superior está entre $2 \mu\text{m}^2$ y $8 \mu\text{m}^2$, más preferiblemente entre $4 \mu\text{m}^2$ y $6 \mu\text{m}^2$. Incluso más preferiblemente, el umbral superior es aproximadamente $5 \mu\text{m}^2$.
- En otra realización preferida, las relaciones entre objetos seleccionados y no seleccionados se normalizan con respecto al número total de objetos en la imagen del filtro.
- En otra realización preferida, visualizar la superficie del filtro comprende visualizar sustancialmente la totalidad de la superficie del filtro, lo que hace que el uso de técnicas de escaneo XY resulte obsoleto. Preferiblemente, la superficie se ilumina con una luz ultravioleta de alta capacidad, más preferiblemente, un LED ultravioleta de alta capacidad, tal como se ha descrito anteriormente.
- En otra realización preferida, las etapas (a)-(d) se repiten si en la etapa (d) se recuenta menos que un número predeterminado de microorganismos, aplicándose en la etapa (a) un volumen de muestra aumentado en el filtro. Preferiblemente, el volumen de muestra aumenta sustancialmente diez veces. Y, incluso más preferiblemente, la muestra se determina como negativa si las etapas (a)-(d) se repiten al menos dos veces y en la etapa (d) se

recuenta un número inferior al número predeterminado de microorganismos. Esto permite obtener una cuantificación fiable de los microorganismos en una muestra acuosa usando un único filtro, incluso cuando la concentración de los microorganismos no puede ser estimada a priori.

5 Por ejemplo, cuando se recuentan menos de 10 eventos, es decir, microorganismos, en la etapa (d) del método según la invención, se asume que la concentración de microorganismos en la muestra es demasiado reducida para obtener una cuantificación fiable usando el volumen de muestra inicial, por ejemplo, 1 ml. A continuación, se aplica un volumen de muestra aumentado, por ejemplo, 9 ml, en el mismo filtro y el proceso se repite. Por ejemplo, cuando se recuentan más de 10 eventos en la muestra en el segundo proceso de cuantificación, es posible analizar la muestra de forma más detallada. Si sigue recontándose un número inferior al número predeterminado de
10 microorganismos, es posible aumentar el volumen de muestra a 90 ml. Cuando sigue detectándose un número inferior al número predeterminado de microorganismos, se asume que la muestra es negativa.

En otra realización preferida, al menos dos de las etapas (a)-(c) se ejecutan en ubicaciones separadas en un dispositivo para citometría de filtro automática, moviéndose el filtro automáticamente entre dichas ubicaciones y siendo posible ejecutar dichas etapas simultáneamente en al menos dos filtros separados. Esto da como resultado un proceso eficaz, ya que es posible procesar múltiples filtros al mismo tiempo.
15

Puede observarse que este método para cuantificar microorganismos en una muestra de fluido resulta especialmente eficaz al usarse en el dispositivo según la invención, ya que la capacidad de mover el filtro entre los diversos módulos de procesamiento permite usar el mismo filtro para la totalidad del proceso de cuantificación. También debe observarse que el método de cuantificación descrito anteriormente también es aplicable con otras técnicas de creación de umbrales como la descrita anteriormente.
20

La presente invención se muestra de forma más detallada en las siguientes figuras:

- la figura 1 muestra esquemáticamente un dispositivo según un ejemplo que no forma parte de la presente invención en perspectiva;
- la figura 2 es una vista ampliada del dispositivo de la figura 1;
- 25 - la figura 3 es una vista lateral del dispositivo de las figuras 1 y 2;
- la figura 4 muestra esquemáticamente el disco de filtro a título de ejemplo que no forma parte de la presente invención;
- la figura 5 muestra esquemáticamente el soporte de filtro a título de ejemplo que no forma parte de la presente invención; y
- 30 - las figuras 6A, 6B y 7A, 7B muestran esquemáticamente ejemplos que no forman parte de la invención del mecanismo para tensar el filtro.

En las figuras 1, 2 y 3 se muestra un dispositivo para analizar automáticamente microorganismos en una muestra acuosa en forma de un citómetro 1 de filtro, a título de ejemplo que no forma parte de la presente invención. El citómetro 1 está dotado de una carcasa 10 para alojar los diversos componentes del dispositivo. El dispositivo 1 está
35 dispuesto para analizar autónomamente fluidos de muestra sin interacción manual. Por lo tanto, el dispositivo está dotado de módulos de procesamiento en forma de medios 7 de aplicación de muestras, medios 9 de dispensación y medios 8 de visualización, y el dispositivo también está dotado de medios 2 de desplazamiento para mover los soportes 5 de filtro entre los diversos medios de procesamiento, tal como se muestra en la figura 5. El citómetro 1 comprende medios de control para controlar los medios 2 de desplazamiento y los módulos de procesamiento. El
40 dispositivo 1 también está dotado de medios de acceso remoto en forma de comunicación inalámbrica.

Los medios 7 de aplicación de muestras se muestran en forma de alimentadores 71 y 72 de muestras que pueden contener diferentes fluidos de muestra a analizar. Los alimentadores 71, 72 de muestras están dispuestos para introducir un volumen predeterminado de fluido de muestra en los soportes 5 de filtro, tal como se muestra en la figura 5, cuando dichos soportes de muestra se extienden debajo de dichos alimentadores, tal como se explicará de forma más detallada más adelante. Los medios 9 de dispensación se muestran en forma de dispensadores 91, 92 que contienen fluidos de marcado y lavado para suministrar a los soportes 5 de filtro. Los medios 7 de visualización comprenden un microscopio 82 con una magnificación 100x. El microscopio 82 está dispuesto para proyectar la totalidad de la superficie de un filtro contenido en el soporte 5 de filtro en un dispositivo CCD 81 a efectos de obtener una imagen digital de sustancialmente la totalidad de la superficie del filtro.
45

Los medios 2 de desplazamiento se muestran en la figura 4 en forma de disco 4 de filtro para soportar veinte soportes 5 de filtro. El disco 4 de filtro puede disponerse en un cajón 23, que puede observarse en la figura 3. El cajón 23 puede salir de la carcasa 10 usando unas guías deslizantes 22 para facilitar la disposición del disco 4. Los medios 2 de desplazamiento comprenden además un motor 21 para accionar un eje 24 que hace girar el disco 4 alrededor del eje I, tal como se muestra en la figura 4. Mediante el giro del disco alrededor del eje I, cada uno de los
50 soportes 5 de filtro, por ejemplo, 5a y 5b, puede disponerse debajo de cada uno de los medios de procesamiento
55

para su interacción con los mismos.

5 El soporte 5 de filtro se muestra en una vista en explosión en la figura 5. El soporte 5 de filtro comprende dos elementos 51, 52 en forma de anillo unidos entre sí mediante una conexión. El elemento superior 51 está dotado de un anillo saliente 56 para su unión por encaje a presión al elemento inferior 52. Los elementos 51, 52 se fabrican a partir de un material elástico, que facilita la conexión por encaje a presión. La conexión por encaje a presión limita cualquier movimiento relativo no deseado de los elementos en la dirección axial. Los elementos 51, 52 de anillo también están dotados de salientes 54 y aberturas 55 en cooperación que limitan cualquier giro relativo entre los elementos 51, 52 en forma de anillo durante su conexión.

10 El filtro 6 está dispuesto entre los elementos 51, 52 en forma de anillo. El filtro 6 se fabrica a partir de policarbonato y tiene un tamaño de poros de 0,4 μm . Para aumentar la rigidez del filtro 6, el filtro 6 está dotado de un revestimiento de malla 61 de aluminio. La malla 61 de aluminio tiene un espesor de alambre de 10 μm y los alambres están separados una distancia de 40 μm . Para una disposición adecuada de la unidad 6 de filtro en el soporte 5 se usa un retenedor 53. El soporte 5 de filtro está dotado de unas aberturas 57 que permiten el suministro de fluido de muestra, fluidos de procesamiento o la visualización del filtro 6.

15 En las figuras 6A y 7A se muestran dos ejemplos que no forman parte de la presente invención del soporte 5 de filtro en sección, en un primer estado en donde el filtro 6 está sustancialmente relajado. Para soportar el filtro 6, el elemento 51 en forma de anillo superior del soporte 5 de filtro está dotado de una nervadura superior 58b y el elemento 52 en forma de anillo inferior comprende una nervadura inferior 58a. Las nervaduras 58a, 58b se extienden en segmentos de círculo, preferiblemente circularmente en los elementos 51, 52 en forma de anillo. Los anillos 58a y 58b están dispuestos para su unión al filtro 6 en sus lados opuestos. Aunque el filtro 6 en las figuras 6A y 7A no está unido a las nervaduras 58a, 58b, en otras realizaciones, es posible que las nervaduras 58a y 58b estén unidas a la superficie 6 del filtro en el primer estado.

25 El soporte 5 de filtro está dispuesto para moverse del primer estado, tal como se muestra en las figuras 6A y 7A, a un segundo estado en donde el filtro 6 está tensado, tal como se muestra en las figuras 6B y 7B. Tensando el filtro 6, es posible usar un filtro 6 flexible relativo hecho de policarbonato. Disponiendo una malla 61 de aluminio en el filtro 6, tal como se muestra en la figura 5, es posible tensar dicho filtro sin dañar el filtro de policarbonato.

30 En los ejemplos de las figuras 6A y 6B, que no forman parte de la presente invención, las nervaduras 58a y 58b tienen unos diámetros diferentes, de modo que las nervaduras 58a y 58b se unen al filtro 6 en diferentes posiciones radiales. Cuando el soporte 5 de filtro queda sujeto a una fuerza II de presión, las nervaduras 58a y 58b se unen al filtro 6, estirando el filtro 6 hasta tensarlo en la dirección indicada como III.

35 En los ejemplos de las figuras 7A y 7B, que no forman parte de la presente invención, los elementos 51, 52 en forma de anillo se fabrican a partir de un material elástico. En el primer estado, tal como se muestra en la figura 7A, los elementos 51, 52 en forma de anillo presentan una forma de sección curvada. Las nervaduras 58a y 58b se extienden una encima de la otra. Presionando los elementos 51 y 52 en una dirección indicada como II, el elemento 51, 52 se deformará y las nervaduras 58a y 58b se moverán en una dirección indicada como III, tensando el filtro 6 unido a dichas nervaduras. En esta realización, las nervaduras 58a y 58b están dispuestas para retener el filtro 6 entre las mismas, permitiendo un movimiento III de tensado cuando el soporte 5 de filtro es comprimido en una dirección II.

40 Por ejemplo, la acción II de presión puede ser el resultado de la acción de encaje a presión de los elementos 51 y 52 en forma de anillo al conectar o acoplar el soporte 5 de filtro a un módulo de procesamiento para su interacción con el mismo.

45 Aunque en el ejemplo mostrado en las figuras 6 y 7 los elementos 51 y 52 en forma de anillo están dotados de las nervaduras 58a, 58b, por ejemplo, también es posible dotar el retenedor 53 de la nervadura inferior 58a. De este modo, una acción de presión del elemento 51 en forma de anillo superior puede resultar en la acción de tensado indicada como III en las figuras 6B y 7B.

REIVINDICACIONES

1. Método para analizar automáticamente microorganismos en una muestra acuosa usando citometría de filtro, que comprende las etapas de:

- a) aplicar un volumen predeterminado de la muestra en un filtro (6);
- b) teñir los microorganismos en el filtro con uno o más marcadores;
- c) visualizar los marcadores establecidos en la superficie del filtro, y;
- d) analizar la imagen del filtro para cuantificar los microorganismos en el filtro,

en donde la etapa de analizar comprende determinar el umbral de valor de gris óptimo para separar los microorganismos del fondo en la imagen del filtro, en donde determinar el umbral de valor de gris óptimo comprende:

- i. crear un umbral de la imagen del filtro usando un intervalo de umbrales de valor de gris;
- ii. determinar las relaciones entre objetos seleccionados, siendo un objeto seleccionado un objeto con un tamaño más grande que un umbral de tamaño inferior predeterminado, y objetos no seleccionados para el intervalo de imágenes con umbral creado de valor de gris; y
- iii. designar un umbral de valor de gris a partir del intervalo de umbrales de valor de gris que resulta en una relación óptima de objetos seleccionados y no seleccionados como el umbral de valor de gris óptimo, en donde la relación óptima es la relación más alta.

2. Método según la reivindicación 1, en donde, en la etapa ii, un objeto con un tamaño más grande que un umbral de tamaño superior se considera como un objeto seleccionado.

3. Método según la reivindicación 1 o 2, en donde las relaciones entre objetos seleccionados y no seleccionados se normalizan con respecto al número total de objetos en la imagen del filtro.

4. Método según la reivindicación 1, 2 o 3, en donde el umbral de tamaño inferior está entre $0,1 \mu\text{m}^2$ y $1 \mu\text{m}^2$, preferiblemente entre $0,35 \mu\text{m}^2$ y $0,75 \mu\text{m}^2$, y en donde el umbral de tamaño inferior es más preferiblemente aproximadamente $0,5 \mu\text{m}^2$.

5. Método según las reivindicaciones 1-4, en donde el umbral de tamaño superior está entre $2 \mu\text{m}^2$ y $8 \mu\text{m}^2$, preferiblemente entre $4 \mu\text{m}^2$ y $6 \mu\text{m}^2$, y en donde el umbral de tamaño superior es más preferiblemente aproximadamente $5 \mu\text{m}^2$.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1-5, en donde visualizar la superficie del filtro comprende visualizar sustancialmente la totalidad de la superficie del filtro.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1-6, en donde las etapas (a)-(d) se repiten si en la etapa (d) se recuenta menos que un número predeterminado de microorganismos, en donde en la etapa (a) un volumen de muestra aumentado se aplica en el filtro.

8. Método según la reivindicación 7, en donde el volumen de muestra aumenta sustancialmente diez veces.

9. Método según la reivindicación 7 o 8, en donde la muestra se determina preferiblemente como negativa si las etapas (a)-(d) se repiten al menos dos veces y en la etapa (d) se recuenta un número inferior al número predeterminado de microorganismos.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 9, en donde ejecutar al menos dos de las etapas (a)-(c) en ubicaciones separadas en un dispositivo (1) para citometría de filtro automática comprende mover automáticamente el filtro (6) entre dichas ubicaciones y ejecutar dichas etapas simultáneamente en al menos dos filtros separados.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende usar un dispositivo (1) para analizar automáticamente microorganismos en una muestra acuosa usando citometría de filtro que comprende al menos un soporte (5) de filtro y módulos (7, 8, 9) de procesamiento, en donde el soporte de filtro está dispuesto para contener un filtro (6) para recibir la muestra, en donde los módulos de procesamiento comprenden medios (7) de aplicación de muestras para aplicar la muestra en el filtro en el soporte y medios (8) de visualización para visualizar los microorganismos en el filtro, en donde el dispositivo comprende además medios (2) de desplazamiento para mover automáticamente el soporte de filtro entre los módulos de procesamiento y en donde cada uno de los módulos y el soporte de filtro están dispuestos para una conexión amovible para una interacción, en donde el filtro está fabricado a partir de policarbonato y está dotado de una malla (61) que soporta el filtro, y en donde la malla está fabricada preferiblemente a partir de aluminio, y en donde el espesor de alambre de la malla es preferiblemente entre 5 y 20 μm , y más preferiblemente aproximadamente 10 μm , y/o en donde la distancia entre alambres de la malla es entre

20 y 100 μm , y más preferiblemente aproximadamente 40 μm .

12. Método según la reivindicación 11, que comprende disponer la malla en forma de un revestimiento.

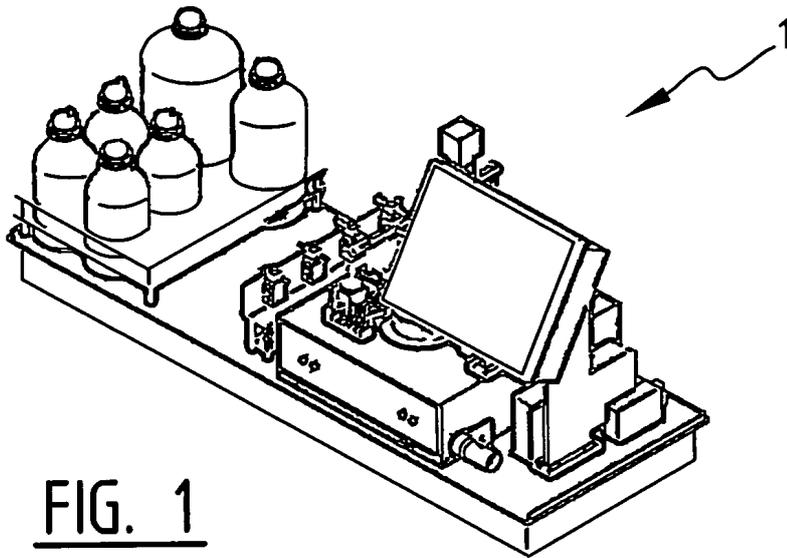


FIG. 1

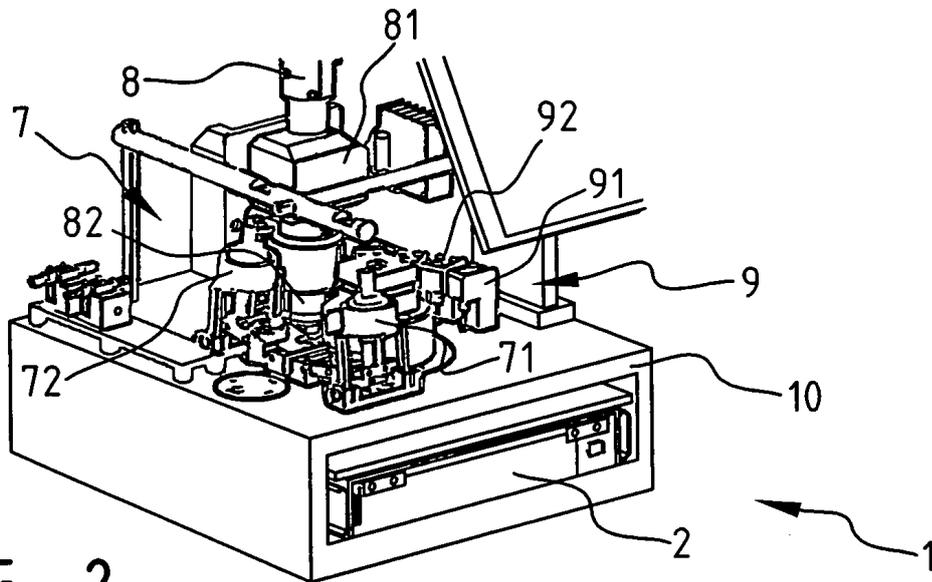


FIG. 2

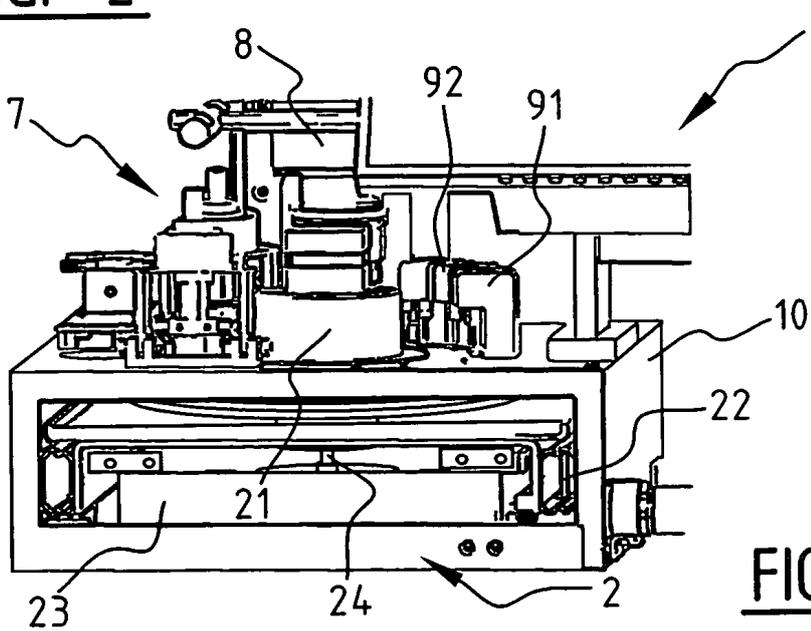


FIG. 3

