(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 757 958**

(51) Int. CI.:

G06K 9/00 (2006.01)
G01N 21/25 (2006.01)
G06T 7/00 (2007.01)
G01N 21/17 (2006.01)
G01N 21/47 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2015 PCT/EP2015/000679**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2015 WO15161914**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2015 E 15722049 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 3134848**

(54) Título: **Método para detectar microcolonias que crecen sobre una membrana o un medio de agarosa de una muestra y aparato de ensayo de esterilidad**

(30) Prioridad:

22.04.2014 EP 14290114

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.04.2020

(73) Titular/es:

MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt , DE

(72) Inventor/es:

FELDEN, LUC;
BOUTHILLON, MARINE;
OLIVIER, STÉPHANE;
WOEHL, PIERRE;
GUEDON, PIERRE y
ALLARD, FLORIAN

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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 detectar microcolonias que crecen sobre una membrana o un medio de agarosa de una muestra y aparato de ensayo de esterilidad

La presente invención se dirige a un método para detectar microcolonias en una membrana o un medio de agarosa.

Los métodos comerciales actuales para las pruebas de esterilidad en la industria farmacéutica siguen siendo métodos basados en el cultivo e incluyen un período de incubación de 14 días.

La bioluminiscencia del trifosfato de adenosina (ATP) es un método rápido bien establecido que utiliza un sustrato específico y una combinación de enzimas, luciferina/luciferasa, para descomponer el ATP microbiano de las células en crecimiento y producir luz visible, que puede medirse usando un luminómetro. Se han desarrollado varios sistemas comerciales para una gama de aplicaciones de pruebas farmacéuticas, incluyendo pruebas de esterilidad, especialmente para muestras filtrables en las que preocupa menos el ATP no microbiano de la muestra. El tiempo de prueba puede reducirse considerablemente porque la detección del crecimiento microbiano en medios de cultivo se logra mediante bioluminiscencia de ATP, en vez de hacerse mediante turbidez visible. Típicamente, los resultados equivalentes a los de las pruebas compendiadas están disponibles en 7 días o menos.

El sistema de detección y enumeración rápida de microbiología Milliflex® de Merck Millipore utiliza también bioluminiscencia de ATP para detectar células microbianas y está diseñado específicamente para monitorear la contaminación microbiana en muestras filtrables. Está automatizado, empleando tecnología de análisis de imágenes para detectar microcolonias que crecen directamente en la superficie de un filtro de membrana después de la adición de reactivos de bioluminiscencia. El sistema está diseñado para ser cuantitativo, pero se ha desarrollado y validado un método para usarlo en una prueba rápida de esterilidad.

Los métodos colorimétricos de detección del crecimiento se basan en un cambio de color que se produce en un medio de crecimiento como resultado del metabolismo microbiano durante el crecimiento, a menudo como resultado de la producción de CO_2. Un ejemplo de sistema de ensayo colorimétrico comercial que se puede utilizar para pruebas de esterilidad es el Sistema de Detección Microbiana 3D Dual-T BacT/ALERT® de bioMerieux. El sistema está automatizado y emplea tecnología sensible de detección y análisis del color. Puede detectar bacterias aerobias y anaerobias, así como levaduras y mohos.

Todas las células vivas producen una pequeña cantidad de fluorescencia (autofluorescencia) y esto se puede utilizar para detectar microcolonias que crecen sobre una superficie sólida mucho antes de ser visibles a simple vista. Esta técnica es particularmente útil para muestras filtrables, en las que un filtro de membrana puede incubarse en un medio nutritivo convencional y escanearse utilizando sistemas de imágenes altamente sensibles para detectar microcolonias, a veces varios días antes que usando los métodos tradicionales de recuento de colonias.

La detección de autofluorescencia ha sido comercializada por Rapid Micro Biosystems como Growth Direct, que utiliza un sistema de imágenes CCD de gran área sin aumento para detectar microcolonias en desarrollo. Aunque todavía no está validado para probar productos estériles, se ha establecido una "prueba de concepto". El sistema está automatizado y emplea tecnología sensible de detección y análisis del color. Puede detectar bacterias tanto aerobias como anaerobias, así como levaduras y mohos.

Por otro lado, la citometría no se basa en el crecimiento microbiano para detectar la contaminación, sino que más bien emplea técnicas de etiquetado celular para detectar microorganismos viables. Este enfoque tiene el potencial de detectar una amplia gama de organismos, incluyendo levaduras y mohos, en unos minutos. Los sistemas comerciales utilizan el etiquetado combinado de células fluorescentes y citometría de flujo o citometría de fase sólida para detectar células microbianas viables. Típicamente, las células se marcan usando un tinte fluorescente o un sustrato no fluorescente, que se convierte en un fluorocromo en células viables. La detección de las células marcadas se produce mediante escaneo láser en una celda de flujo (citometría de flujo) o bien en una plataforma de fase sólida, tal como un filtro de membrana (citometría de fase sólida). AES Chemunex ha desarrollado sistemas de detección de citometría de fase sólida.

El documento WO 2011/125033 A1 (PCT/1B2011/051481) describe un método para detectar racimos de partículas biológicas en una membrana o un medio de agarosa. El método de este documento del estado de la técnica describe determinar una representación topográfica de la superficie y detectar en la representación topográfica al menos un contorno que define una región que es probable que corresponda a un grupo de partículas biológicas, es decir, una microcolonia.

El método pretende detectar microcolonias en una etapa temprana de su crecimiento, cuando son de un diámetro que es demasiado pequeño para que sean visibles a simple vista (un diámetro de unas pocas décimas de micrómetros, por ejemplo 30 µm o menos).

Para obtener la representación topográfica de la superficie, la membrana se coloca en una placa de Petri abierta y se escanea mientras está expuesta al entorno. Esto podría dar lugar a una contaminación adicional de la membrana.

Por otra parte, el documento EP 1428018 B1 describe un método para la numeración de células vivas detectando microcolonias derivadas de la división celular *in situ* utilizando imágenes de área grande. Las pruebas de enumeración microbiana basadas en este documento incluyen métodos asépticos no destructivos para detectar microcolonias celulares sin reactivos de etiquetado. Estos métodos permiten la generación de cultivos puros que pueden usarse para la identificación microbiana y la determinación de la resistencia antimicrobiana.

La firma COPAN ha presentado en abril de 2011 un dispositivo para determinar el crecimiento de microcolonias bajo la marca comercial WASPLab. Se toma una imagen de una membrana mediante una vista en planta, así como con mapeo topográfico de láser. Después se obtienen los datos mientras la membrana está expuesta al entorno. Por lo tanto, el método no es adecuado para pruebas de esterilidad.

Todos los métodos anteriores se basan en una detección en un dispositivo abierto, en el uso de reactivos adicionales, o bien son lentos para cumplir con los requisitos actuales para las pruebas de esterilidad.

Recientemente, el documento WO 2014/005669 A ha revelado un dispositivo de preparación de muestras, preferiblemente para pruebas de esterilidad, que comprende un colector que incluye uno o más receptáculos para unidades de filtración, preferiblemente uno o más receptáculos adicionales para recipientes o viales de medios, y al menos una entrada y/o un puerto de salida. El receptáculo o los receptáculos están provistos respectivamente con uno o más conectores para establecer una conexión de fluido con los puertos de acoplamiento de las unidades de filtración y los recipientes o viales de medios al insertarlos en los correspondientes receptáculos. Los conectores están en comunicación fluida con los puertos de entrada y salida a través de canales definidos en el colector para permitir la transferencia de fluido deseada a través del colector. Las unidades de filtración comprenden una parte de base que define un soporte de membrana, una tapa extraíble para definir una cámara de membrana con la parte de base y sellar la cámara de membrana del entorno, y al menos un puerto de entrada y al menos un puerto de salida respectivamente accesibles desde el exterior de la unidad de filtración y la comunicación con la cámara de membrana en las posiciones aguas arriba y aguas abajo de una membrana cuando la misma está provista en el soporte de la membrana. Los puertos de entrada y salida están provistos respectivamente de un mecanismo de sellado formado de manera que se abra tras la conexión con un conector de acoplamiento en un receptáculo externo, preferiblemente el conector del colector del dispositivo de preparación de muestras, y para ser automáticamente resellable después de la desconexión.

Los documentos WO2008/137746 A1, WO3/022299 A2, MARCOUX PIERRE R ET AL: “Optical forward-scattering for identification of bacteria within microcolonies”, APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, 12 de enero de 2014, págs. 2043 – 2054, así como Kirstin Petersen ET AL: “3D Tracking of Building Processes in Macrotermes”, Visual observation and analysis of animal and insect behaviour 2012, 11 de noviembre de 2012, págs. 1 - 4 (http:people.seas.hardvard.edu/~jkwerfel/vaib_icpr.pdf) y PIN-TZU SU ET AL “Bacterial Colony from Two-Dimensional Division to Three-Dimensional Development”, PLOS ONE, vol. 7, nº 11, 14 de noviembre de 2012, describen un método para detectar microcolonias que crecen en una membrana, que comprende las etapas de irradiar la muestra con luz, visualizando un área incidente de la luz y detectando la luz reflejada dispersada o difundida desde la membrana.

Otro estado de la técnica se describe en los documentos WO2014/067907 A1, WO2012/119114 A2 y WO2012/067907 A2.

El objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo método y un aparato en correspondencia para las pruebas de esterilidad que permitan una detección rápida de microcolonias y microorganismos en un dispositivo cerrado sin el riesgo de contaminación a través del medio ambiente y sin el uso de reactivos adicionales.

El objeto anterior se consigue mediante el método de acuerdo con la reivindicación 1. Las reivindicaciones dependientes están dirigidas a diferentes aspectos ventajosos de la invención.

De acuerdo con la invención, se proporciona un método para detectar microcolonias que crecen en una membrana o un medio de agarosa de una muestra en un dispositivo cerrado. El método comprende las etapas de:

irradiar la muestra con una luz incidente en un ángulo β con respecto a la normal a la membrana o la superficie del medio de agarosa desde fuera del dispositivo cerrado;

visualizar un área incidente de la luz en la membrana o en la superficie del medio de agarosa por medio de un elemento receptor de luz usando un ángulo de imagen α diferente del ángulo β con respecto a la normal a la membrana o la superficie del medio de agarosa desde el exterior del dispositivo cerrado;

detectar la luz reflejada o retrodispersada desde la membrana o la superficie del medio de agarosa y/o las microcolonias en la membrana y/o las microcolonias en el medio de agarosa.

Como otro aspecto, el método anterior pretende utilizar una fuente de luz eléctrica, siendo un patrón que ilumina la muestra un punto, una línea, una diversidad de líneas, un patrón cuadrado, un patrón en arco o círculo, un patrón cruzado, un patrón multi-(cuadrado/redondo), un patrón de rejilla o un área bidimensional, un punto circular, un punto rectangular o un punto cuadrado y en el que el elemento receptor de luz contiene una matriz de sensores de píxeles.

Como otro aspecto, el método anterior comprende la etapa de determinar variaciones en la altura del área incidente de la membrana o la superficie del medio de agarosa basándose en la posición de la imagen de la luz incidente en el

elemento receptor de luz usando un método de triangulación.

Como otro aspecto, el método anterior pretende detectar contaminantes como las microcolonias mediante la determinación de una variación en la luz reflejada, dispersada y/o difundida desde la membrana o la superficie de la agarosa utilizando el número de píxeles que reciben un nivel de señal por encima del valor umbral alrededor de un pico de intensidad de la luz para cada línea o columna de una matriz de píxeles del sensor de píxeles.

Como otro aspecto, el método anterior pretende detectar microcolonias determinando una variación en el valor de intensidad máxima de la luz reflejada, dispersada y/o difundida desde la membrana o la superficie de la agarosa utilizando el nivel de señal más alto de cada línea o columna de una matriz de píxeles del sensor de píxeles.

Como otro aspecto, el método anterior pretende detectar microcolonias determinando una variación en el valor de la intensidad de la luz reflejada, dispersada y/o difundida desde la membrana o la superficie de la agarosa utilizando el nivel de señal de la matriz de sensor de píxeles.

Como otro aspecto, el método anterior comprende escanear la membrana o la superficie del medio de agarosa y/o las microcolonias en la membrana y/o las microcolonias en el medio de agarosa mediante un movimiento lineal y/o rotacional de la muestra relativo al elemento receptor de luz.

Como otro aspecto del método anterior, el movimiento relativo de la muestra en relación con el elemento receptor de luz se forma mediante una sucesión de un movimiento lineal - que desplaza el área incidente del centro de la muestra al borde de la misma - seguido de un movimiento de rotación de la muestra alrededor de un eje central de la misma - que desplaza el área incidente desde el borde de la muestra al centro de la misma, o desplazando el área incidente desde el centro de la muestra al borde de la misma - desplazando el área incidente desde el borde de la muestra al centro de la misma, seguido de un movimiento de rotación de la muestra alrededor de un eje central de la misma.

Como otro aspecto, el método anterior comprende disponer una fuente de luz y el elemento receptor de luz de forma que ilumine y obtenga imágenes de toda la membrana o de toda la superficie del medio de agarosa, mientras se realiza un movimiento relativo de la muestra con respecto a la fuente de luz y el elemento receptor de luz.

Como otro aspecto en el método anterior, un ángulo δ entre la dirección del movimiento lineal que desplaza el área incidente desde el centro al borde y una dirección de imagen del elemento receptor de luz se ajusta de forma que exceda un ángulo γ entre la dirección del movimiento lineal que desplaza el área del incidente desde el centro al borde y la dirección de irradiación de la luz láser.

Como otro aspecto en el método anterior, el ángulo γ entre la dirección del movimiento lineal que desplaza el área incidente desde el centro al borde y la dirección de irradiación de la luz láser se ajusta para exceder el ángulo δ entre la dirección del movimiento lineal desplazando el área del incidente desde el centro hacia el borde y una dirección de imagen del elemento receptor de luz.

Especialmente, la invención puede hacer uso de una cámara 3D para la propia topografía. Además, puede utilizarse la capacidad de imágenes en 2D de la cámara 3D para proporcionar información adicional. Por ejemplo, un "mapa de calidad" (es decir, el valor gris más alto dentro de la línea) registrado por la cámara se puede utilizar al mismo tiempo que la topografía. Alternativamente, o además, un "mapa de ancho" (es decir, el ancho de línea) registrado por la cámara se puede utilizar al mismo tiempo que la topografía.

De acuerdo con la invención, es posible utilizar únicamente la medición de altura o aprovechar una combinación con otras señales, como imagen 2D, mapa de calidad o mapa de ancho.

En lo que sigue, se describirán realizaciones preferidas de la invención con referencia a los dibujos adjuntos.

La fig. 1 es una vista esquemática de la disposición de una fuente de luz láser y una cámara 3D en relación con la muestra.

La fig. 2 es una vista esquemática de acuerdo con la reivindicación 1 cuando el área incidente está próxima al borde de la muestra.

La fig. 3 es una vista esquemática que ilustra un movimiento de barrido entre la muestra por una parte y la fuente de luz y la cámara 3D por la otra.

La fig. 4 muestra los resultados del escaneo de una muestra usando la invención.

En lo que sigue, se describirán ejemplos para llevar a cabo la invención con referencia a las figuras mencionadas anteriormente.

La invención se dirige a un método para detectar universalmente microcolonias que crecen en membranas (o en un medio de agarosa) en un dispositivo cerrado, como los que se describen en el documento WO 2014/005669 A, mediante una medición topográfica implementada para evitar cualquier "área muerta" y “artefactos”, y adecuado para la aplicación en pruebas de esterilidad.

Por una parte, cualquier "área muerta" es un mayor riesgo de resultados falsos negativos y declararía al método de detección como no relevante para una aplicación en una prueba de esterilidad. Por otro lado, los "artefactos" promoverían una tasa de falsos positivos y luego reducirían la aceptación del cliente, ya que la consecuencia económica sería el desperdicio de lotes no contaminados.

La medición topográfica se realiza en membranas habituales utilizadas para la aplicación en esterilidad, es decir, ésteres mixtos de membrana de celulosas (membrana HA) y membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (membrana PVDF o HV) para productos con antibióticos o agentes antimicrobianos.

La medición topográfica utiliza el método de triangulación con ayuda de una luz, preferiblemente luz LED o luz láser, y una cámara. Evita los artefactos debido a la reflexión múltiple de la luz en el borde del dispositivo cerrado (bordes verticales) y la luz es siempre visible por la cámara.

En una realización preferida, se usa una "luz LED" como fuente de luz, ya que previene los efectos de moteado que pueden ser molestos cuando se usan fuentes de luz láser. La luz LED se puede disponer como una línea LED.

La longitud de onda típica disponible con LED es casi UV, es decir, 405 nm, azul, es decir, 465 nm o verde, es decir, 525 nm. Sin embargo, la invención no se limita a estas longitudes de onda.

Las primeras pruebas han demostrado que una longitud de onda de 465 nm produce menos ruido en la membrana HV que otras longitudes de onda.

Las figs. 1 y 2 muestran una membrana 1 que está dispuesta en un dispositivo cerrado 3, que comprende una tapa transparente 15 que forma juntos una muestra 5. La muestra 5 se irradia con luz desde un dispositivo emisor de luz 13, por ejemplo una fuente de luz láser. La fuente de luz láser 13 irradia la luz láser hacia la membrana 1 en el dispositivo cerrado 3 de la muestra 5 a través de la tapa transparente 15, para obtener un área incidente 7 en la membrana.

Un elemento receptor de luz 9, que en la realización es una cámara (cámara 3D) que comprende una matriz de sensores de píxeles, refleja el área incidente de luz 7. El elemento receptor de luz 9 puede ser, por ejemplo, una cámara CCD, una cámara CMOS, sensores de píxeles activos, etc. El área incidente de luz 7 puede ser cualquiera entre un punto, una línea, uno, dos, tres, etc. patrones de línea, patrón cuadrado, patrón en arco o círculo, patrón cruzado, patrón Multi-(cuadrado/redondo), patrón de rejilla o superficie (punto circular, punto rectangular, punto cuadrado).

La fuente de luz láser 13 y la cámara 9 se montan juntas en una estructura de soporte 17 de forma que tengan una relación posicional definida y fija entre sí.

Como ejemplo, para la combinación de la fuente de luz láser 13 y el elemento receptor de luz 9, respectivamente, es posible usar un escáner láser de línea Keyence LJ-V 7060 que tiene una longitud de onda de 405 nm y un CMOS como elemento receptor de luz con una tasa de muestreo de 8 kHz. La longitud de una línea láser, es decir, el área incidente 7, obtenida por el escáner es de alrededor de 15 mm. El escáner se puede utilizar a una distancia de 60 mm de la membrana 1. La muestra 5 se colocará en una mesa de movimiento que comprende una mesa de rotación y una mesa lineal, que podría estar provista de una pinza para tomar la muestra 5 y ponerla en un escenario.

De acuerdo con la invención, el ángulo de irradiación β y el ángulo de formación de imágenes α, que están formados por el eje óptico de la cámara con respecto a la normal en la superficie de la membrana, o la dirección de irradiación de la luz láser y la normal en la superficie de la membrana, respectivamente, son preferiblemente diferentes de cero. Además, estos ángulos deben ser diferentes uno del otro.

En una realización preferida $\alpha = 40°$ y $\beta = 5°$.

Los valores de α y β pueden seleccionarse en un amplio margen. Por ejemplo, la posición de la fuente de luz láser 13 y la de la cámara 9 pueden invertirse.

La cámara 9 está conectada con una unidad de detección de microcolonias (no mostrada), que recibirá la información de imagen obtenida desde la cámara 3D y procesará esta información para detectar cualquier micro-colonia. Por lo tanto, detectando la luz reflejada, dispersada y/o difundida desde la membrana o la superficie del medio de agarosa y/o las microcolonias en la membrana y/o las microcolonias en el medio de agarosa, y procesando y evaluando la información de posición de la luz reflejada, dispersada y/o difusa detectada en la cámara 3D, es posible determinar la presencia de microcolonias.

Una microcolonia tendrá un cierto crecimiento en una dirección perpendicular a la superficie de la membrana. Esto puede ser detectado.

De acuerdo con las ecuaciones de triangulación bien conocidas, se puede obtener una variación en la altura dZ de la membrana 1 mediante la siguiente fórmula:

$$dZ = dX (\cos \beta) / (\sin (\alpha - \beta))$$

en donde dX es la variación de la posición de la imagen del área incidente en el elemento receptor de luz 9.

Según una realización preferida, la fuente de luz láser o LED 13 emite luz para formar un área incidente de luz 7 en forma de una línea en dirección Y en una porción plana de la membrana. Por lo tanto, al realizar un movimiento relativo entre la membrana 1 y la estructura de soporte 17 de la fuente de luz láser 13 y la cámara 9, es posible escanear un área de superficie definida de la membrana 1.

La muestra 5 se prepara como sigue. En primer lugar, se usa una membrana 1 en un proceso de filtración de un líquido en, por ejemplo, un proceso farmacéutico. A continuación, la muestra se usa para pruebas de esterilidad escaneando toda la superficie de la membrana sin dejar áreas muertas mientras se mantiene el dispositivo 3 cerrado en un estado cerrado para evitar contaminaciones en esa etapa. En una realización alternativa de la presente invención, después de la filtración y antes de las pruebas de esterilidad, la muestra 5 se pone en un entorno adecuado para promover el crecimiento de microcolonias durante un período de, por ejemplo, 5 días.

Si la membrana 1 se localiza en el dispositivo cerrado 3, el borde de la membrana está a menudo inmediatamente adyacente al borde o cerco 11 del dispositivo cerrado 3. Cuando se escanea la muestra, se ha de asegurar que este borde o cerco 11 no bloquee ni la luz láser ni la imagen del área incidente de luz 7 durante el procedimiento de barrido, de modo que no queden áreas muertas y que no se produzcan artefactos debidos al borde o cerco 11.

La fig. 2 muestra un caso de acercamiento a dicho borde o cerco 11 con el sistema de imagen de la figura 1. De acuerdo con la invención, siempre se garantiza que el ángulo γ entre la luz incidente y la dirección de exploración real sea mayor que 90°. La misma relación se aplica para el ángulo δ entre el eje óptico de la cámara 9 y la dirección de barrido en caso de acercarse a un borde o cerco 11 del dispositivo cerrado 3.

La fig. 3 muestra un ejemplo de los movimientos relativos preferidos de la muestra con respecto a la fuente de luz 13 y la cámara 3D 9 durante el escaneo utilizando el dispositivo mostrado en las figs. 1 o 2. En los ejemplos preferidos, la secuencia de escaneo consiste en escanear bandas usando un desplazamiento de escenario lineal de la muestra 5. Cuando el escaneo alcanza el final de su banda, es decir, cuando el escaneo alcanza el borde o cerco 11 del dispositivo cerrado 3, el escenario de rotación gira la muestra 5 para colocar el láser en el siguiente sector e iniciar el escaneo a la siguiente banda, y luego mueve la muestra en la dirección opuesta, para desplazar el área incidente 7 desde el borde del dispositivo cerrado hacia el centro del mismo.

La ventaja de esta secuencia de escaneo especial es que la forma de las microcolonias escaneadas no se distorsionará ni cambiará, ya que el escaneo siempre se realiza con un movimiento lineal de la muestra con respecto a la cámara 9.

Para reducir la superposición de bandas, especialmente en el centro de la muestra 5, es posible comenzar a una distancia del centro definida con el movimiento lineal hacia el borde de la muestra 5. La distancia depende del ancho del área incidente. El área no escaneada restante en el centro de la membrana 1 debe tener un diámetro similar al ancho de una banda. Luego, una primera o una última exploración en el centro de la membrana cubre esta área. Por lo tanto, toda la membrana 1 será escaneada con esta secuencia particular como se muestra en la fig. 3.

El número de escaneos depende del ancho de cada escaneo, respectivamente del ancho del área incidente y del campo de visión de la cámara. Debido a los errores de posicionamiento de las mesas giratorias, el número mínimo de bandas escaneadas debe ser de tres o más.

Un escaneo de membrana es rápido, por ejemplo, un escaneo de membrana de 47 mm podría llevar menos de 1 minuto con al menos una resolución espacial de 20 µm.

La relación señal/ruido habitual permite comenzar a detectar microcolonias a un tamaño de 50 µm para una configuración que proporciona un tono espacial de 25 µm de acuerdo con el teorema de muestreo de Nyquist-Shannon. Este teorema establece, con respecto al análisis de imágenes, que el detalle más pequeño a resolver debe ser muestreado utilizando al menos dos píxeles. Para las microcolonias que presentan un bajo contraste con respecto a las membranas, por ejemplo una microcolonia blanca sobre una membrana blanca, eso significa que la presente invención puede detectar cualquier microcolonia a simple vista. De hecho, en la medición de la topografía no importan el color y el contraste, sino solo la forma, es decir, la altura y el diámetro.

Típicamente, para la mayoría de los gérmenes, esto significa que se detectan dentro de los 5 días de incubación, o menos.

Se puede realizar la preparación tradicional de muestras para pruebas de esterilidad con membranas HA o HV ya que estos tipos de membranas se detectan con longitudes de onda láser < 600 nm.

La presente invención tiene la capacidad de detectar todo tipo de gérmenes, como *Methylobacterium extorquens, Propionibactehum acnes, Aspergillus brasiliensis, Dekkera anomala, Pseudomonas aeruginosa*.

Como una secuencia de barrido alternativa, es posible rotar la muestra cuando el área incidente alcanza el final de un movimiento lineal hacia el centro de la muestra.

En el ejemplo anterior, el área incidente había sido descrita como una línea. Sin embargo, es posible usar una diversidad de líneas o una forma diferente para el área incidente 7, siempre y cuando la forma del área incidente 7 y la secuencia de movimientos de escaneo garanticen que se escanea completamente toda la superficie de la membrana 1 sin dejar ningún área muerta.

Aunque el ejemplo anterior se ha descrito con respecto a una membrana circular 1, para un experto en la materia está claro que podrían usarse otras formas de membranas 1, como membranas rectangulares. La secuencia de escaneo se debe adaptar en consecuencia.

Para realizar el escaneo a través de la tapa cerrada 15 del dispositivo cerrado 3, y tener una luz reflejada desde una membrana transparente, semitransparente u opaca, el dispositivo cerrado 3 está dispuesto de manera que tenga una distancia determinada entre la tapa 15 y la membrana 1, que tenga una longitud de onda de la luz < 600 nm, por ejemplo 465 nm, y que realice un enmascaramiento de la luz reflejada, dispersa y/o difusa de la tapa 15.

La distancia "lejana" entre la tapa 15 del dispositivo cerrado 3 y la membrana 1 permite detectar cualquier microcolonia en las membranas HA y HV u otros tipos de membrana por la tapa transparente 15, incluso si estas membranas se vuelven semitransparentes en un medio de agar (líquido o sólido). Como se ha mencionado, al colocar la tapa 15 a una distancia "lejana" de la membrana, la emisión de la línea láser que llega de la tapa 15 no alcanzará el sensor de la cámara 9 y, por lo tanto, no se detectará.

Si, por razones geométricas, no es posible mantener la distancia lejana requerida entre la membrana 1 y la tapa 15, será posible configurar la cámara 9 para definir una región de interés, que contendrá la señal de la membrana 1, o dicho de otra manera, será posible enmascarar la señal de la tapa 15 en el sensor.

Por tanto, de acuerdo con la invención, la cámara 9 puede usarse para tomar una imagen bidimensional en escala de grises de un área de interés para diagnosticar la causa de cada artefacto. En relación con esto, se ha de tener cuidado de proporcionar una distancia razonable entre la tapa 15 y la membrana 1 para distinguir con seguridad los artefactos causados por la tapa 15 o las microcolonias proporcionadas en la membrana 1. Esto ayudaría a evitar detecciones de falsos positivos.

Aunque la descripción anterior se ha dado en relación con una membrana HV, también podrían usarse otros tipos de membranas 1 como las membranas HA. Si estas membranas 1 tienen una superficie relativamente plana, es posible empezar a detectar microcolonias a un tamaño de aproximadamente 50 µm para una configuración que proporcione una distancia espacial del dispositivo de detección de 25 µm.

Además, para las microcolonias que presentan un bajo contraste con respecto a las membranas, por ejemplo microcolonias blancas en una membrana blanca, esto significa que será posible detectar estas microcolonias con el escáner antes de que sea posible una detección a simple vista.

Por tanto, la invención permite detectar las microcolonias con alta fiabilidad después de un tiempo de incubación de típicamente 5 días o menos.

En la fig. 4 se muestran ejemplos de la topografía dada por algunas de las microcolonias en las membranas correspondientes 1.

Partiendo del resultado del cálculo de la topografía, se pueden determinar las áreas de interés.

Además, pueden usarse las imágenes bidimensionales tomadas por la cámara 9 de las áreas de interés en forma de escala de grises o color para distinguir aún más entre las áreas de interés reales, donde las microcolonias están creciendo en la membrana 1 y artefactos que pueden ser causados por polvo, arañazos o gotas en la tapa 15.

Basándose en estas etapas, se puede realizar una evaluación de la esterilidad de la membrana de una manera fiable y rápida.

De acuerdo con una segunda realización preferida, además de la información de posición de la luz reflejada en la cámara utilizada para la triangulación, la información de imagen adicional obtenida por la cámara está implicada en la determinación de la presencia o ausencia de cualquier microcolonia.

De acuerdo con esta segunda realización, la unidad de detección de microcolonias hace uso de la imagen en color o en escala de grises obtenida por la cámara 9, para distinguir de manera más segura entre artefactos y microcolonias reales. Por ejemplo, la detección de microcolonias se realiza determinando la variación en el valor máximo de intensidad de la luz incidente en la membrana o la superficie de la agarosa o las micro-colonias en la membrana o las microcolonias en el medio de agarosa usando el nivel de señal más alto para cada columna de la matriz del sensor de píxeles.

Alternativamente, la detección de contaminantes se realiza determinando la variación en el valor de intensidad de la luz incidente sobre la membrana o la superficie del medio de agarosa o las microcolonias en la membrana o las microcolonias en el medio de agarosa usando el nivel de señal de la matriz del sensor de píxeles.

De acuerdo con una tercera realización, podría usarse la variación de la forma del patrón de luz reflejada. Por ejemplo, la detección de microcolonias se realiza determinando la variación en el ancho (por ejemplo, el grosor de la línea) de la luz incidente en la membrana o la superficie del medio de agarosa o las microcolonias en la membrana o las microcolonias en el medio de agarosa usando el número de píxeles que tienen un nivel de señal por encima de un valor dado alrededor del pico de intensidad de luz para cada columna de la matriz de sensores de píxeles.

Por supuesto, el segundo y tercer ejemplo se pueden combinar para aprovechar al máximo la información de la imagen obtenida por la cámara.

Aunque la invención ha sido descrita basándose en ejemplos detallados, podrían implementarse varias modificaciones y variaciones. En particular, la longitud de onda del láser no está limitada a 405 nm. También podrían usarse otras longitudes de onda de luz láser, como 450, 465, 525, 532 nm, aunque se prefiere que las longitudes de onda de luz láser sean inferiores a 600 nm.

Estas diferentes longitudes de onda se pueden usar también en conexión con una línea LED.

Además, el ángulo de la incidencia relacionado respectivamente con la normal de la membrana se ajusta en 5° en la primera realización ilustrada. Sin embargo, este valor puede ser mayor o menor siempre que sea diferente de cero. De manera similar, el ángulo del eje óptico de la cámara en la primera realización preferida se establece en 40°. Este ángulo también podría tener un valor diferente. Nuevamente es aquí importante que el ángulo sea diferente de cero con respecto a la superficie normal a la membrana. Además, los dos ángulos anteriores deben ser diferentes.

En la primera realización preferida, el movimiento de la muestra en el escenario era una secuencia de movimientos lineales y rotacionales. Esto tiene la ventaja de que la forma de una microcolonia detectada durante el movimiento lineal se visualizará con precisión, sin distorsiones debidas a un movimiento de rotación.

Sin embargo, es posible realizar otros tipos de movimientos, por ejemplo movimientos combinados que incluyen desplazamiento lineal y rotación, siempre y cuando la sección de procesamiento de imágenes del aparato sea capaz de reconstruir la forma real del área escaneada.

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar microcolonias que crecen en una membrana (1) de una muestra (5) en un dispositivo cerrado o un medio de agarosa de una muestra (5) en un dispositivo cerrado (3), comprendiendo el método las etapas de:

irradiar la muestra (5) con una luz incidente en un ángulo (β) distinto de cero con respecto a la normal a la membrana (1) o la superficie del medio de agarosa desde el exterior del dispositivo (3);

visualizar un área incidente tomada en imágenes (7) de la luz en la membrana (1) o la superficie del medio de agarosa por medio de un elemento receptor de luz (9) utilizando un ángulo de formación de imágenes (α) diferente del ángulo incidente de la luz (β) con respecto a la normal a la membrana (1) o la superficie del medio de agarosa desde fuera del dispositivo (3); siendo el ángulo de toma de imágenes (α) distinto de cero;

detectar la luz reflejada, dispersada y/o difundida desde la membrana o la superficie del medio de agarosa y/o las microcolonias en la membrana y/o las microcolonias en el medio de agarosa;

estando el método caracterizado porque comprende además:

escanear la membrana (1) o la superficie del medio de agarosa por un movimiento lineal y rotacional de la muestra, relativo al elemento receptor de la luz (9); en donde

el movimiento relativo de la muestra (5) en relación con el elemento receptor de luz (9) comprende al menos una sucesión de:

un movimiento lineal que desplaza el área incidente visualizada (7) desde el centro de la muestra (5) hasta el borde de la misma, seguido por un movimiento rotacional de la muestra (5) alrededor de un eje central de la misma, y un movimiento lineal que desplaza el área incidente visualizada (7) desde el borde de la muestra (5) al centro de la misma; o

un movimiento lineal que desplaza el área incidente visualizada (7) desde el borde de la muestra (5) al centro de la misma, seguido por un movimiento rotacional de la muestra (5) alrededor de un eje central de la misma, y un movimiento lineal que desplaza el área incidente visualizada (7) desde el centro de la muestra (5) al borde de la misma; y

en donde el ángulo γ entre la luz incidente y la dirección del movimiento lineal que desplaza el área incidente visualizada (7) desde el centro de la muestra (5) al borde de la misma y un ángulo δ entre la dirección del movimiento lineal que desplaza el área incidente visualizada (7) desde el centro de la muestra (5) al borde de la misma y una dirección de toma de imágenes del elemento receptor de luz (9) se ajustan para exceder de 90°.

2. Método según la reivindicación 1, que usa una fuente de luz eléctrica, con un patrón que ilumina la muestra, siendo dicho patrón un punto, una línea, una diversidad de líneas, un patrón cuadrado, un patrón en arco o círculo, un patrón cruzado, un patrón multi-cuadrado/redondo, un patrón de rejilla o un área bidimensional, un punto circular, un punto rectangular o un punto cuadrado y en donde el elemento receptor de luz (9) contiene una matriz de sensores de píxeles.

3. El método según la reivindicación 1 o 2, que comprende la etapa de determinar las variaciones en la altura del área incidente visualizada (7) de la membrana (1) o la superficie del medio de agarosa basándose en la posición de la imagen del área incidente en el elemento receptor de luz (9) utilizando un método de triangulación.

4. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que la detección de microcolonias se realiza determinando la variación en la luz usando el número de píxeles que reciben un nivel de señal por encima de un valor umbral alrededor de un pico de intensidad luminosa para cada línea o columna de una matriz de píxeles del sensor de píxeles.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la detección de microcolonias se realiza determinando la variación en el valor de intensidad máxima de la luz usando el nivel de señal más alto para cada línea o columna de la matriz de píxeles del sensor de píxeles.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la detección de microcolonias se realiza determinando la variación en el valor de la intensidad de la luz usando el nivel de señal de la matriz del sensor de píxeles.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende:

realizar el movimiento relativo de la muestra con respecto a la fuente de luz (13) y el elemento receptor de luz (9) para iluminar y formar imágenes de toda la membrana (1) o toda la superficie del medio de agarosa.

8. Método según la reivindicación 1, en donde el ángulo (δ) se ajusta para que exceda de un ángulo (γ).

9. Método según la reivindicación 1, en donde el ángulo γ se ajusta para que exceda del ángulo δ.

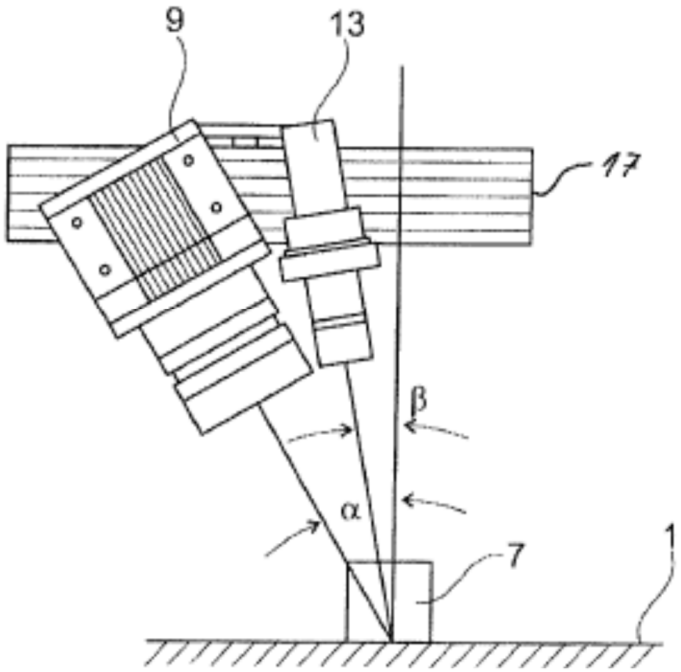


Fig. 1

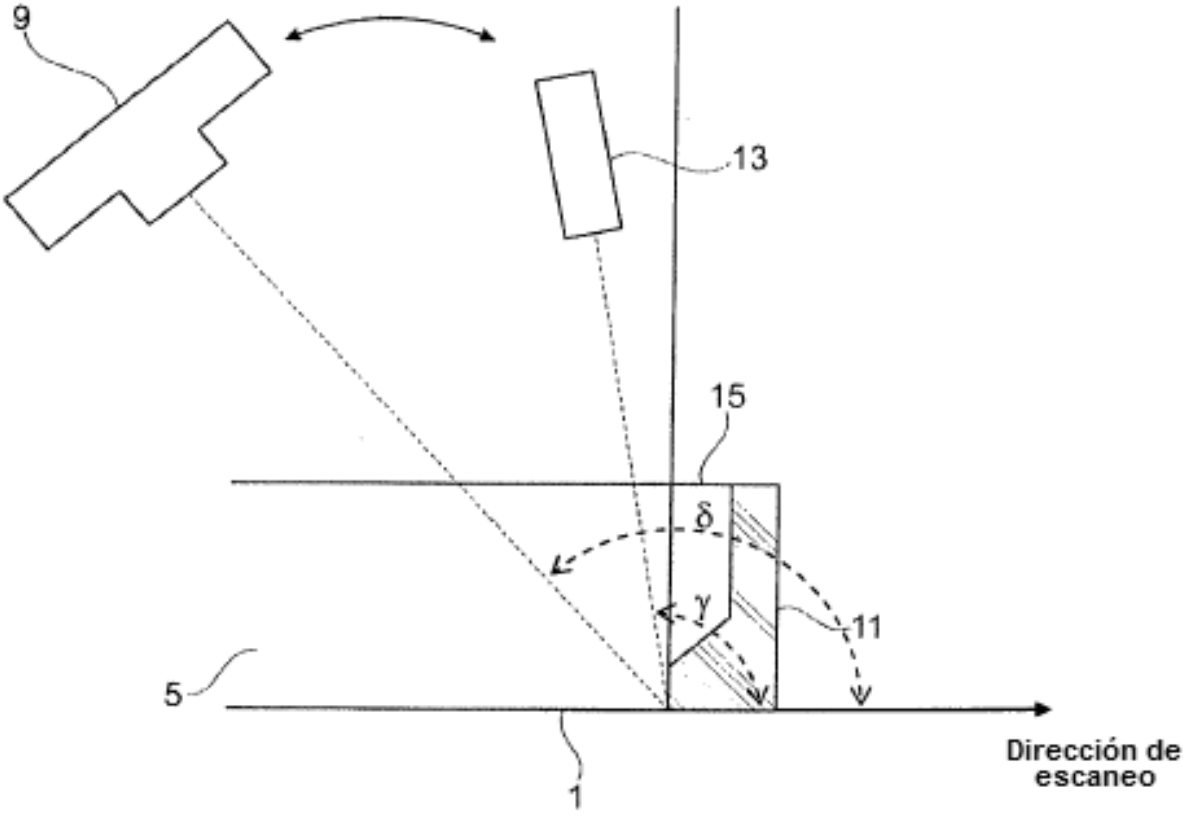


Fig. 2

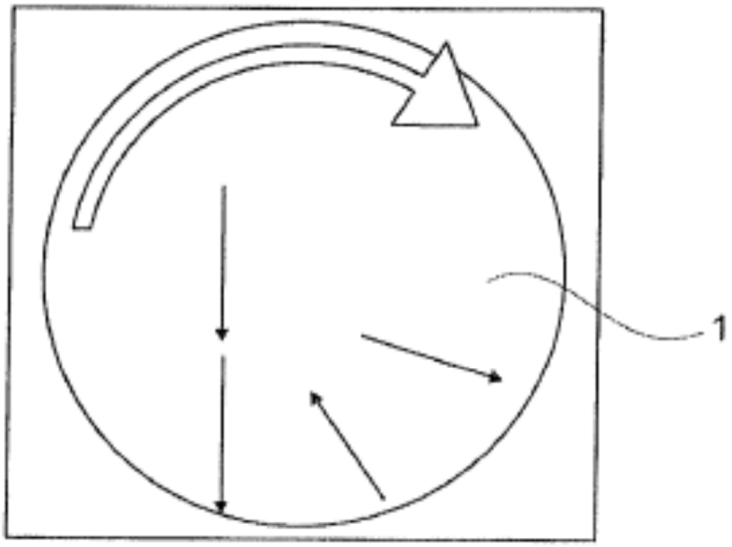
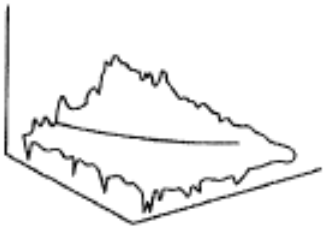


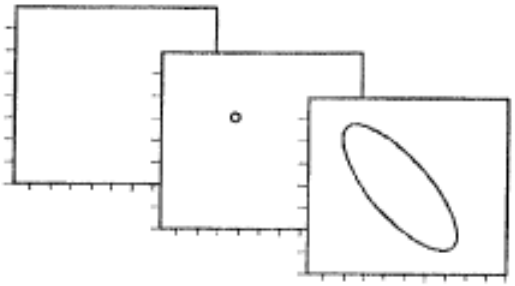
Fig. 3



Propionibacterium acnes
~ 5 días en HV

Dekkera anomala
~ 5 días en HA

Methylobacterium extorquens
~5 días en HA



Dekkera anomala
más días

Resultados del escaneo en distintos tipos de gérmenes

Fig. 4

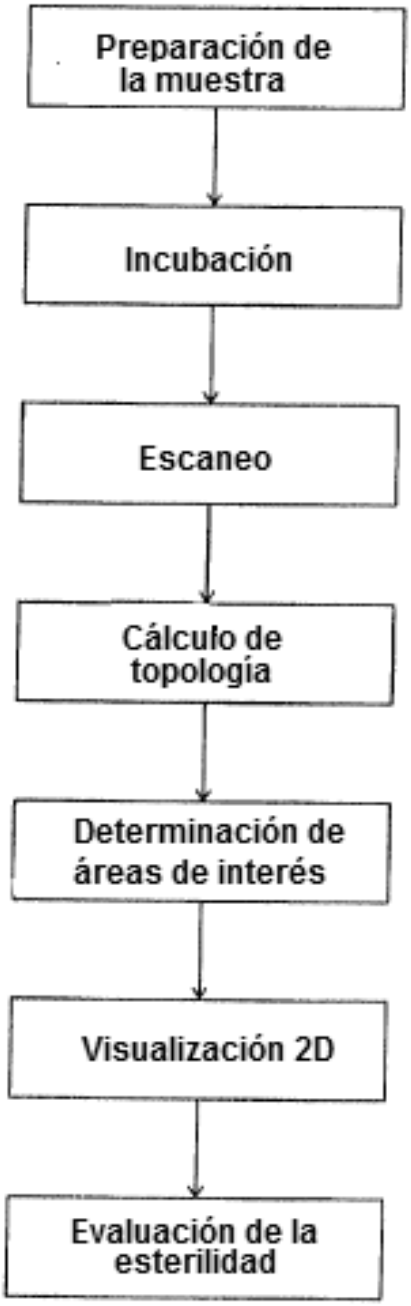

Preparación de la muestra
Incubación
Escaneo
Cálculo de topología
Determinación de áreas de interés
Visualización 2D
Evaluación de la esterilidad

Fig. 5