

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 386**

51 Int. Cl.:

C12M 1/34 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2010 PCT/EP2010/064384**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2011 WO11039198**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2010 E 10774145 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 2483388**

54 Título: **Dispositivo portátil para el enriquecimiento, alicuotado y análisis de microorganismos y toxinas**

30 Prioridad:

29.09.2009 EP 09382187

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

20.07.2020

73 Titular/es:

**GTZ MICROLAB DETECT, S.L. (100.0%)
Parque Tecnológico de Bizkaia, Edificio 202
48170 Zamudio - Bizkaia, ES**

72 Inventor/es:

**GONDRA ZUBIETA, JOSÉ LUIS;
ALDAMIZ-ECHEBARRIA ZULUETA, PALOMA;
ESCOBAL GONZALO, JAVIER;
OLABARRIA DE PABLO, MIREN GARBIÑE;
CRUZ LLOSA, ARMANDO;
BERGANZA GRANDA, JESÚS y
SAUVAGE, BRIGITTE MICHÉLE JACQUELINE**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 774 386 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

Dispositivo portátil para el enriquecimiento, alicuotado y análisis de microorganismos y toxinas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a dispositivos para realizar la detección de microorganismos o toxinas. Más particularmente, la presente invención se refiere a dispositivos pre-ensados portátiles que son adecuados para el cultivo de microorganismos, el alicuotado de volúmenes predeterminados de muestras de análisis y la realización de la detección de microorganismos o toxinas en base a las reacciones inmunológicas utilizando muestras de tamaño considerable recogidas en puntos remotos lejos de los laboratorios de análisis.

Antecedentes de la invención

10 La contaminación en alimentos o medioambiental se puede definir como la presencia en los alimentos o el ambiente de sustancias extrañas dañinas, difíciles de digerir o, en cualquier caso desagradables, por ejemplo, sustancias químicas, microorganismos o diluyentes.

15 La detección ideal de microorganismos y toxinas en la industria alimenticia y todas las industrias en general debería tener por lo menos las siguientes características: capacidad de detectar una cantidad de patógenos diferentes a un coste que es permisible; la capacidad de incorporar fácilmente nuevos análisis de patógenos en pautas para asegurar que no se pase por alto ningún patógeno emergente; la detección debería ser simple para ser realizada mediante personal no cualificado; necesitaría una instrumentación mínima o nula y descartaría errores y un bajo rendimiento que dan lugar a una interpretación incorrecta; debería ser suficientemente sensible para detectar niveles bajos de patógenos e incluso específica para la detección de las especies patogénicas de interés.

20 La mayoría de métodos convencionales para detectar patógenos bacterianos transportados a través de los alimentos y otras sustancias dependen del uso del medio microbiológico para crecer y enumerar selectivamente las especies bacterianas. Los métodos son sensibles y económicos y proporcionan resultados tanto cualitativos como cuantitativos. Desgraciadamente para la industria alimenticia, donde el tiempo y los costes son puntos, la preparación de medio y placas, el recuento de colonias y la caracterización bioquímica de las colonias aisladas hacen que sea un proceso que
25 lleva mucho tiempo y es laborioso (de Boer y Beumer 1999).

WO1999002650 (Oxoid Limited) se refiere a un método de enriquecimiento y detección selectiva de microorganismos que comprende incubar la muestra en un medio de pre-enriquecimiento, con uno o más agentes selectivos para favorecer el crecimiento del microorganismo diana dispuesto para la liberación en el medio después de un tiempo de retraso predeterminado. El método presentado en la misma combina las etapas de pre-enriquecimiento y
30 enriquecimiento selectivo mediante el uso de una liberación temporizada del agente o agentes selectivos.

WO1994028163 (Foss Electric AS) se refiere a un método para la determinación de Salmonella, que comprende una etapa de enriquecimiento y una etapa de determinación. El procedimiento de enriquecimiento implica condiciones selectivas, de manera destacada el uso de las sustancias selectivas tetracionato y/o novobiocina o un incremento en la temperatura de cultivo hasta 39-43°C, favoreciendo la detección precoz de Salmonella.

35 Se conocen dispositivos para analizar muestras por US 6 197 574 B1 de Miyamoto et al., WO 97/03209 A1 de Charm Sciences. Inc. Et Al., Fr 2 849 861 A1 de Giat Industries S.A., US 2009/197283 A1, de Gold Et Al, EP 1 712 614 A1 de SRL. Inc. et al, y US 2006/088895 A1 de Wanders et al., casi todos ellos describen tubos de ensayo provistos de palos colectores destinados a recolectar una micromuestra al rascar la superficie de un objeto que podría contener agentes de riesgo biológico.

Desde una perspectiva de la salud pública, tiempos de detección más rápidos son esenciales para prevenir la expansión de enfermedades infecciosas o la identificación de una fuente continua de infección. El análisis *in situ* en las instalaciones potencialmente contaminadas es por tanto más deseable que transportar las muestras para el posterior análisis de laboratorio.

- 5 Entre los métodos de análisis rápido ampliamente utilizados se incluyen análisis basados en inmunoensayos y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los inmunoensayos son análisis basados en anticuerpos que son herramientas de diagnóstico sensibles para la detección *in vitro* de una serie de antígenos asociados con la enfermedad u otras afecciones físicas de importancia clínica. Los análisis basados en PCR se consideran especialmente atractivos debido a su coste relativamente bajo y su potencial aplicación en programas de cribado a gran escala mediante tecnologías automatizadas. Sin embargo, el análisis por PCR es aún una técnica compleja para la aplicación en análisis rutinarios, requiriendo por tanto personal cualificado y maquinaria de laboratorio especializada.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo que permite la detección de contaminación en alimentos o medioambiental *in situ*.

- 15 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo que permite el enriquecimiento de macro-muestras, tales como un trozo de carne, pescado, queso, etc.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo que permite la detección de microorganismos y toxinas contaminantes en macro-muestras, tales como un trozo de carne, pescado, queso, etc.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo que permite la introducción de una muestra de análisis en el dispositivo sin contaminar de forma accidental los componentes interiores del dispositivo.

- 20 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo que permite manipular de manera cómoda, segura y fácil macro-muestras de carne o similares.

En la presente descripción, macro-muestra se refiere a muestras que pesan unos pocos gramos, es decir, muestras correspondientes a un trozo de carne o similar. Con este significado, una muestra obtenida rascando un trozo de comida o sumergiendo un palito colector en el mismo no cae en el alcance de una macro-muestra.

- 25 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo que permite la detección de contaminantes sin contaminar de forma accidental los lugares circundantes. Un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo para detectar contaminación en alimentos o medioambiental que contribuye, cumple y, por tanto, se puede utilizar en un plan de contingencia de la contaminación en alimentos o medioambiental.

- 30 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo que es fácil y simple de manejar por personal no cualificado.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo que permite la extracción de alícuotas exactas o predeterminadas de una mezcla de una muestra de análisis y medio de cultivo por personal no cualificado sin requerir un control o verificación.

- 35 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo que permite la extracción de alícuotas exactas o predeterminadas de una muestra enriquecida y filtrada en un receptáculo confinado donde sus analitos se pueden además extraer y detectar.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo que integra 3 cámaras de procesamiento en una única cámara, es decir, las cámaras para la filtración de una alícuota enriquecida, para la extracción de analito y para la

detección de analito.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo que integra 3 cámaras de procesamiento en una única cámara, que es un compartimento hermético.

5 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo que integra 3 cámaras de procesamiento en una única cámara, que además mantiene su autonomía y función durante cada una de las 3 etapas de procesamiento, es decir, la filtración, la extracción de analito y la detección de analito.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo que permite la manipulación y el análisis de una muestra de análisis con una tira inmunocromatográfica lateral de flujo por personal no cualificado.

10 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo que evita la inutilización de tiras inmunocromatográficas laterales de flujo por una manipulación incorrecta o accidental.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo que es industrialmente fabricable.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo que utiliza moldes de inyección en series rentables, facilitando así el montaje automático.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo que es económico.

15 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo que es portátil, que permite la detección *in situ* de contaminación en alimentos o medioambiental.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo que es desechable, particularmente en contenedores o instalaciones de residuos no especializados.

20 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo que permite la circulación y el procesado de la muestra para ser finalmente detectada y leída, a utilizar por persona no cualificado, y con una manipulación mínima.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo que elimina los riesgos de malfuncionamiento, defectos o una incorrecta manipulación por el usuario.

Descripción de la presente invención

25 El objetivo de la invención se alcanza con un dispositivo portátil para detectar agentes de riesgo biológico en una muestra que comprende un recipiente que encierra un primer alojamiento lleno con un medio de cultivo para agentes de riesgo biológico, un segundo alojamiento para recibir la muestra, una tapa que se puede acoplar al contenedor para cerrar dicho segundo alojamiento, medios para comunicar (fluídicamente) el primera y el segundo alojamiento que permite obtener una muestra lista para analizar, y medios para detectar la presencia de agentes de riesgo biológico en la muestra lista para analizar, caracterizado porque el segundo alojamiento tiene una superficie de entrada mayor que 30 10 y comprende una pared lateral provista de al menos un indicador visual correspondiente a un volumen de llenado predeterminado, de modo que es posible recolectar de manera segura y fácil una macro-muestra, prepararla detectar y detectar la presencia de agentes de riesgo biológico de manera segura.

35 Estas características permiten manejar y manipular de manera cómoda, rápida y fácil una macro-muestra, especialmente para una persona no calificada. En lugar de raspar con un colector, el usuario debe depositar o verter la muestra en un alojamiento, que tiene una superficie de entrada que evita que la muestra se vierta fuera del mismo. El indicador visual, por ejemplo, una marca de nivel, indica el volumen a llenar con la muestra, garantizando así que la cantidad de muestra sea apropiada para el volumen del medio de cultivo.

En los dispositivos del estado de la técnica esto no es posible, porque la entrada, es decir, la entrada de los tubos, está destinada a alojar un palo colector, no una macro muestra.

Otra ventaja es que permite cumplir con las normativas, que establecen el peso mínimo de las muestras.

5 Según una primera realización, el segundo alojamiento está en la tapa, que más preferiblemente es una placa. Por lo tanto, el usuario puede preparar la muestra de una manera fácil. Puede dejar que la placa se apoye sobre una superficie y verter dentro la muestra. Luego, después, solo tiene que acoplar la tapa al recipiente.

En dispositivos del estado de la técnica, después de raspar la muestra, el usuario debe buscar el resto del dispositivo y acoplarlo. Además, no podrá dejarlo bocarriba sobre una mesa, sino que necesitará un soporte para garantizar que se mantenga vertical.

10 Según otra realización, el segundo alojamiento está en el recipiente. Por lo tanto, deben realizarse las mismas operaciones que se describen en relación con la primera realización, pero esta vez la operación de acoplar la tapa se realiza como con cualquier recipiente común, cerrándola desde la parte superior.

Más preferiblemente, el primer alojamiento tiene un volumen comprendido entre 50 y 500 ml, y el segundo alojamiento tiene un volumen comprendido entre 5 y 300 ml.

15 Preferiblemente, la tapa y el recipiente comprendían dos superficies complementarias mutuamente roscadas de manera que la tapa y el recipiente se pueden acoplar atornillando. Otra opción puede ser un acoplamiento presionando con un movimiento positivo.

20 Ventajosamente, el dispositivo comprende medios para evitar el desacoplamiento de la tapa cuando se alcanza una primera posición de acoplamiento determinada, y por lo tanto, será posible evitar que la tapa se abra una vez que el medio de cultivo se haya mezclado con la muestra.

Más ventajosamente, los medios para comunicar (fluídicamente) el primer y el segundo alojamiento se activan cuando se alcanza una segunda posición determinada.

En el recorrido de acoplamiento se alcanza la primera posición determinada antes que la segunda posición determinada, de modo que se evita el riesgo de fuga del medio de cultivo.

25 De acuerdo con una realización preferida, los medios para comunicar (fluídicamente) el primer y el segundo alojamiento comprenden un sello que separa el primer y el segundo alojamiento que puede romperse mediante elementos de corte dispuestos en la tapa.

30 En este caso, la tapa comprende una pared perimetral exterior provista de una rosca interior, y una pared perimetral interior provista de elementos de corte destinados a rasgar el sello, estando dicho segundo alojamiento encerrado por dicha pared perimetral interior.

En otra realización, los medios para comunicar (fluídicamente) el primer y el segundo alojamiento comprenden dos paredes adyacentes que giran mutuamente, una de ellas que encierra el primer alojamiento, la segunda que encierra el segundo alojamiento, estando dichas paredes provistas de agujeros dispuestos de manera tal que coincidan cuando se alcanza la segunda posición determinada.

35 En otra realización más, los medios para comunicar (fluídicamente) el primer y el segundo alojamiento comprenden una válvula que se abre automáticamente cuando se alcanza la segunda posición determinada.

En otra realización, los medios para comunicar (fluídicamente) el primer y el segundo alojamiento comprenden una

válvula o sello con un elemento de apertura que puede activarse manualmente, bloqueándose dicho elemento de apertura hasta que se alcanza la segunda posición determinada.

El dispositivo puede comprender medios de inertización encerrados en un tercer alojamiento, y más preferiblemente medios para evitar que los medios de inertización se activen hasta que se haya alcanzado la segunda posición. El tercer alojamiento que contiene los medios de inertización puede estar dispuesto en la tapa.

Estos medios de inertización pueden ser sólidos, por ejemplo, una píldora dispuesta en un alojamiento cuyas paredes que la separan de la muestra se pueden romper presionándolas, es decir, una unidad de ampolla (B en la figura 16). Los medios de inertización pueden ser líquidos y/o químicos y/o biológicos. Podrían estar en forma de polvo o cuentas.

Los medios para detectar la presencia de agentes de riesgo biológico en la muestra comprenden una tira de inmunocromatografía, preferiblemente encerrada en un cuarto alojamiento provisto de una superficie transparente que permite ver la tira desde el exterior. Esto significa que podría ser medio de cultivo cromogénico.

Finalmente, el segunda alojamiento está parcialmente cerrado por un septo que permite acceder a la muestra desde el exterior.

La invención también se refiere a un método para detectar agentes de riesgo biológico en una muestra usando un dispositivo portátil, dicho dispositivo portátil que comprende un recipiente que encierra un primer alojamiento lleno de un medio de cultivo para agentes de riesgo biológico, un segundo alojamiento para recibir la muestra, una tapa que se puede acoplar al recipiente para cerrar dicho segundo alojamiento, medios para comunicar (fluídicamente) la primera y la segunda carcasa que permiten obtener una muestra lista para analizar y medios para detectar la presencia de agentes de riesgo biológico en la muestra lista para analizar, en donde el segundo alojamiento tiene una superficie de entrada mayor que 10 cm², y preferiblemente menor que 100 cm², y comprende una pared lateral provista de al menos un indicador visual correspondiente a un volumen de llenado predeterminado,

dicho método comprende los pasos de:

llenar el segundo alojamiento a través de la superficie de entrada con una muestra hasta que se alcance el indicador visual correspondiente a un volumen de llenado predeterminado;

cerrar el alojamiento con la tapa;

activar los medios para comunicar (fluídicamente) el primer y el segundo alojamiento;

después de que haya transcurrido un tiempo mínimo de cultivo, de modo que la muestra esté lista para analizar, activar los medios para detectar la presencia de agentes de riesgo biológico en la muestra lista para analizar

de modo que sea posible recolectar de manera segura y fácil una macro-muestra, prepararla y detectar la presencia de agentes de riesgo biológico de manera segura.

Preferiblemente, dicho método comprende un paso adicional de inertización de la macro-muestra y el medio de cultivo.

La presente invención se refiere también a un dispositivo (1) para analizar microorganismos o toxinas, que comprende:

un recipiente (2) que encierra un volumen (3) relleno con un medio de cultivo para un microorganismo y está dispuesto con una primera abertura (A1) sellada con un primer sello (S1) y una segunda abertura (A2) sellada con un segundo sello (S2);

una tapa (4) para cubrir dicha primera abertura (A1), definiendo dicha tapa (4) un alojamiento (5) para recibir una

muestra a analizar (TS),

medios (6) para el acoplamiento estanco de forma mecánica de la tapa (4) con el recipiente (2); y

– medios (7) para romper el primer sello (S1) de dicha primera abertura (A1) en una posición determinada (P1) del recorrido del acoplamiento entre la tapa (4) y el recipiente (2), poniendo así en contacto el medio de cultivo con la muestra a analizar.

5

Este dispositivo (1) según la presente invención es útil como un enriquecedor o alicuotador de muestras a analizar.

La presente invención se refiere además a un dispositivo inyector de análisis (12) configurado para el acceso al volumen (3) del dispositivo (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 a través de la segunda abertura (A2) del recipiente (2) mediante la perforación del segundo sello (S2), comprendiendo dicho dispositivo inyector (12) un tubo (13) y un émbolo deslizante (14), donde el émbolo comprende un sello (15) en su parte inferior (14a) y una tira inmunocromatográfica lateral de flujo (16) en el interior a lo largo del émbolo (14).

10

La presente invención se refiere adicionalmente a un dispositivo inyector desactivador (22) configurado para el acceso al volumen (3) del dispositivo (1) según las reivindicaciones a través de la tercera abertura (A3) del recipiente (2) mediante la perforación del tercer sello (3), comprendiendo dicho dispositivo inyector (22) un tubo (23) y un émbolo deslizante (24), donde el tubo comprende un sello (25) en su parte inferior (23a) y un agente desactivador, y el émbolo (24) tiene un extremo puntiagudo.

15

Los dispositivos (1), (12), o (22) según la presente invención son útiles como detectores de la contaminación medioambiental o en alimentos, y han sido definidos en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

20

La figura 1 es una sección transversal del dispositivo (1).

La figura 2 muestra un recipiente (2) que encierra un volumen (3) y está provisto de una primera abertura (A1) sellada con un primer sello (S1), una tapa (4) que define un alojamiento (5) para recibir una muestra a analizar (TS), medios (6) para el acoplamiento estanco de forma mecánica de la tapa (4) con el recipiente (2), medios (7) para romper el primer sello (S1).

25

La figura 3 muestra el recipiente (2) provisto de una segunda abertura (A2) en forma de un canal (8) sellada con un segundo sello (S2), y una malla (9).

La figura 4 muestra medios de detención extraíbles (10) para evitar que la tapa (4) o el recipiente (2) alcancen la posición determinada (P1) del recorrido de acoplamiento, evitando así desperdiciar el dispositivo (1) por la rotura accidental del sello (S1) antes de su uso.

30

La figura 5 muestra medios (7) para romper el primer sello (S1) de la primera abertura (A1) que comprenden salientes (11) en la tapa (4) capaces de rasgar el primer sello (S1).

La figura 6 muestra el recipiente (2) dispuesto adicionalmente con una tercera abertura (A3) sellada con un tercer sello (S3).

35

La figura 7 muestra un dispositivo inyector de análisis (12) que comprende un tubo (13) y un émbolo deslizante (14), donde el émbolo comprende un sello (15) en su base (14a) y una tira inmunocromatográfica de flujo lateral (16) en el interior a lo largo del émbolo (14).

La figura 8 muestra medios de seguridad (17) que cuando se liberan, permiten empujar el dispositivo inyector (12) hacia dentro de la segunda abertura (A2) y perforar el sello (S2).

La figura 9 muestra medios de detención (18) que establecen un recorrido que permite que el émbolo (14) del dispositivo inyector (12) aspire una cantidad predeterminada de líquido.

5 La figura 10 muestra medios de seguridad (19) que cuando se liberan, permiten empujar la tira inmunocromatográfica lateral de flujo (16) por el interior y a lo largo del émbolo (14) y perforar el sello (15)

La figura 11 muestra medios de seguridad (19) en forma de un botón giratorio. Muestra además medios de detención (20) que establecen una distancia máxima de inyección del émbolo, evitando así desperdiciar la tira inmunocromatográfica.

10 La figura 12 muestra medios de detención (21) que establecen un recorrido máximo, evitando así la extracción del dispositivo inyector (12) o de cualquier componente del mismo fuera del dispositivo (1).

La figura 13 muestra un dispositivo inyector desactivador (22) que comprende un tubo (23) y un émbolo deslizante (24), donde el tubo (23) comprende un sello (25) en su parte inferior (23a) y el émbolo (24) tiene un extremo puntiagudo.

15 La figura 14 muestra medios de seguridad (26) que cuando se liberan permiten empujar el dispositivo inyector (22) hacia dentro de la tercera abertura (A3) y perforar el sello (S3).

La figura 15 muestra medios de detención (27) que establecen un recorrido máximo, evitando la extracción del dispositivo inyector (22) o de cualquier componente del mismo fuera del dispositivo (1).

La figura 16 muestra una sección de una realización provista de una tapa/placa, que a su vez comprende una ampolla (B).

20 **Descripción de la presente invención**

Definiciones

El término "microorganismo" se refiere a un organismo que es microscópico, normalmente demasiado pequeño para ser visto por el ojo humano a simple vista, e incluye bacterias, hongos, virus, archaea y protistas; plantas microscópicas (denominadas algas verdes); y animales, tales como plancton y planaria.

25 Entre los microorganismos de interés se incluyen virus entéricos (virus de la hepatitis A, rotavirus, astrovirus, adenovirus entéricos, virus de la hepatitis E, priones de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE), y los calicivirus humanos que consisten en los norovirus, tales como los virus de Norwalk y los virus de Sapporo); parásitos, tales como Cyclospora, Giardia lamblia, las tenias de cordero y cerdo (Taenia saginata y Taenia solium, respectivamente), el nemátodo intestinal que provoca la triquinosis (Trichinella spiralis), los nemátodos o gusanos redondos ("roundworms") (Anisakis spp., Pseudoterranova spp., Eustrongylides spp. y Gnathostoma spp.), céstodos o tenias (Diphyllobothrium spp.), y tremátodos o duelas (Chlonorchis sinensis, Opisthorchis spp., Heterophyes spp., Metagonimus spp., Nanophyetes salminicola y Paragonimus spp.); mohos que producen micotoxinas (Especies de Aspergillus, Fusarium, Penicillium, y Claviceps); Yersinia enterocolitica; Vibrio species (Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Vibrio vulnificus, Vibrio mimicus, Vibrio hollisae, Vibrio fluvialis, and Vibrio furnissii); Staphylococcus aureus; Campylobacter spp.

30 (principalmente C. jejuni subsp. Jejuni); Listeria monocytogenes; Salmonella; especies de Shigella (S. dysenteriae, S. flexneri, S. boydii, y S. sonnei); Escherichia coli O157:H7; Clostridium botulinum y Clostridium perfringens; Bacillus cereus (B. anthracis, B. cereus, B. mycoides, B. pseudomycoides, B. thuringiensis y B. weihenstephanensis). Los microorganismos de interés de la presente invención son los patógenos transportados a través de los alimentos.

El término “toxina” se refiere a sustancias químicas específicas caracterizables, frecuentemente proteínas, con propiedades biológicas específicas, incluyendo la inmunogenicidad, producida por microbios, plantas superiores, o animales incluyendo el hombre. Las sustancias tóxicas no producidas por organismos vivos también están comprendidas en la definición de “toxina”.

5 Entre los ejemplos de toxinas se incluyen toxinas microbianas, tales como enterotoxinas, neurotoxinas, cereulida, neurotoxina de *Botulinum*, toxina de Anthrax, citotoxina de Subtilase, toxina de *Pasteurella multocida*, toxinas de *Vibrio* RTX, toxina del cólera, toxina de *Helicobacter pylori*, toxinas de Staphylococcus, ribotoxinas fúngicas, toxinas de Cyanobacteria, aflatoxinas, ciguatoxina, escombrotóxina, desoxinivalenol, ocratoxina A, fumonisinas, alcaloides del ergot, toxina de T-2, zearalenona, y otras micotoxinas menores, tales como ácido ciclopiazónico y patulina.

10 El término “medio de cultivo” se refiere en el presente documento a cualquier preparación líquida o sólida fabricada específicamente para el crecimiento de microorganismos u otro tipo de células presentes en la muestra de análisis. El medio de cultivo es normalmente un medio selectivo que comprende varios agentes antimicrobianos para eliminar el crecimiento de bacterias que no son de interés. El medio de cultivo incluye aquellos nutrientes adecuados para acelerar el crecimiento de los microorganismos de interés. También se pueden añadir conservantes.

15 Entre los ejemplos de medio de cultivo se incluyen, sin limitación, caldos de cultivo con nutrientes (medio de nutrientes líquido) o medio *Luria Bertani* (medio LB o caldo de cultivo *Lysogeny*). El tipo de medio de cultivo depende generalmente del microorganismo a enriquecer o desarrollar y posteriormente a detectar.

20 El término “sello” se refiere a un cierre que se debe romper para ser abierto. Puede estar fabricado de cualquier material, tal como plástico blando o duro, películas, siempre y cuando evite la pérdida de materiales líquidos, sólidos, o gaseosos, mientras se permite su rotura a través del uso de una fuerza o presión razonable. Los sellos típicos son los sellos de un yogurt fabricados de aluminio. En su lugar, también se puede utilizar una lámina de plástico delgada rompible.

25 El término “muestra a analizar” se refiere al material obtenido de fuentes, tales como materiales biológicos, alimentos, bebidas o el ambiente incluyendo aire, agua, maquinaria, superficies industriales, etc. Los materiales biológicos incluyen los obtenidos de animales, plantas, hongos comestibles, y puede ser cualquier muestra de tejido, fluido corporal, precipitado del fluido corporal o muestras de lavado gástrico. Los fluidos corporales incluyen sangre, suero, linfa, frotis, sudor, heces, orina. Dichas fuentes no pretenden ser exhaustivas, sino de ejemplo.

30 El término “malla” o “filtro de malla”, también denominada tamiz o filtro, se refiere a una barrera semipermeable fabricada de hilos metálicos, fibras o de otro material flexible o dúctil conectados. La malla incluye también una telaraña o red que tiene muchos hilos unidos o tejidos. En esta definición se contempla cualquier material útil para la separación de piezas macroscópicas de muestra sólida de la mezcla de medio de cultivo y muestra a analizar.

35 El término “medio de extracción” se refiere a un agente de extracción de analito. El medio de extracción en el dispositivo inyector de análisis es opcional dependiendo del microorganismo (gram positivo o gram negativo, es decir, con o sin membrana) o la toxina a analizar. Su función es liberar los determinantes antigénicos presentes en la muestra a analizar, de manera que sean accesibles para su posterior detección con la tira inmunocromatográfica. El medio de extracción, también denominado medio de lisis, puede estar en polvo, líquido, o forma de gel. Si es líquido, el dispositivo inyector de análisis comprende preferiblemente una válvula antirretorno, más preferiblemente situada en su punta.

Entre los ejemplos de medio de extracción se incluyen, sin limitación, tensoactivos, combinaciones enzimáticas, sulfatos u otros reactivos químicos, bioquímicos que podrían ser útiles para este objetivo.

El término “tira inmunocromatográfica” o “tira inmunocromatográfica lateral de flujo” se refiere a cualquier medio cromatográfico (por ejemplo, nitrocelulosa, acetato de celulosa, papel, nylon, celulosa, fibra de vidrio, poliéster, o cualquier otro material altamente absorbente adecuado) a través del cual una muestra líquida, sospechosa de contener un analito a detectar, puede fluir por acción capilar, y cuando la detección del analito utiliza un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente al mismo, es decir, la detección se realiza con un inmunoensayo. Esta afinidad específica se refiere a una reacción de unión que es determinativa de la presencia del analito en presencia de una población heteróloga de moléculas, tales como proteínas y otras moléculas biológicas (es decir, tales como las que se pueden hallar en la mezcla de cultivo y muestra de análisis). DE este modo, bajo condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos específicos se unen a un analito concreto y no se unen en una cantidad significativa a otros analitos presentes en la muestra.

Un “marcador” es una composición detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Entre los marcadores útiles en la presente invención se incluyen microesferas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads™.), colorantes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, Texas Red, rodamina, proteína verde fluorescente, y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ³H, ²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, o ³²P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otros utilizados habitualmente en un ELISA), y marcadores colorimétricos, tales como oro coloidal, plata, selenio, u otros metales, o vidrios coloreados o microesferas de plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.). Los medios de detección de dichos marcadores son bien conocidos por los expertos en la técnica. De este modo, por ejemplo, los radiomarcadores se pueden detectar utilizando película fotográfica o contadores por centelleo, los marcadores fluorescentes se pueden detectar utilizando un fotodetector para detectar la iluminación emitida. Los marcadores enzimáticos se detectan habitualmente mediante la disposición de la enzima con un sustrato y la detección del producto de reacción producido por la acción de la enzima en el sustrato, y los marcadores colorimétricos se detectan mediante la simple visualización del marcador coloreado.

El término “agente desactivador” se refiere a una sustancia o composición capaz de desinfectar, esterilizar, destruir, eliminar, o inertizar, microorganismos y toxinas, particularmente los patogénicos, a niveles considerados como seguros según la ordenanza de salud pública o que reducen la población microbiana o de toxinas en números significativos cuando no se han establecido los requisitos de salud pública. Preferiblemente, el agente desactivador es ecológico y presenta un amplio espectro de actividad antimicrobiana. Entre los ejemplos de agentes desactivador se incluyen, sin limitación, agentes oxidantes, tales como peróxido de hidrógeno, hipoclorito sódico (lejía), composiciones de cloro, yodo, ozono; alcoholes, tales como etanol e isopropanol; aldehídos, tales como glutaraldehído; compuestos fenólicos, tales como fenol, O-fenilfenol, cloroxilenol, o timol; compuestos de amonio cuaternario (Quats), tales como cloruro de benzalconio.

Realizaciones de la presente invención

Como se muestra en la Fig. 16, el solicitante reivindica un dispositivo portátil (1) para detectar agentes de riesgo biológico en una muestra (S) que comprende un recipiente (2) que encierra un primer alojamiento (3) lleno de un medio de cultivo para agentes de riesgo biológico, un segundo alojamiento (5) para recibir la muestra (S), una tapa (4) que se puede acoplar al recipiente (2) para cerrar dicho segundo alojamiento (5), medios para comunicar (fluidicamente) el primer (3) y el segundo alojamiento (5) que permiten obtener una muestra (S) lista para analizar y medios para detectar la presencia de agentes de riesgo biológico en la muestra (S) listos para analizar, en donde el segundo alojamiento (5) tiene una superficie de entrada comprendida entre 10 y 100 cm² y comprende una pared lateral provista de al menos un indicador visual correspondiente a un volumen de llenado predeterminado, de modo que sea posible recolectar de manera segura y fácil una macro-muestra (S), prepararla y detectar la presencia de agentes de riesgo biológico de

manera segura.

El segundo alojamiento está en la tapa (4), que preferiblemente es una placa. Esta placa permite llenarla cómodamente con la cantidad de muestra requerida, gracias al indicador visual. Permite llevar a cabo especialmente el método reivindicado.

5 En otra realización, no mostrada, el segundo alojamiento (3) está en el recipiente (2).

En cualquier forma de realización, el primer alojamiento (3) tiene un volumen comprendido entre 50 y 500 ml, y el segundo alojamiento (5) tiene un volumen comprendido entre 5 y 300 cm³, lo que permite preparar muestras de una manera que cumpla con las normativas mencionadas abajo.

10 Como se muestra en las figuras, la tapa y el recipiente comprenden dos superficies complementarias mutuamente roscadas de modo que la tapa y el recipiente se pueden acoplar atornillando.

La presente invención se refiere también a un dispositivo (1) para analizar microorganismos o toxinas, que comprende:

un recipiente (2) que encierra un volumen (3) relleno con un medio de cultivo para un microorganismo y dispuesto con una primera abertura (A1) sellada con un primer sello (S1) y una segunda abertura (A2) sellada con un segundo sello (S2);

15 una tapa (4) para cubrir dicha primera abertura (A1), definiendo dicha tapa (4) un alojamiento (5) para recibir una muestra a analizar (TS),

medios (6) para el acoplamiento estanco de forma mecánica de la tapa (4) con el recipiente (2); y

20 medios (7) para romper el primer sello (S1) de dicha primera abertura (A1) en una posición determinada (P1) del recorrido del acoplamiento entre la tapa (4) y el recipiente (2), poniendo así en contacto el medio de cultivo con la muestra a analizar.

En una realización de la presente invención, los medios (6) para el acoplamiento estanco de forma mecánica de la tapa (4) con el recipiente (2) o viceversa, comprenden dos superficies roscadas mutuamente acopladas en la tapa (4) y el recipiente (2), respectivamente.

En una realización de la presente invención, la segunda abertura (A2) es un canal (8).

25 En una realización de la presente invención, el segundo sello (S2) está colocado en una parte intermedia de la segunda abertura (A2). En una realización adicional, el segundo sello (S2) está colocado en una parte intermedia del canal (8).

En una realización de la presente invención, el recipiente (2) está provisto además de una malla (9) en el lado del volumen con respecto a dicho segundo sello (S2).

30 En una realización de la presente invención, la malla (9) está localizada entre la segunda abertura (A2) y la primera abertura (A1). En una realización adicional, la malla (9) está situada por el lado inferior del canal (8), es decir, por debajo del segundo sello (S2), el cual está colocado en una parte intermedia del canal (8), tal como se representa en la figura 3.

35 En una realización de la presente invención, el dispositivo comprende además medios de seguridad (10) para evitar que la tapa (4) o el recipiente (2) alcancen la posición determinada (P1) del recorrido de acoplamiento, siendo dichos medios de seguridad (10) extraíbles, evitando, por tanto, desperdiciar el dispositivo (1) por la rotura accidental del sello (S1) antes de su uso.

En una realización de la presente invención, los medio de seguridad (10) comprenden un cinturón de seguridad situado entre la tapa (4) y el recipiente (2).

5 En una realización de la presente invención, los medios (6) para el acoplamiento estanco de forma mecánica de la tapa (4) con el recipiente (2) son irreversibles cuando se alcanza la posición determinada (P1) del recorrido de acoplamiento entre la tapa (4) y el recipiente (2), de manera que evitan el desacoplamiento entre la tapa (4) y el recipiente (2), evitando así pérdidas del medio de cultivo o la muestra a analizar (TS) fuera del dispositivo (1) después de haber roto el sello (S1).

En una realización de la presente invención, los medios (7) para romper el primer sello (S1) de la primera abertura (A1) comprenden salientes (11) en la tapa (4) capaces de rasgar el primer sello (S1).

10 En una realización de la presente invención, el recipiente (2) está provisto además de una tercera abertura (A3) sellada con un tercer sello (S3).

15 La presente invención también se refiere a un dispositivo inyector de análisis (12) configurado para el acceso al volumen (3) del dispositivo (1) para analizar los microorganismos o toxinas anteriormente citados a través de la segunda abertura (A2) del recipiente (2) mediante la perforación del segundo sello (S2), comprendiendo dicho dispositivo inyector (12) un tubo (13) y un émbolo deslizable (14), donde el émbolo comprende un sello (15) en su parte inferior (14a) y una tira inmunocromatográfica lateral de flujo (16) en el interior a lo largo del émbolo (14).

Este dispositivo inyector de análisis (12) tiene cuatro funciones: i) perforador del sello (S2); ii) aspirador de una mezcla enriquecida de muestra y medio de cultivo opcionalmente filtrada; iii) detector y lector de un inmunoensayo.

En una realización de la presente invención, el tubo (13) del dispositivo inyector (12) comprende un medio de extracción.

20 En una realización adicional, el medio de extracción se coloca en la parte inferior del tubo (13), entre el extremo inferior del tubo (13) y el émbolo (14) deslizable.

En una realización de la presente invención, o el dispositivo (1) para el análisis de microorganismos o toxinas, o el dispositivo inyector (12), comprenden medios de seguridad (17) que cuando se liberan, permiten empujar el dispositivo inyector (12) hacia dentro de la segunda abertura (A2) y perforar el sello (S2).

25 En una realización de la presente invención, los medios de seguridad (17) tienen la forma de un cinturón de seguridad. En una realización adicional, los medios de seguridad (17) están situados alrededor del extremo exterior inmediato del dispositivo inyector (12), tal como se representa en la figura 8.

30 En una realización de la presente invención, o el dispositivo (1) para el análisis de microorganismos o toxinas, o el dispositivo inyector (12), comprenden medios de detención (18) que establecen un recorrido que permite que el émbolo (14) del dispositivo inyector (12) aspire una cantidad predeterminada de líquido.

En una realización, esta cantidad predeterminada de líquido es de 0,1 a 10 mL.

En una realización de la presente invención, los medios de detención (18) están situados en el dispositivo inyector (12).

35 En una realización adicional, los medios de detención (18) está situados en el lado exterior inmediato del dispositivo inyector (12) tal como se representa en la figura 9. En una realización adicional, los medios de detención (18) comprenden una combinación de un surco longitudinal y una protuberancia que se ajusta firmemente en el surco. En una realización adicional, el surco longitudinal está situado en el tubo (13) y la protuberancia está situada en el émbolo (14).

En una realización de la presente invención, o el dispositivo (1) para el análisis de microorganismos o toxinas, o el

dispositivo inyector (12), comprenden medios de seguridad (19) que cuando se liberan, permiten empujar la tira inmunocromatográfica (16) por dentro y a lo largo del émbolo (14) y perforar el sello (15).

En una realización de la presente invención, el sello (15) está situado en el lado inferior del émbolo (14) tal como se representa en la figura 7.

5 En una realización de la presente invención, los medios de seguridad (19) están situados en la parte superior del émbolo (14).

En una realización, los medios de seguridad (19) están situados en la parte superior de la tira inmunocromatográfica (16), tal como se representa en la figura 10. En una realización de la presente invención, los medios de seguridad (19) se pueden liberar dándoles la vuelta tal como se representa en la figura 11. En una realización, los medios de seguridad (19) son un botón giratorio de seguridad tal como se representa en la figura 11.

En una realización de la presente invención, o el dispositivo (1) para el análisis de microorganismos o toxinas, o el dispositivo inyector (12), comprenden medios de detención (20) que establecen una distancia máxima de inyección del émbolo, evitando, por lo tanto, desperdiciar la tira inmunocromatográfica (16) por el contacto accidental de dicha tira con la muestra a analizar antes de su uso.

15 En una realización de la presente invención, los medios de detención (20) están situados en el dispositivo (1). En una realización adicional, los medios de detención (20) son una o más protuberancias o piezas laterales situadas alrededor del dispositivo inyector (12).

En una realización de la presente invención, o el dispositivo (1) para el análisis de microorganismos o toxinas, o el dispositivo inyector (12), comprenden medios de detención (21) que establecen un recorrido máximo, evitando, por tanto, la extracción del dispositivo inyector (12) o de cualquier componente del mismo fuera del dispositivo (1).

En una realización de la presente invención, los medios de detención (21) están situados en el dispositivo (1). En una realización adicional, los medios de detención (21) son una o más protuberancias o piezas laterales situadas alrededor del dispositivo inyector (12).

La presente invención se refiere además a un dispositivo inyector desactivador (22) configurado para el acceso al volumen (3) del dispositivo (1) a través de la tercera abertura (A3) del recipiente (2) mediante la perforación del tercer sello (3), comprendiendo dicho dispositivo inyector (22) un tubo (23) y un émbolo deslizante (24), donde el tubo comprende un sello (25) en su parte inferior (23a) y un agente desactivador, y el émbolo (24) tiene un extremo puntiagudo.

En una realización de la presente invención, o el dispositivo (1) para el análisis de microorganismos o toxinas, o el dispositivo inyector desactivador (22), comprenden medios de seguridad (26) que cuando se liberan, permiten empujar el dispositivo inyector (22) hacia dentro de la tercera abertura (A3) y perforar el sello (S3).

En una realización de la presente invención, los medios de seguridad (26) tienen la forma de un cinturón de seguridad. En una realización adicional, los medios de seguridad (26) están situados alrededor de la parte exterior inmediata del dispositivo inyector desactivador (22), tal como se representa en la figura 14.

35 En una realización de la presente invención, o el dispositivo (1) para el análisis de microorganismos o toxinas, o el dispositivo inyector desactivador (22), comprenden medios de detención (27) que establecen un recorrido máximo, evitando, por tanto, la extracción del dispositivo inyector (22) o de cualquier componente del mismo fuera del dispositivo (1).

En una realización de la presente invención, los medios de detención (27) están situados en el dispositivo (1). En una realización adicional, los medios de detención (27) son una o más protuberancias o piezas laterales situadas alrededor del dispositivo inyector desactivador (22).

5 Procedimiento para enriquecer, alicuotar o analizar microorganismos o toxinas utilizando el dispositivo (1), el dispositivo inyector de análisis (12), y opcionalmente el dispositivo inyector desactivador (22)

10 Se coloca una muestra a analizar (TS) en el alojamiento (5) de la tapa (4), cuya tapa (4) se acopla firmemente de manera mecánica al recipiente (2) con la ayuda de medios (6). Mientras se acopla la tapa al recipiente o viceversa, cuando se alcanza una posición determinada (P1), el primer sello (S1) se rompe con la ayuda de medios (7), poniendo así en contacto el medio de cultivo con la muestra a analizar. El dispositivo (1) se cierra herméticamente y encierra la muestra a analizar y el medio de cultivo, que empiezan a mezclarse.

En una realización, el acoplamiento de la tapa al recipiente o viceversa se convierte en una acción irreversible una vez se alcanza la posición determinada del recorrido de acoplamiento, evitando así que la tapa y el recipiente pueden estar posteriormente no acopladas, evitando además la fuga del medio de cultivo, muestra a analizar, y mezclas de los mismos, fuera del dispositivo después de que se haya roto el primer sello.

15 Una vez se coloca la muestra a analizar en el alojamiento de la tapa y antes de alcanzar la posición (P1), es preferible situar el dispositivo de manera que la tapa se halle por el lado superior del dispositivo y no por el lado inferior (al revés con respecto a la posición del dispositivo de la figura 1). Con esta posición, se realiza el posterior acoplamiento de la tapa y el recipiente y tiene lugar la rotura del primer sello, evitando así que cualquier componente interior salga por gravedad del dispositivo.

20 En una realización, el dispositivo comprende medios de seguridad (10), por ejemplo, un cinturón de seguridad, que se extrae antes del acoplamiento de la tapa con el recipiente o viceversa. Si los medios de seguridad (10) están presentes y no se extraen, el recorrido del acoplamiento entre la tapa y el recipiente no alcanza la posición (P1).

25 Cuando se extraen estos medios de seguridad (10), el recorrido de acoplamiento entre la tapa y el recipiente puede alcanzar la posición (P1) en la cual el primer sello (S1) se rompe y esta acción está prevista que se realice cuando el alojamiento de la tapa comprende la muestra de análisis a analizar.

30 Una vez la muestra a analizar se encuentra en el dispositivo, y se rompe el primer sello, la muestra a analizar entra en contacto con el medio de cultivo. El dispositivo (1) se somete a continuación a condiciones de incubación adecuadas para enriquecer la muestra a analizar con los microorganismos o toxinas de interés, es decir, aquellos o aquellas a detectar. En una realización, estas condiciones de incubación duran de 30 minutos a 48 horas, preferiblemente de 10 a 24 horas, más preferiblemente alrededor de 20 horas. En una realización, estas condiciones de incubación comprenden calentar el dispositivo (1) a una temperatura adecuada para permitir el crecimiento y enriquecimiento de la mezcla con el microorganismo o toxina de interés. De manera adecuada, esta temperatura varía desde 0°C hasta 40°C, de manera más adecuada entre 20°C y 40°C, incluso de manera más adecuada alrededor de 37°C. El calentamiento se puede llevar a cabo en cualquier dispositivo de calentamiento.

35 Es conocido por un experto en la materia que la cantidad de tiempo y temperatura de incubación depende del tipo de microorganismo o toxina con los que se va enriquecer la mezcla.

En una realización de la presente invención, el dispositivo comprende adicionalmente una malla (9). En el espacio entre la malla y el segundo sello (S2), se confina una representación filtrada fina de la mezcla de cultivo y muestra, siendo esta mezcla la que se ensaya o analiza posteriormente.

La siguiente acción es empujar el dispositivo inyector de análisis (12) hacia dentro de la segunda abertura (A2) mediante la perforación del segundo sello (S2) del dispositivo (1). Así, el dispositivo inyector de análisis accede al volumen interior (3) del recipiente (2).

5 En una realización, antes de empujar el dispositivo inyector de análisis (12) en el dispositivo (1), se liberan los medios de seguridad, permitiendo entonces la acción de empuje y la perforación del segundo sello (S2). Estos medios de seguridad pueden tener, por ejemplo, la forma de un cinturón de seguridad.

En una realización, el dispositivo (1) o el dispositivo inyector (12) comprende medios de detención que evitan un empuje del dispositivo inyector demasiado profundo en el volumen del recipiente del dispositivo (1), de manera que el dispositivo inyector empujado no perfora la malla.

10 En una realización, el dispositivo (1) o el dispositivo inyector (12) comprende medios de detención (20) que establecen una distancia máxima de inyección del émbolo, evitando por tanto desperdiciar la tira inmunocromatográfica por el contacto accidental de dicha tira con la muestra a analizar antes de su uso.

Una vez el dispositivo inyector de análisis accede al volumen interior del dispositivo, la parte extrema del dispositivo inyector de análisis, preferiblemente una punta, se encuentra en el espacio entre la malla (9) y el segundo sello (S2) tal como se representa en la figura 3, donde se confina una representación filtrada de la mezcla de cultivo y muestra.

15 El émbolo (14) del dispositivo inyector se empuja a continuación hacia arriba, aspirando una cantidad predeterminada de la mezcla de muestra y cultivo filtrada. En una realización, se tira del émbolo tanto como permitan los medios de detención (18). Mediante la configuración de los medios de detención (18) en una posición específica en el recorrido de la extracción, se alcuota la cantidad requerida o predeterminada de mezcla de cultivo y muestra.

20 En una realización, el dispositivo inyector (12) comprende un medio de extracción, preferiblemente situado en la parte inferior del tubo (13) cerca de la punta. De este modo, cuando el émbolo aspira la mezcla de cultivo y muestra filtrada, pone en contacto esta mezcla con el medio de extracción.

Preferiblemente, la mezcla de la muestra de análisis, medio de cultivo, y medio de extracción se deja sin manipular durante un tiempo conveniente, de manera que los analitos de interés se vuelvan accesibles para su posterior detección.

25 A continuación, la tira inmunocromatográfica lateral de flujo (16) se empuja hacia abajo por dentro y a lo largo del émbolo (14) perforando el sello (15) y, por tanto, entrando en contacto con la mezcla que comprende los analitos detectables. Este contacto es como una acción de inmersión, donde la parte final de la tira se impregna con la solución de analitos, cuya solución empieza a moverse a lo largo de la tira por capilaridad. Los analitos en la presente invención son los determinantes antigénicos.

Con el diseño y configuración especiales del dispositivo inyector de análisis (12) de la presente invención, se elimina un compartimento o cámara; las etapas de extracción y detección se realizan en la misma cámara.

35 En una realización, los medios de seguridad (19), situados en el dispositivo (1) o en el dispositivo inyector (12), se deben liberar primero para permitir el empuje de la tira inmunocromatográfica hacia abajo por dentro y a lo largo del émbolo (14) y perforar el sello (15).

En una realización, la extracción del dispositivo inyector (12) o de cualquier componente del mismo fuera del dispositivo se evita mediante la presencia de los medios de detención (21) que establecen un recorrido máximo para la acción de extracción.

La reacción inmunológica tiene lugar donde los anticuerpos inmovilizados sobre la tira inmunocromatográfica se unen o no con los antígenos pertinentes de la muestra a analizar. Los anticuerpos se etiquetan o marcan con otra molécula que puede producir una señal medible. La señal generada por la etiqueta o el marcador puede ser un cambio de color, la producción de luz o fluorescencia, una señal de salida eléctrica u óptica o mediante un simple reconocimiento visual. En una realización, la señal es visualmente reconocible. En una realización, la señal es cuantificable.

En una realización, la lectura del resultado tiene lugar a través de un visor localizado en el exterior del dispositivo inyector. El visor es una sección transparente del dispositivo inyector que muestra las señales, preferiblemente las bandas de detección y control típicas de tiras inmunocromatográficas.

En una realización, una vez han tenido lugar las etapas de detección y lectura, la mezcla de la muestra de análisis, medio de cultivo, y opcionalmente medio de extracción, se puede empujar hacia abajo al volumen interior (3) del dispositivo (1), de manera que esta alícuota está encerrada en el mismo, o alternativamente se desactiva posteriormente.

En una realización, el recipiente (2) del dispositivo (1) está provisto además de una tercera abertura (A3) sellada con un tercer sello (S3).

En esta configuración del dispositivo (1), el dispositivo inyector desactivador (22), configurado para el acceso al volumen (3) del dispositivo (1), se empuja a continuación a través de la tercera abertura perforando el tercer sello. Durante la acción de empuje, el émbolo (24) se empuja simultáneamente por dentro del tubo (23) perforando así el sello (25) situado en la parte inferior (23a) del tubo. De este modo, el agente desactivador se pone en contacto con la mezcla enriquecida, desactivando así dicha mezcla. El dispositivo inyector desactivador (22) y el dispositivo (1) están ambos fabricados de un material resistente al agente desactivador.

Debe indicarse que el sello (25) es útil para mantener el agente desactivador confinado dentro del dispositivo inyector desactivador (22) sin salir de dicho dispositivo (22). Este sello (25) es preferiblemente útil cuando el agente desactivador está en un estado líquido.

En una realización, esta acción de empuje y perforación del dispositivo inyector desactivador (22) sólo es posible cuando se liberan los medios de seguridad (26).

En una realización, si el manipulador desea extraer el dispositivo inyector desactivador (22) o cualquiera de los componentes del mismo fuera del dispositivo (1), el dispositivo (1) también está provisto de medios de detención (2) que establecen un recorrido máximo que impide la acción.

La presente invención también se refiere a un método para enriquecer organismos o toxinas que comprenden:

colocar una muestra a analizar (TS) en el alojamiento (5) de una tapa (4) de un dispositivo (1);

acoplar firmemente de forma mecánica la tapa (4) a un recipiente (2) del mismo dispositivo (1), donde el recipiente encierra un volumen (3) relleno con un medio de cultivo para un microorganismo y provisto de una primera abertura (A1) sellada con un primer sello (S1) y una segunda abertura (A2) sellada con un segundo sello (S2); y

romper el primer sello (S1) al alcanzar una posición determinada (P1) del recorrido de acoplamiento entre la tapa (4) y el recipiente (2), poniendo así en contacto el medio de cultivo con la muestra a analizar;

someter dicho dispositivo (1) a condiciones de incubación adecuadas.

La presente invención también se refiere a un método para alicuotar microorganismos o toxinas que comprende:

colocar una muestra a analizar (TS) en el alojamiento (5) de una tapa (4) de un dispositivo (1);

acoplar firmemente de forma mecánica la tapa (4) a un recipiente (2) del mismo dispositivo (1), donde el recipiente encierra un volumen (3) relleno con un medio de cultivo para un microorganismo y provisto de una primera abertura (A1) sellada con un primer sello (S1) y una segunda abertura (A2) sellada con un segundo sello (S2); y

5 romper el primer sello (S1) al alcanzar una posición determinada (P1) del recorrido de acoplamiento entre la tapa (4) y el recipiente (2), poniendo así en contacto el medio de cultivo con la muestra a analizar;

someter dicho dispositivo (1) a condiciones de incubación adecuadas;

empujar una jeringa hacia dentro de la segunda abertura (A2), rompiendo el segundo sello (S2), y extrayendo una cantidad predeterminada de muestra a analizar.

10 La presente invención también se refiere a un método para analizar microorganismos o toxinas, que comprende:

colocar una muestra a analizar (TS) en el alojamiento (5) de una tapa (4) de un dispositivo (1);

acoplar firmemente de forma mecánica la tapa (4) a un recipiente (2) del mismo dispositivo (1), donde el recipiente encierra un volumen (3) relleno con un medio de cultivo para un microorganismo y provisto de una primera abertura (A1) sellada con un primer sello (S1) y una segunda abertura (A2) sellada con un segundo sello (S2), y donde el recipiente

15 (2) está provisto opcionalmente de una tercera abertura (A3) sellada con un tercer sello (S3); y

romper el primer sello (S1) al alcanzar una posición determinada (P1) del recorrido de acoplamiento entre la tapa (4) y el recipiente (2), poniendo así en contacto el medio de cultivo con la muestra a analizar;

someter dicho dispositivo (1) a condiciones de incubación adecuadas;

empujar un dispositivo inyector de análisis (12) hacia dentro de la segunda abertura (A2), rompiendo así el segundo
20 sello (S2), donde el dispositivo inyector de análisis (12) está configurado para el acceso al volumen (3) del dispositivo (1) según la presente invención a través de la segunda abertura (A2) del recipiente (2) mediante la perforación del segundo sello (S2), comprendiendo dicho dispositivo inyector (12) un tubo (13) y un émbolo deslizable (14), donde el émbolo comprende un sello (15) en su parte inferior (14a) y una tira inmunocromatográfica lateral de flujo (16) en el interior a lo largo del émbolo (14);

25 aspirar una cantidad predeterminada de muestra a analizar (TS) mediante el empuje del émbolo (14);

empujar la banda inmunocromatográfica lateral de flujo (16) y romper el sello (15) en la parte inferior (14a) del émbolo;

leer los resultados;

opcionalmente, empujar un dispositivo inyector desactivador (22), desactivando así los componentes interiores del dispositivo (1), donde el dispositivo inyector desactivador (22) está configurado para el acceso al volumen (3) del
30 dispositivo (1) según la presente invención a través de la tercera abertura (A3) del recipiente (2) mediante la perforación del tercer sello (3), comprendiendo dicho dispositivo inyector (22) un tubo (23) y un émbolo deslizable (24), donde el tubo comprende un sello (25) en su parte inferior (23a) y un agente desactivador, y el émbolo (24) tiene un extremo puntiagudo.

En una realización, en cualquiera de los métodos para enriquecer, alicuotar o analizar microorganismos o toxinas, el
35 recipiente (2) está provisto además de una malla (9) en el lado del volumen con respecto a dicho segundo sello (S2).

En una realización, en el método para alicuotar microorganismos o toxinas, la jeringa es el dispositivo inyector de

análisis (12).

5 En una realización, en cualquiera de los métodos para enriquecer, alicuotar o analizar microorganismos o toxinas, el dispositivo (1) comprende además medios de seguridad (10) para evitar que la tapa (4) o el recipiente (2) alcancen la posición determinada (P1) del recorrido de acoplamiento, siendo dichos medios de seguridad (10) extraíbles, evitando, por tanto, desperdiciar el dispositivo (1) por la rotura accidental del sello (S1) antes de su uso.

10 En una realización, en cualquiera de los métodos para enriquecer, alicuotar o analizar microorganismos o toxinas, los medios (6) para el acoplamiento estanco de forma mecánica de la tapa (4) con el recipiente (2) son irreversibles cuando se alcanza la posición determinada (P1) del recorrido de acoplamiento entre la tapa (4) y el recipiente (2), de manera que evitan el desacoplamiento entre la tapa (4) y el recipiente (2), evitando así la fuga del medio de cultivo o la muestra a analizar (TS) fuera del dispositivo (1) después de haber roto el sello (S1).

En una realización, en cualquiera de los métodos para enriquecer, alicuotar o analizar microorganismos o toxinas, los medios (7) para romper el primer sello (S1) de la primera abertura (A1) comprenden salientes (11) en la tapa (4) capaces de rasgar el primer sello (S1).

15 En una realización, en cualquiera de los métodos para enriquecer, alicuotar o analizar microorganismos o toxinas, el tubo (13) del dispositivo inyector (12) comprende medio de extracción.

En una realización, en cualquiera de los métodos para enriquecer, alicuotar o analizar microorganismos o toxinas, el dispositivo (1) o el dispositivo (12) comprende medios de seguridad (17) que, cuando se liberan, permiten empujar el dispositivo inyector (12) hacia dentro de la segunda abertura (A2) y perforar el sello (S2).

20 En una realización, en cualquiera de los métodos para alicuotar o analizar microorganismos o toxinas, el dispositivo (1) o el dispositivo (12) comprende medios de detención (18) que establecen un recorrido que permite que el émbolo (14) del dispositivo inyector (12) aspire una cantidad predeterminada de líquido.

En una realización, en cualquiera de los métodos para alicuotar o analizar microorganismos o toxinas, el dispositivo (1) o el dispositivo (12) comprende medios de seguridad (19) que cuando se liberan, permiten empujar la tira inmunocromatográfica (16) por dentro y a lo largo del émbolo (14) y perforar el sello (15).

25 En una realización, en cualquiera de los métodos para alicuotar o analizar microorganismos o toxinas, los medios de seguridad (19) se disponen en la parte superior del émbolo (14).

30 En una realización, en cualquiera de los métodos para alicuotar o analizar microorganismos o toxinas, el dispositivo (1) o el dispositivo (12) comprende medios de detención (20) que establecen una distancia máxima de inyección del émbolo, evitando así desperdiciar la tira inmunocromatográfica (16) por el contacto accidental de dicha tira con la muestra a analizar antes de su uso.

En una realización, en cualquiera de los métodos para alicuotar o analizar microorganismos o toxinas, el dispositivo (1) o el dispositivo (12) comprende medios de detención (21) que establecen un recorrido máximo, evitando, por tanto, la extracción del dispositivo inyector (12) o de cualquier componente del mismo fuera del dispositivo (1).

35 En una realización, en cualquiera de los métodos para alicuotar o analizar microorganismos o toxinas, el dispositivo (1) o el dispositivo (22) comprende medios de seguridad (26) que cuando se liberan, permiten empujar el dispositivo inyector (22) hacia dentro de la tercera abertura (A3) y perforar el sello (S3).

En una realización, en cualquiera de los métodos para alicuotar o analizar microorganismos o toxinas, el dispositivo (1) o el dispositivo (22) comprende medios de detención (27) que establecen un recorrido máximo, evitando, por tanto, ka

extracción del dispositivo inyector (22) o de cualquier componente del mismo fuera del dispositivo (1).

Aplicaciones industriales de los dispositivos

5 Los dispositivos (1), (12), o (22) según la presente invención, en cualquiera de las realizaciones presentadas aquí, son útiles como detectores de contaminación medioambiental o en alimentos. Como tal, la presente invención se refiere a los dispositivos (1), (12), o (22) para su uso como detector de contaminación medioambiental o en alimentos, según se define en las reivindicaciones adjuntas.

El dispositivo (1) según la presente invención, en cualquiera de las realizaciones presentadas aquí, también es útil como enriquecedor o alicuotador de muestras prueba analizar. Como tal, la presente invención se refiere al dispositivo (1) para su uso como enriquecedor o alicuotador de muestras de prueba.

10 El alicuotado de muestras a analizar enriquecidas se puede realizar mediante la perforación del segundo sello y la extracción de la cantidad predeterminada de mezcla de muestra de análisis enriquecida filtrada. Dicha acción se puede realizar con una jeringa típica que puede perforar el segundo sello y aspirar el volumen predeterminado. En una realización, el dispositivo (1) comprende medios de detención que establecen un recorrido que permite que el émbolo de una aguja típica aspire una cantidad predeterminada de volumen.

15 Para cada tipo de microorganismo o toxina, se selecciona un dispositivo inyector de análisis específico (12) con una tira inmunocromatográfica apropiada y un medio de extracción apropiado, así como un dispositivo (1) específico con un medio de cultivo conveniente para seleccionar y enriquecer la muestra de prueba con el microorganismo a detectar. Opcionalmente, el dispositivo inyector desactivador (22) se puede adaptar para los microorganismos a desactivar.

20 En resumen, el dispositivo de la invención ofrece la posibilidad de detectar cualitativamente agentes de riesgo biológicos que cumplan con las regulaciones sin la necesidad de instalaciones o personal cualificado. Los dispositivos del estado de la técnica se basan en un muestreo de superficie, pero eso no permite enriquecer completamente una macro-muestra, que debe entenderse como una muestra de unos pocos gramos.

25 Este nuevo dispositivo permite detectar la presencia/ausencia de agentes de riesgo biológico en 25 g/25 ml de alimento, especialmente gracias al indicador visual incorporado en el segundo alojamiento. Los dispositivos descritos en los documentos US 6197574, WO97/03209A1, FR 2849861 A1, US 2009 0197283 A1 y EP 1712614 no permiten el enriquecimiento y el análisis de macro-muestras.

Más específicamente, el dispositivo de la invención permitirá a las pequeñas empresas cumplir con el reglamento CE N° 2073/2005 - 15 de noviembre de 2005, que establece los criterios microbiológicos aplicables a los alimentos, incluido el control cualitativo de los patógenos en la fábrica y en el producto final.

30

REIVINDICACIONES

1.- Dispositivo portátil (1) para detectar agentes de riesgo biológico en una muestra (TS), que comprende:

5 - un recipiente (2) que encierra un primer alojamiento (3) relleno con un medio de cultivo para agentes de riesgo biológico,

- un segundo alojamiento (5) para recibir la muestra (TS),

- una tapa (4) que puede ser acoplada al recipiente (2) para cerrar dicho primer alojamiento (5),

10 - medios para comunicar (fluídicamente) el primer (3) y el segundo alojamiento (5) para que se produzca una mezcla enriquecida de la muestra (TS) y los medios de cultivo, que permite obtener una muestra lista para analizar a partir de dicha mezcla enriquecida; y

- medios para detectar la presencia de agentes de riesgo biológico en la muestra lista para analizar,

caracterizado porque:

15 - el segundo alojamiento (5) está configurado y dispuesto para la deposición de la macro-muestra sólida (TS) sobre una pared inferior de la misma, y tiene una superficie de entrada mayor de 10 cm² para recibir la macro-muestra sólida (TS) a ser depositada sobre dicha pared inferior del segundo alojamiento (5), y el segundo alojamiento (5) comprende una pared lateral provista de al menos un indicador visual correspondiente a una indicación de un volumen de llenado predeterminado a ser llenado con la macro-muestra sólida (TS), garantizando así que la cantidad de muestra depositada sea apropiada para el volumen del medio de cultivo;

20 - el dispositivo portátil (1) comprende además un receptáculo confinado configurado y dispuesto para recibir y confinar una alícuota de una representación filtrada fina de dicha mezcla enriquecida, en el que dicha alícuota está predeterminada por las dimensiones del receptáculo confinado, estando configurado dicho receptáculo confinado y dispuesto para permitir la extracción y detección de dicha alícuota predeterminada, de modo que el dispositivo portátil (1) está configurado, por el hecho de comprender dicho receptáculo confinado, para detectar agentes de riesgo biológico en dicha alícuota predeterminada de dicha mezcla enriquecida de la macro-muestra sólida (TS) y de medios de cultivo confinada en dicho receptáculo confinado,

25 de modo que es posible recolectar de manera segura y fácil una macro-muestra (TS), prepararla y detectar la presencia de agentes de riesgo biológico de manera segura.

30 2.- Dispositivo portátil (1) según la reivindicación 1, en el que dicho recipiente (2) comprende una primera abertura (A1) sellada con un primer sello (S1) y una segunda abertura (A2) sellada con un segundo sello (S2), y comprende además una malla (9) ubicada entre la segunda abertura (A2) y la primera abertura (A1) o ubicada en el lado inferior de un canal (8) definido por la segunda abertura (A2), por debajo del segundo sello (S2).

3.- Dispositivo portátil (1) según la reivindicación 2, en el que dicho receptáculo confinado está definido por el espacio existente entre la malla (9) y el segundo sello (S2).

35 4.- Dispositivo portátil (1) según la reivindicación 1, en el que el segundo alojamiento (5) está en la tapa (4), y en el que la tapa (4) es una placa.

5.- Dispositivo portátil (1) según la reivindicación 1, en el que el segundo alojamiento (5) está en el recipiente (2).

6.- Dispositivo portátil (1) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el primer alojamiento (3) tiene un volumen comprendido entre 50 y 500 ml, y el segundo alojamiento (5) tiene un volumen comprendido entre 5 y 300 ml.

5 7.- Dispositivo portátil (1) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la tapa (4) y el recipiente (2) comprenden dos superficies complementarias mutuamente roscadas de modo que la tapa (4) y el recipiente (2) pueden acoplarse mediante atornillado.

8.- Dispositivo portátil (1) según la reivindicación anterior, que comprende medios para evitar el desacoplamiento de la tapa (4) cuando se alcanza una primera posición de acoplamiento determinada.

10 9.- Dispositivo portátil (1) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los medios para comunicar (fluídicamente) el primer (3) y el segundo alojamiento (5) se activan cuando se alcanza una segunda posición determinada.

10.- Dispositivo portátil (1) según la reivindicación 9 cuando depende de la reivindicación 8, en el que en el recorrido del acoplamiento de la tapa (4) al recipiente (2) se alcanza la primera posición de acoplamiento determinada antes que la segunda posición determinada, de modo que se evita el riesgo de fugas del medio de cultivo.

15 11.- Dispositivo portátil (1) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los medios para comunicar (fluídicamente) el primer (3) y el segundo alojamiento (5) comprenden un primer sello (S1) que separa el primer y el segundo alojamiento que puede rasgarse mediante elementos de corte dispuestos en la tapa (4), en donde la tapa (4) comprende una pared perimetral exterior provista de una rosca interior y una pared perimetral interior provista de elementos de corte destinados a rasgar el primer sello (S1), estando dicho segundo alojamiento (5) encerrado por dicha pared perimetral interior.

20 12.- Dispositivo portátil (1) según la reivindicación 9, en el que los medios para comunicar (fluídicamente) el primer (3) y el segundo alojamiento (5) comprenden una válvula que se abre automáticamente cuando se alcanza la segunda posición determinada o en donde los medios para comunicar (fluídicamente) el primer (3) y el segundo alojamiento (5) comprenden una válvula o primer sello (S1) con un elemento de apertura que puede activarse manualmente, bloqueándose dicho elemento de apertura hasta que se alcanza la segunda posición determinada.

25 13.- Dispositivo portátil (1) según la reivindicación 9, que comprende medios de inertización encerrados en un tercer alojamiento y medios para evitar que los medios de inertización se activen hasta que se haya alcanzado la segunda posición.

30 14. Método para detectar agentes de riesgo biológico en una muestra (TS) utilizando un dispositivo portátil (1) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13,

dicho método comprende los pasos de:

llenar el segundo alojamiento (5) depositando sobre él una macro-muestra sólida (TS) a través de la superficie de entrada, hasta que se alcance el indicador visual correspondiente a un volumen de llenado predeterminado;

cerrar el segundo alojamiento (5) con la tapa (4);

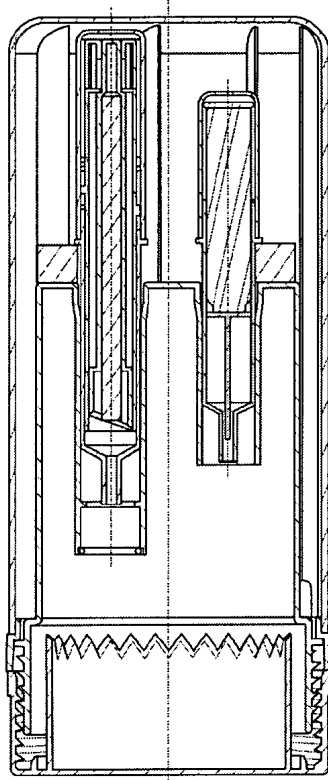
35 activar los medios para comunicar (fluídicamente) el primer (3) y el segundo alojamiento (5);

después de que haya transcurrido un tiempo mínimo de cultivo, de modo que la macro-muestra sólida (TS) esté lista para analizar, activar los medios para detectar la presencia de agentes de riesgo biológico en una alícuota

predeterminada de una representación filtrada fina de una mezcla enriquecida de la macro-muestra sólida (TS) lista para analizar y confinada en dicho receptáculo confinado;

de modo que es posible recolectar de manera segura y fácil una macro-muestra (TS), prepararla y detectar la presencia de agentes de riesgo biológico de manera segura.

Fig. 1



SECCIÓN A-A

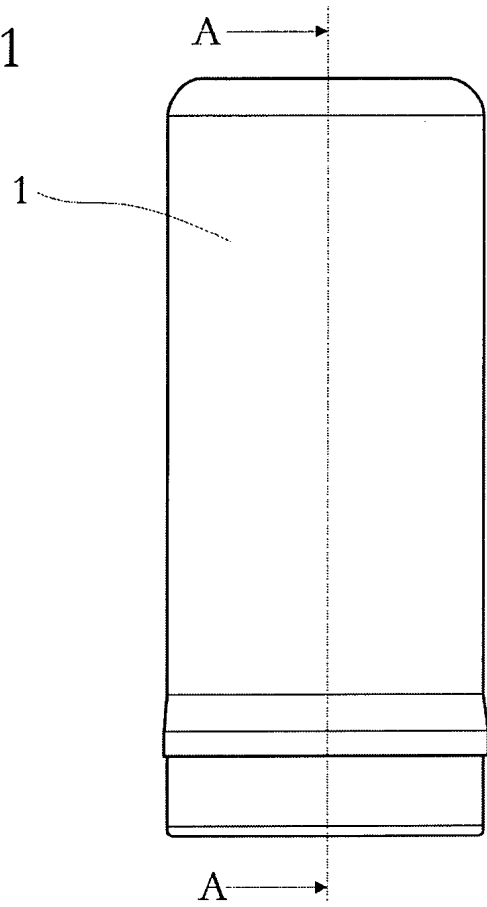
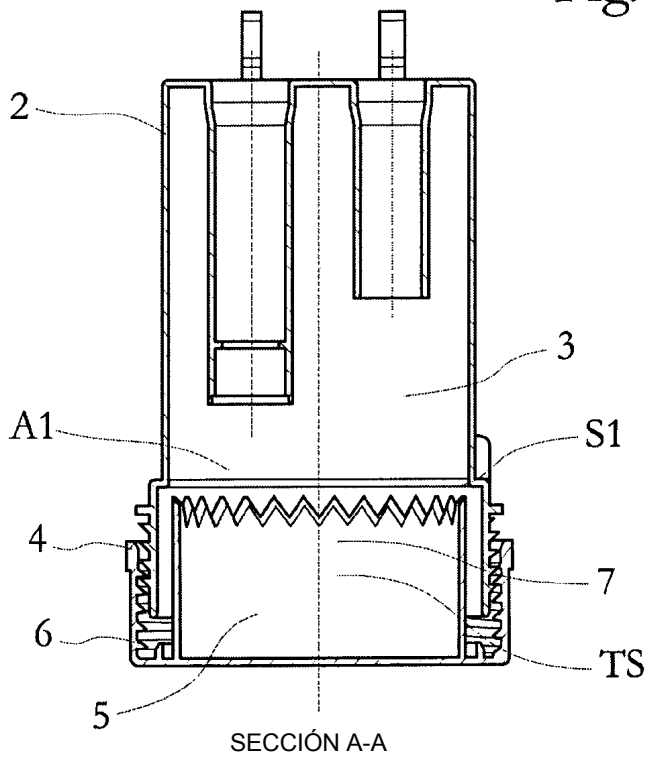


Fig. 2



SECCIÓN A-A

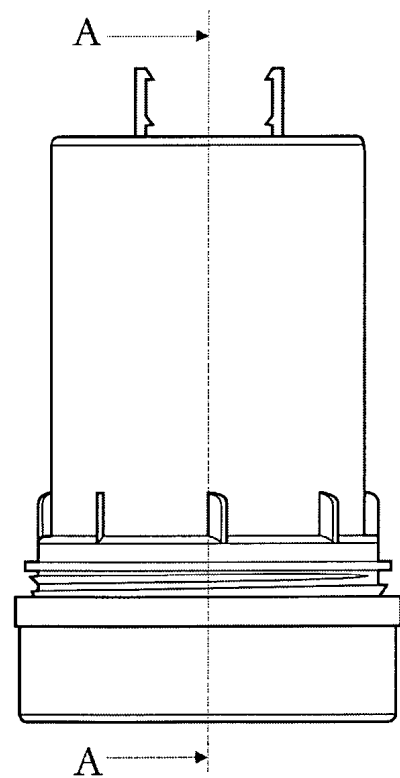


Fig. 3

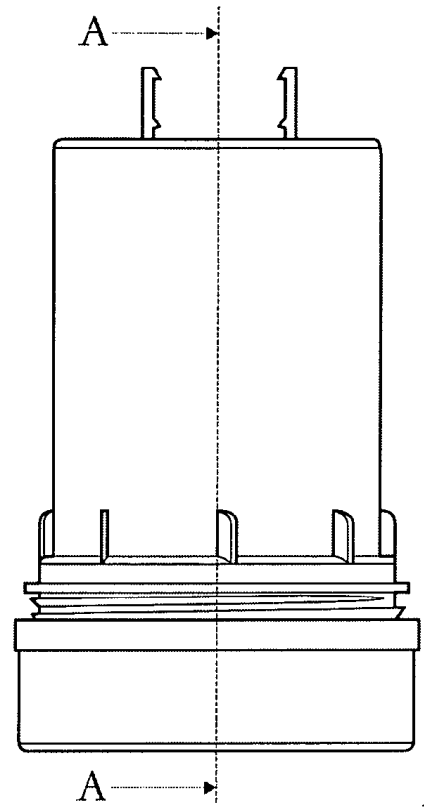
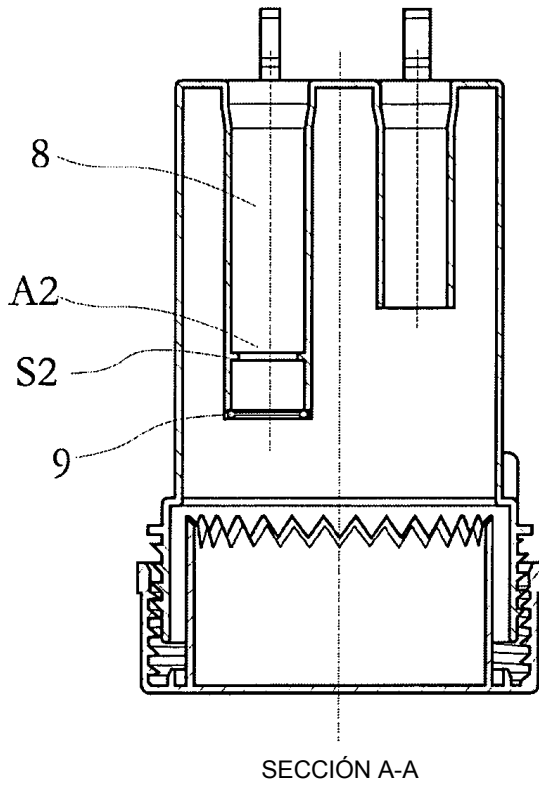


Fig. 4

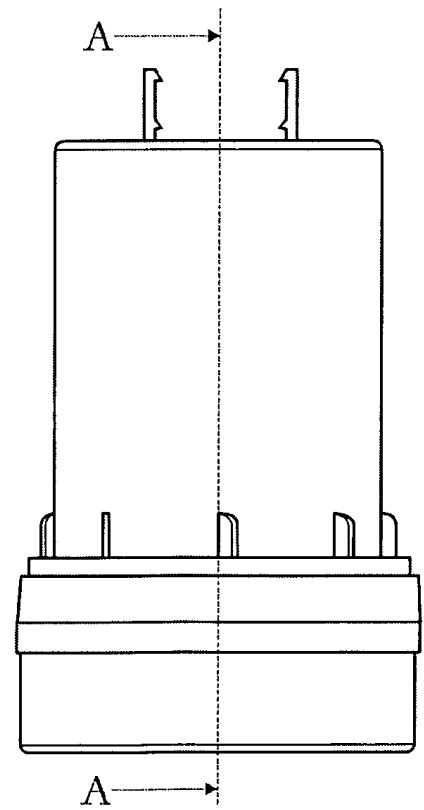
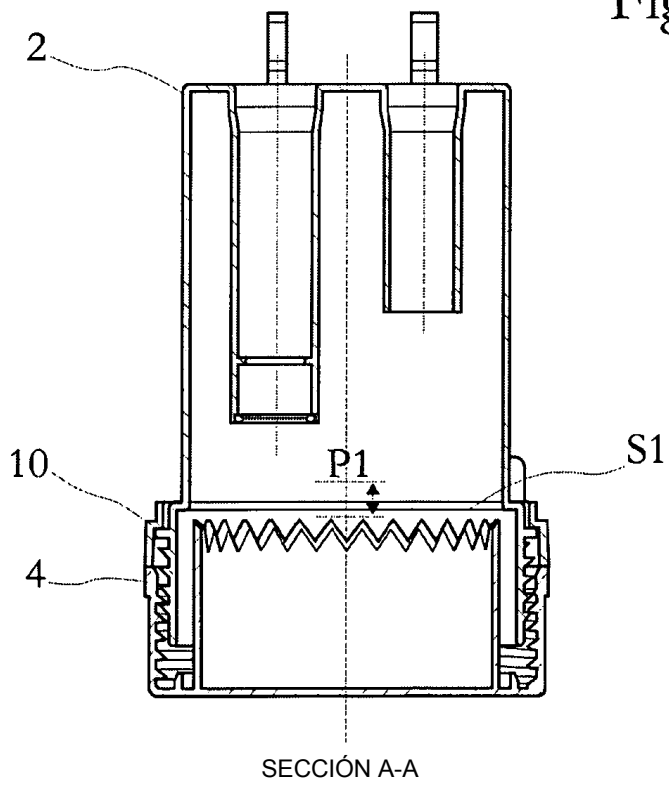


Fig. 5

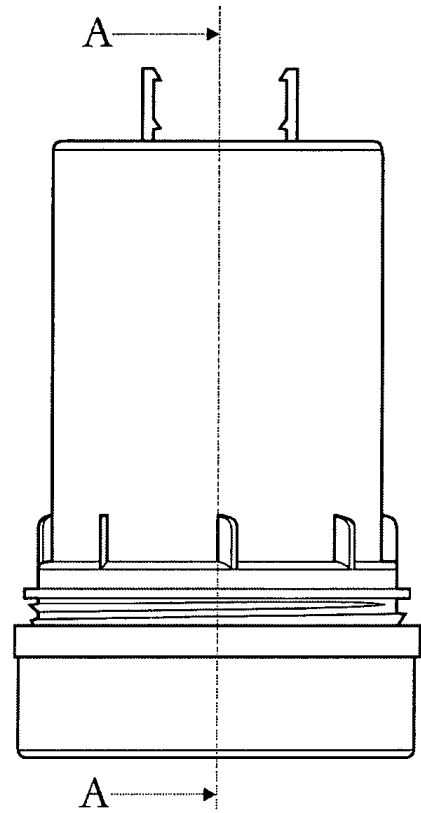
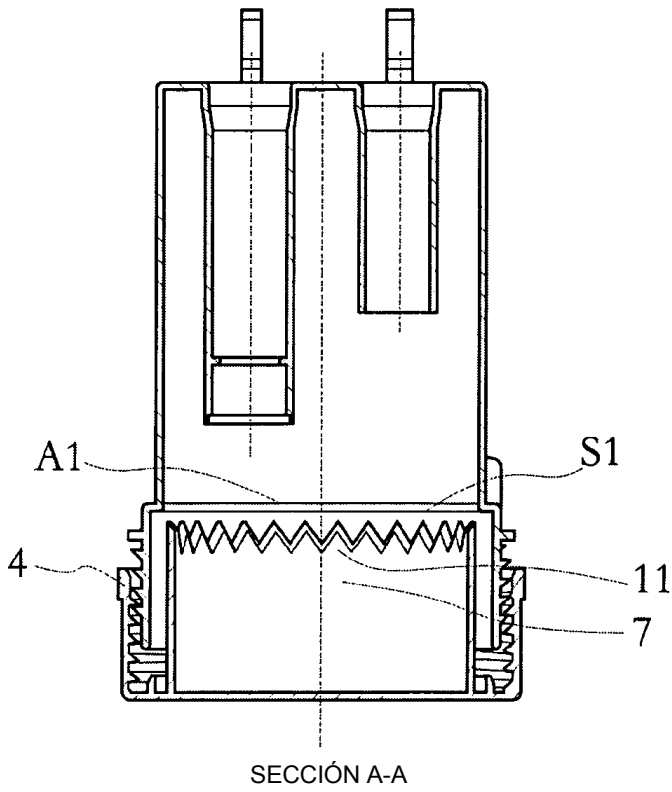


Fig. 6

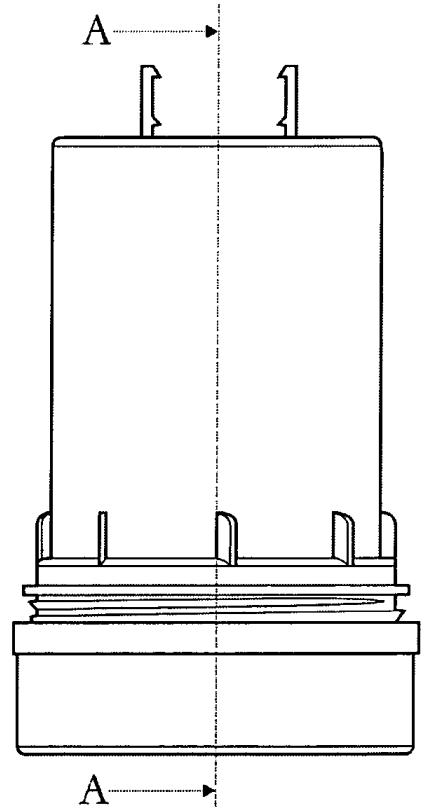
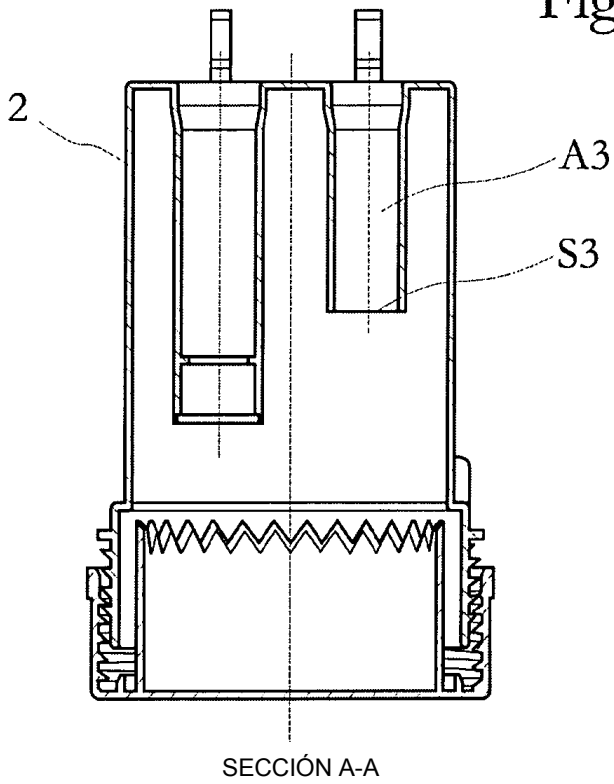


Fig. 7

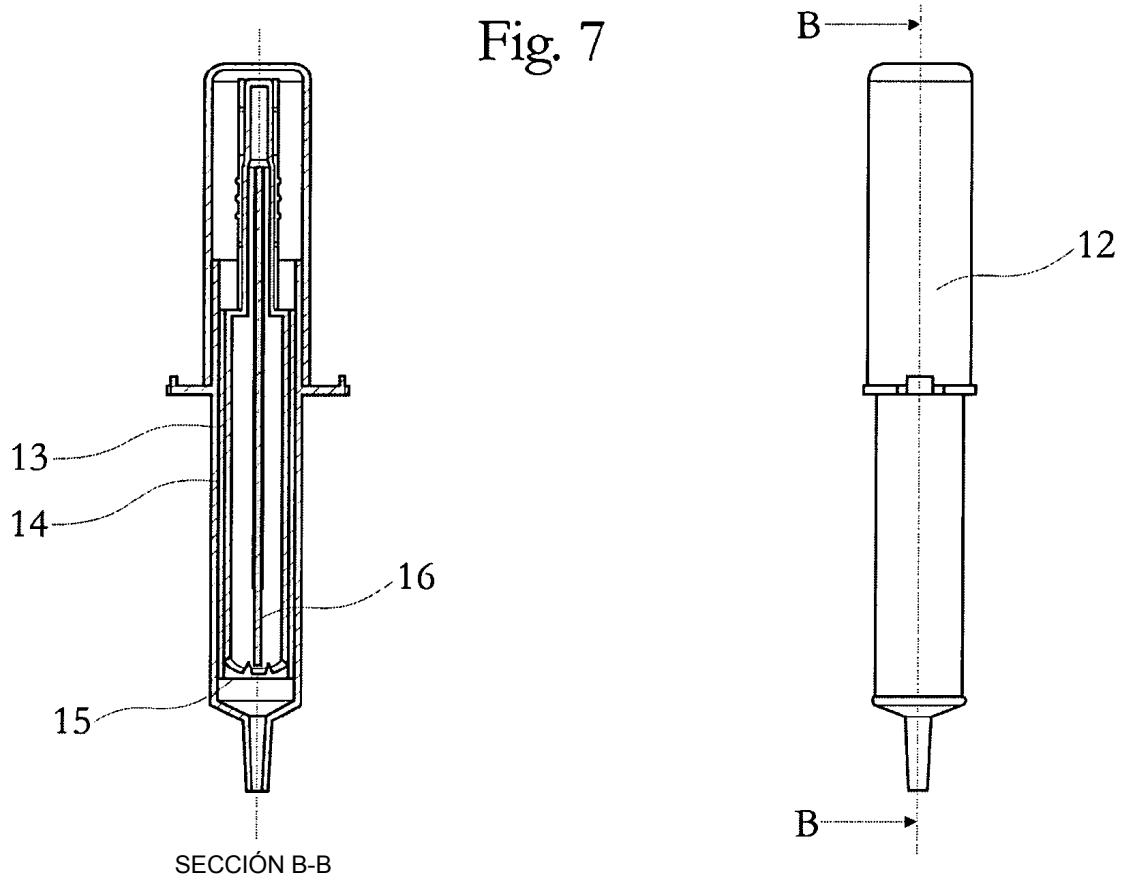
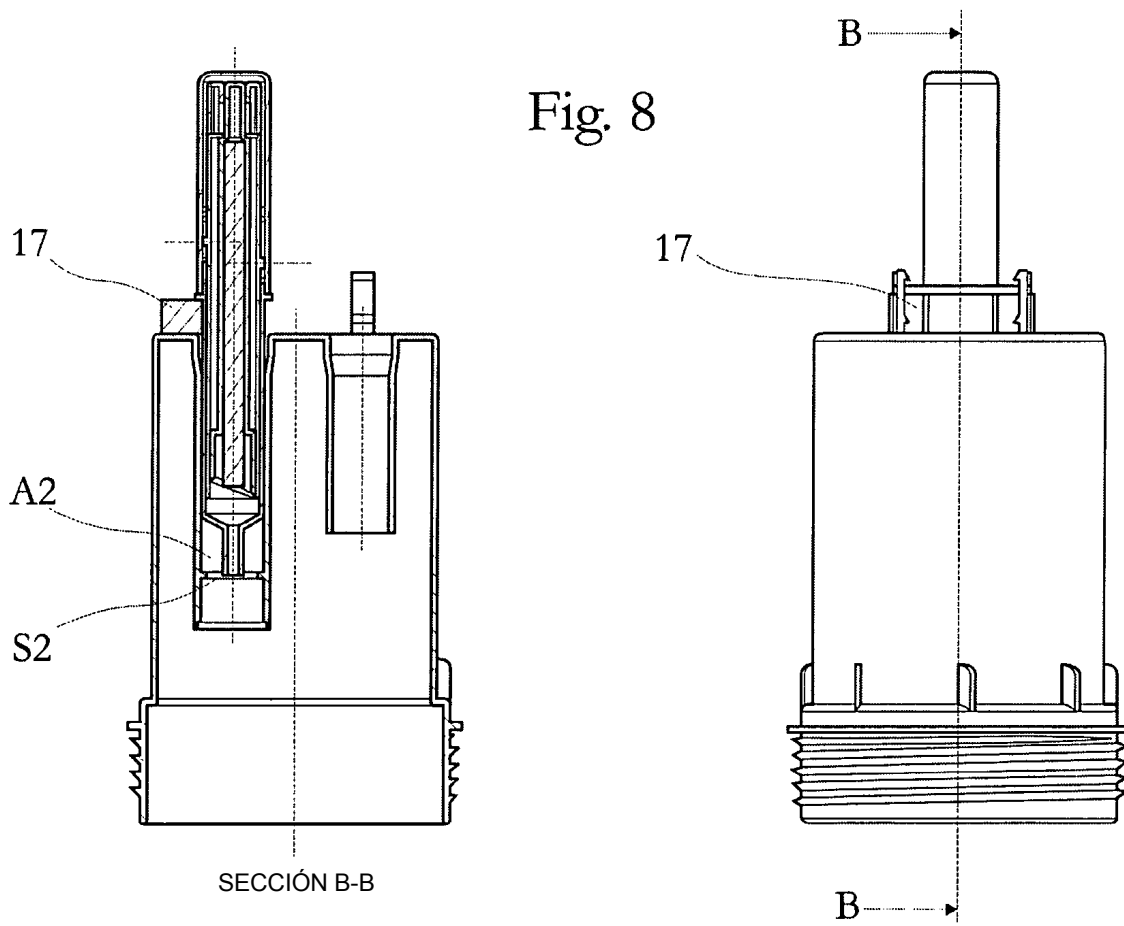


Fig. 8



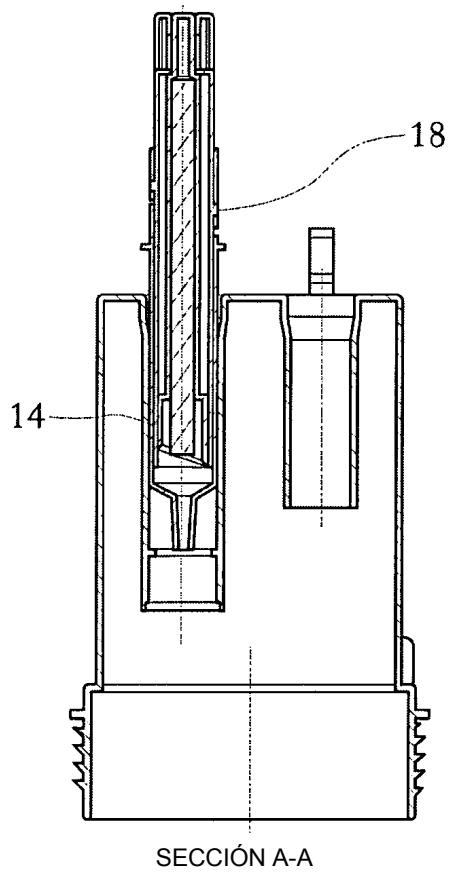


Fig. 9

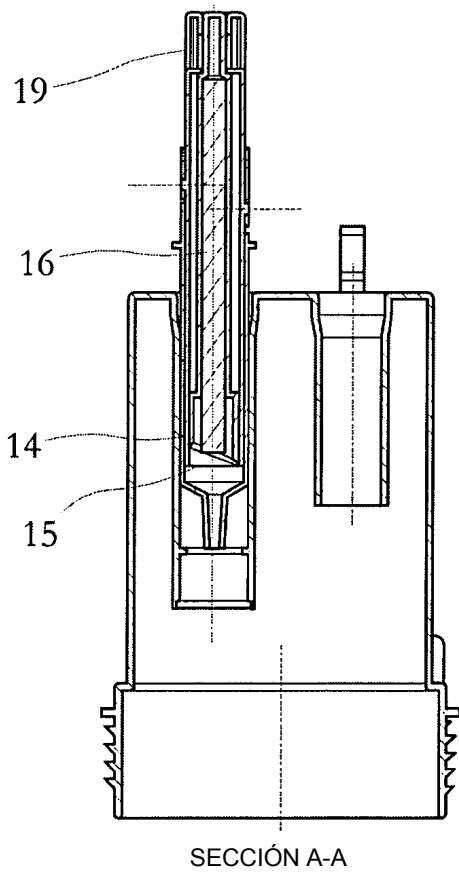
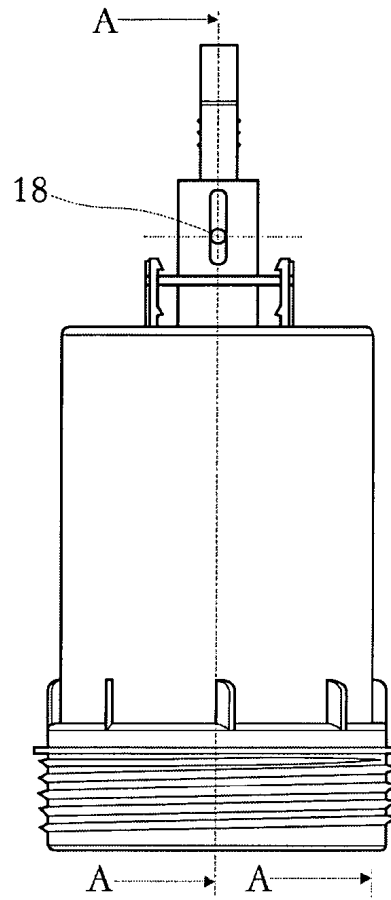


Fig. 10

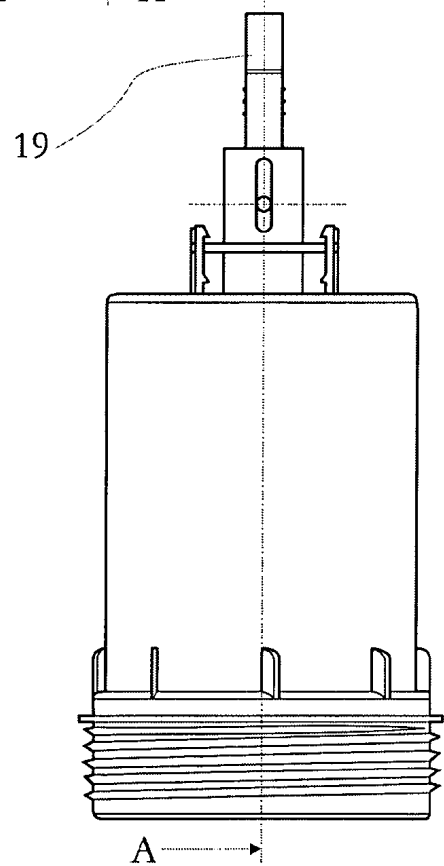


Fig. 11

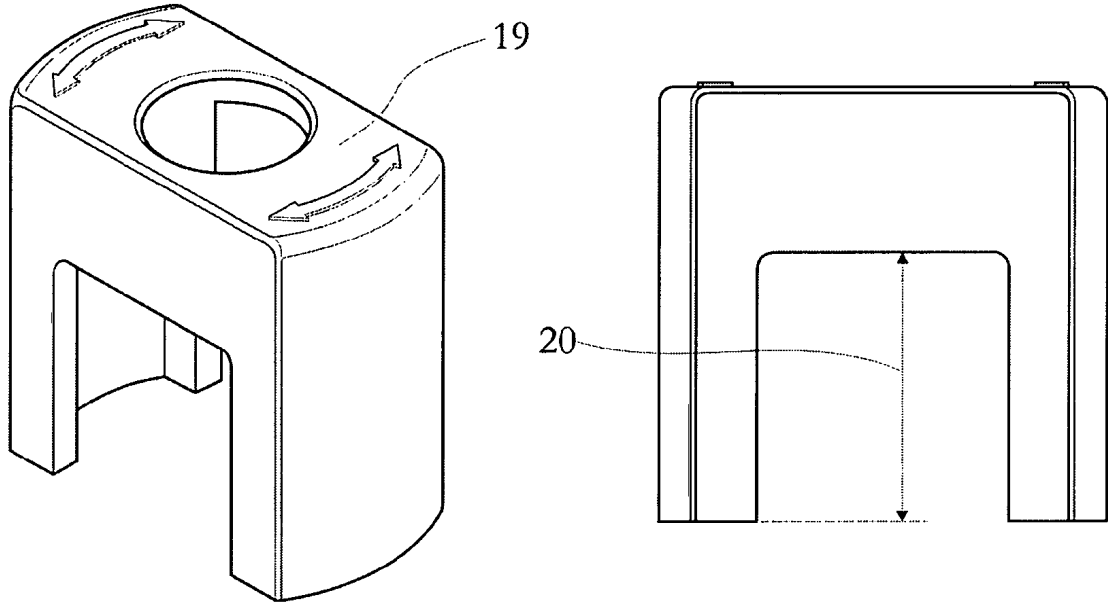


Fig. 12

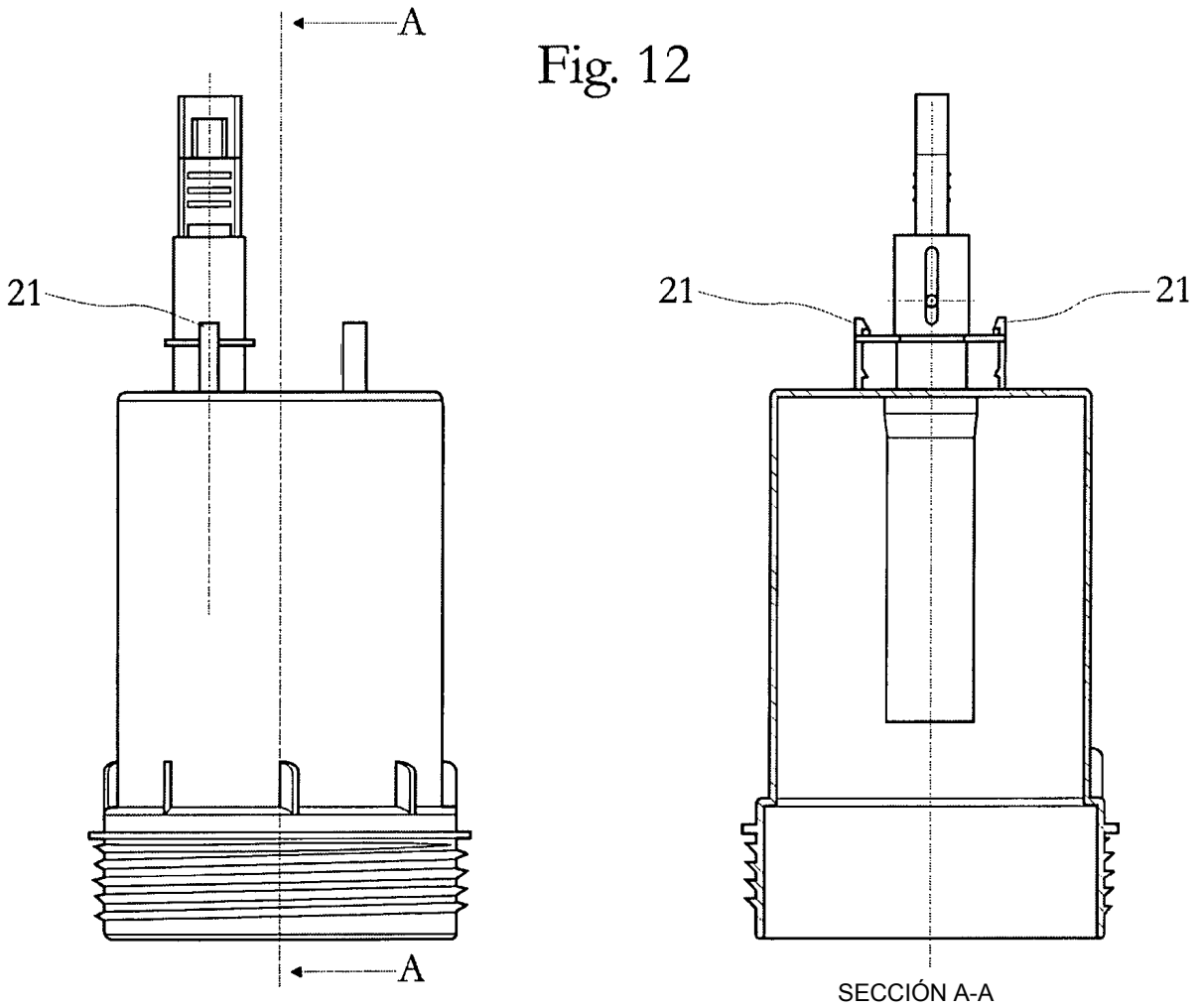


Fig. 13

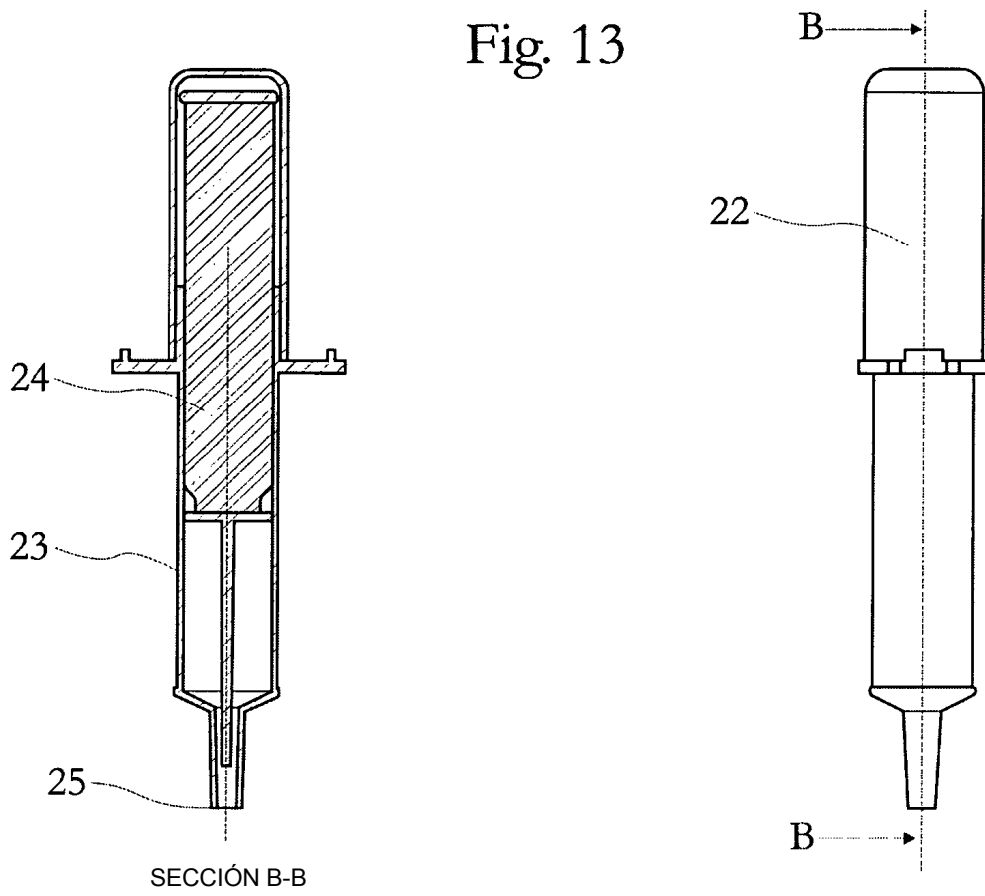


Fig. 14

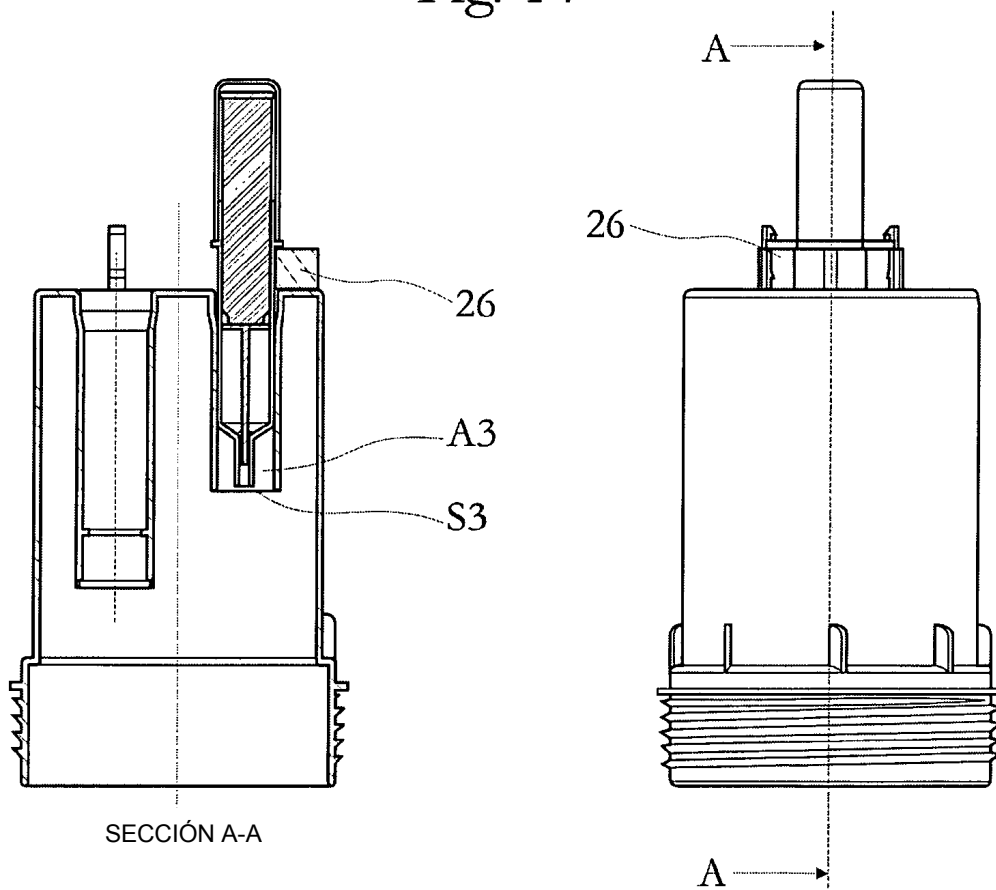


Fig. 15

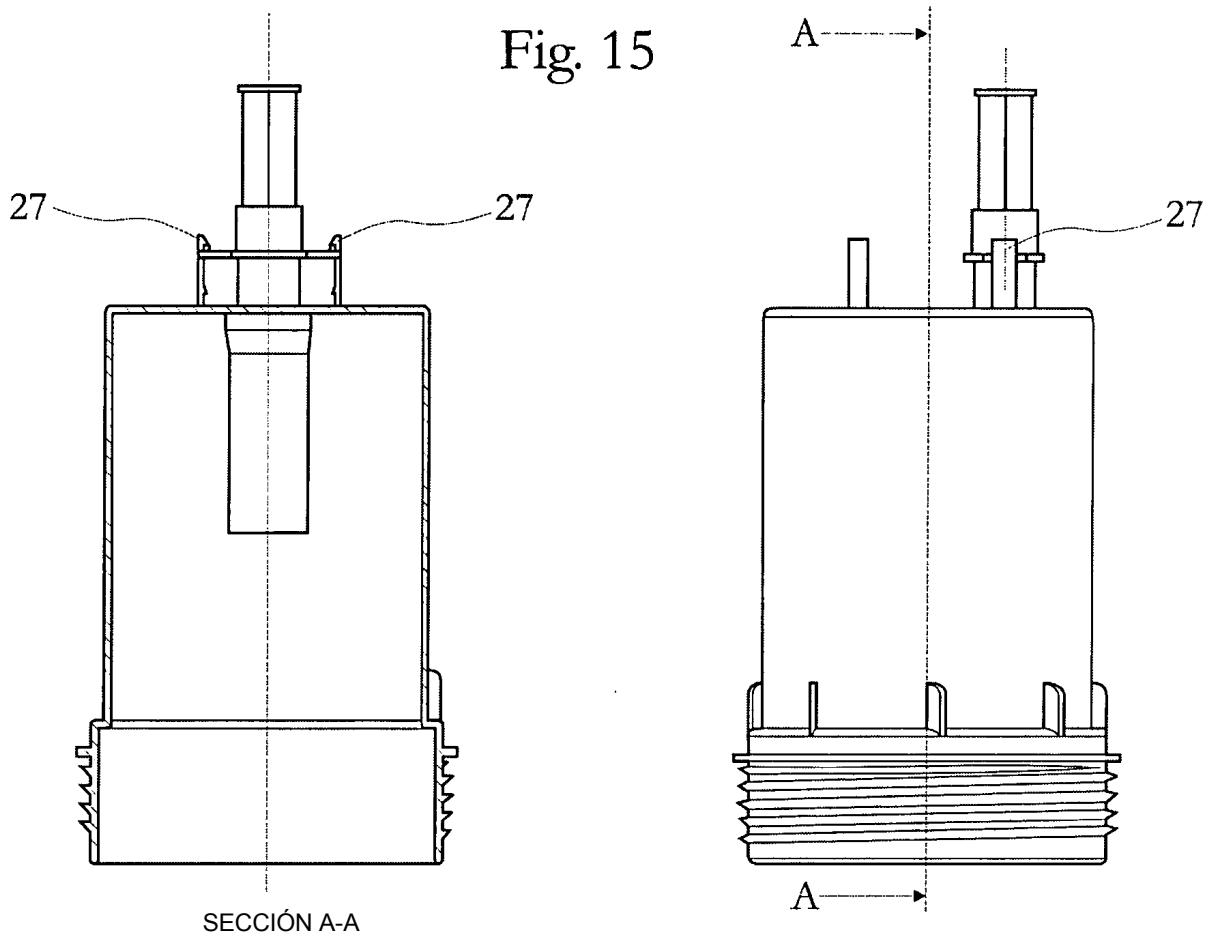


Fig. 16

