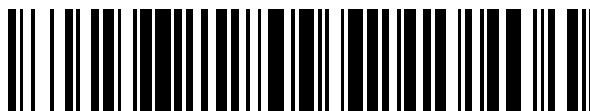


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 785 973**

51 Int. Cl.:

C12M 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2012 E 18150586 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2020 EP 3327110**

54 Título: **Casete para ensayos de esterilidad**

30 Prioridad:

07.11.2011 US 201161556390 P
16.04.2012 US 201261624499 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.10.2020

73 Titular/es:

RAPID MICRO BIOSYSTEMS, INC. (100.0%)
1001 Pawtucket Blvd. West
Lowell, MA 01854, US

72 Inventor/es:

AVILES, ROBERT, C.;
MICHAUD, DEVIN, T. y
BROWNE, DOUGLAS, J.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 785 973 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

Casete para ensayos de esterilidad

5 Referencia cruzada de aplicaciones relacionadas

Esta es una solicitud de beneficio de las solicitudes provisionales de los EE.UU. N.º 61/556.390, presentada el 7 de noviembre de 2011 y la 61/624.499, presentada el 16 de abril de 2012.

10 Antecedentes de la invención

La invención se refiere a los campos de crecimiento y detección celular.

15 En muchas industrias, particularmente en las industrias alimentaria, de bebidas, salud, electrónica y farmacéutica, resulta esencial analizar rápidamente las muestras respecto al grado de contaminación por microorganismos, tales como bacterias, levaduras o mohos.

Una técnica de cultivo microbiano, llamada enumeración microbiana o recuento de colonias, cuantifica el número de células microbianas de una muestra. El método de enumeración microbiana, que se basa en la replicación microbiana *in situ*, produce en general una "colonia" visualmente detectable para cada célula microbiana o grupo de células cultivable de la muestra, denominada unidad formadora de colonias o CFU. Por tanto, contar las colonias visibles permite a los microbiólogos determinar con precisión el número de CFU microbianas de una muestra. Para realizar la enumeración microbiana, las células bacterianas pueden ser dispersadas en la superficie del agar nutritivo en placas de Petri ("placas de agar") y se pueden incubar en condiciones que permitan la replicación bacteriana *in situ*. La enumeración microbiana es simple, ultrasensible, económica y cuantitativa, pero también es típicamente lenta. El largo tiempo requerido da como resultado un aumento de los costos del cuidado de la salud y de la fabricación.

En relación con documentos de la técnica anterior, el documento US 2007/212747 A1 describe dispositivos para cultivar células y métodos para usar estos dispositivos. Un dispositivo es un casete que, por ejemplo, ha sido mejorado con características para controlar la horizontalidad de la superficie, imágenes ópticas, deshidratación controlada de medios nutrientes semisólidos, intercambio controlado de partículas y de aire y manejo automatizado. Como otro documento de la técnica anterior, el documento US 5.843.766 A1 describe una cámara de cultivo tisular que incluye una envuelta que comprende un sustrato dentro de la envuelta diseñada para facilitar el crecimiento tridimensional del tejido en la superficie del sustrato. La envuelta incluye una entrada y un puerto de salida que ayudan a la entrada y salida de medios, así como al menos un distribuidor de flujo. Finalmente, el documento US 6.287.849 B1 describe un dispositivo que incluye un filtro y unos medios deshidratados, en donde se puede filtrar una muestra dentro del dispositivo, en cuyo punto el medio deshidratado se reconstituye y contacta con el filtro para el crecimiento de microorganismos, con una entrada que está situada en el medio de la tapa.

40 Existe una necesidad de dispositivos y métodos de cultivo adicionales para la enumeración microbiana.

Compendio de la invención

La invención proporciona un método para un ensayo de esterilidad de bucle cerrado completamente contenido de acuerdo con la reivindicación 1, que usa un dispositivo de captura celular y de cultivo celular, incluyendo el método los pasos de filtración de una muestra a través de una membrana del dispositivo, la adición de medios nutrientes para dar soporte al crecimiento celular y formar la imagen del dispositivo, sin exponer la muestra u otro componente interno a unos posibles contaminantes externos. Además, la invención proporciona un uso de un dispositivo de captura celular y cultivo celular en un ensayo de esterilidad de bucle cerrado completamente contenido de acuerdo con la reivindicación 6, comprendiendo el dispositivo una envuelta que contiene una tapa que tiene una ventana ópticamente transparente (la tapa puede ser o no ser retirable); un canal de distribución de fluido, por ejemplo, que es un canal único o que está conectado a una pluralidad de canales; un puerto para la inyección de la muestra conectado de manera fluida al canal de distribución de fluido; una base que comprende una almohadilla de medios porosa; un puerto para la inyección de medios conectado de manera fluida a la almohadilla de medios y opcionalmente una membrana dispuesta en la almohadilla de medios. La tapa se aplica a la base para formar un sello estéril; el canal de distribución de fluido está dispuesto sobre la almohadilla de medios, que es visible a través de la ventana óptica; y el fluido de muestra introducido en el canal de distribución de fluido es distribuido de manera uniforme por la almohadilla de medios, por ejemplo, a través de una pluralidad de canales. Las células del fluido de muestra pueden ser retenidas sobre la membrana y pueden ser vistas a través de la ventana óptica. Alternativamente, la almohadilla de medios puede tener una porosidad suficiente para actuar como membrana. El volumen entre la tapa y la membrana puede ser presurizable. El dispositivo puede incluir además un puerto de drenaje. Se puede incluir también un eliminador de oxígeno suficientemente capaz para hacer que el interior del dispositivo sea anaeróbico. El dispositivo puede incluir además un actuador para el eliminador de oxígeno que se activa, por ejemplo, por sobregiro de la tapa o por una lengüeta de arrastre o por una barra de empuje a la que se accede a través de una membrana situada en la parte superior del casete. El dispositivo puede incluir una válvula de alivio de presión, un indicador de oxígeno y/o un puerto de ventilación para ventilar el interior del casete conforme se introducen los líquidos. El puerto de ventilación puede

ser autosellante, por ejemplo, hasta que esté conectado a un conjunto de tubos.

Además, se describe un conjunto de tubos, que incluye un tubo que tiene un conector que tiene una aguja y está aplicado al puerto para la inyección de la muestra, al puerto para la inyección de medios, al puerto de ventilación o al puerto de drenaje. El conector puede incluir además un septo a través del que pasa la aguja y el conector puede estar aplicado al puerto para la inyección de la muestra, al puerto para la inyección de medios, al puerto de ventilación o al puerto de drenaje y sellar el puerto con el septo cuando se extraen la aguja y el tubo. Los kits pueden incluir adicionalmente un segundo y un tercer conjuntos de tubos opcionales que tienen un conector que tiene una aguja, en donde los conectores de los conjuntos de tubos son aplicados a una de la inyección de la muestra, inyección de medios, ventilación y puertos de drenaje. Los tubos para el primero, segundo y tercer conjunto opcional de tubos pueden compartir una entrada o salida común. El conector puede incluir un clip que fije el casete por salto elástico. El conjunto de tubos puede incluir además una pluralidad de tubos separados para al menos dos de: introducción de muestras, introducción de medios, drenaje y ventilación. El conector puede incluir agujas para cada tubo. Cuando uno de los tubos se utiliza para ventilar, este tubo puede incluir un filtro (por ejemplo, para impedir la liberación de bacterias o fluidos) y/o una válvula de alivio de presión.

Otras características y ventajas resultarán evidentes a partir de la descripción y las reivindicaciones siguientes.

Descripción breve de los dibujos

Las figuras 1A y 1C son vistas en despiece ordenado de casetes. La figura 1B es una sección transversal de un casete. La figura 1D es una sección transversal de una base de un casete que indica el puerto para la inyección de medios, puerto de drenaje, almohadilla de medios y canal para la distribución de medios. La figura 1E es una vista de un casete con la tapa retirada que muestra una bandeja para un eliminador de oxígeno. Según se muestra en el recuadro, la base incluye dos topes. El primero permite que la tapa selle el casete sin activar el eliminador de oxígeno. Al sobregirar la tapa hasta el segundo tope, un saliente de la tapa perfora el sello del eliminador de oxígeno. La figura 1F es un dibujo con realizaciones de tapa alternativas.

La figura 2A es una vista en despiece ordenado de una realización de un casete. La figura 2B es una sección transversal de un casete. La figura 2C es un dibujo de casetes para uso aeróbico y anaeróbico.

La figura 3A es una vista en despiece ordenado de una realización de un casete. La figura 3B es una sección transversal de un casete aeróbico. La figura 3C es una sección transversal de un casete anaeróbico. La figura 3D es un dibujo de casetes para uso aeróbico y anaeróbico.

La figura 4A es una vista en despiece ordenado de una realización de un casete. La figura 4B es una sección transversal de un casete anaeróbico.

Las figuras 5A-5B son vistas desde arriba de casetes que incluyen un canal de distribución de fluido que tiene una pista helicoidal con dos espirales.

La figura 5C es una vista desde arriba de un casete que incluye una pista exterior y una pista interior con una pluralidad de canales.

La figura 5D es una vista desde arriba de un casete que incluye una pista exterior y una pista interior con un solo canal.

La figura 6A es un dibujo de un canal de distribución de fluido que tiene una pluralidad de canales con una cubierta en su sitio. La figura 6B es un dibujo del canal de distribución de fluido con la cubierta retirada. La figura 6C es un dibujo de la cubierta.

La figura 7A es un dibujo de un canal de distribución de fluido que tiene un único canal con una cubierta en su sitio.

La figura 7B es un dibujo del canal de distribución de fluido con la cubierta retirada. La figura 7C es un dibujo de la cubierta.

La figura 8 es un dibujo de una base de casete.

La figura 9A es una representación esquemática de un conjunto de tubos. El conjunto de tubos tiene tres conectores que se aplican a los casetes y una aguja con funda de seguridad para ser usada en la entrega de muestras o de medios o en la eliminación de desechos. La figura 9B es una representación esquemática de un conjunto de tubos, cuyo septo es retenido en el casete después del uso. En este ejemplo, el conector incluye una ranura que se ajusta por salto elástico a una característica correspondiente que rodea un puerto del casete.

La figura 10A es una representación esquemática de un conjunto de tubos. El conjunto de tubos tiene tres conectores, por ejemplo, ramificaciones que terminan en clips de aguja con chaveta que se aplican a casetes y una aguja con funda de seguridad (no mostrada) para ser usada en la entrega de muestras o de medios o en la eliminación de desechos. Hay dos líneas de fluido por casete. La figura 10B es una representación esquemática de un conjunto de tubos instalado en los casetes. El clip de aguja con chaveta determina que el conjunto de tubos solamente puede ser insertado con una orientación predefinida.

La figura 11A es una representación esquemática de un conjunto de tubos. El conjunto de tubos tiene tres conectores, por ejemplo, ramificaciones que terminan en clips de aguja con chaveta que se aplican a casetes y una aguja con funda de seguridad (no mostrada) para ser usada en la entrega de muestras o medios o en la eliminación de desechos. Hay tres líneas de fluido por casete. Las líneas de ventilación que se muestran se unen a una válvula y a un filtro comunes, aunque el conjunto de tubos puede emplear una línea de ventilación separada para cada casete. La figura 11B es una representación esquemática de un conjunto de tubos instalado en los casetes. El clip de aguja con chaveta determina que el conjunto de tubo solamente puede ser insertado con una orientación predefinida.

La figura 12 ilustra una posible variación de un kit de ensayo empaquetado, con el panel de acceso transpirable retirada.

La figura 13 es una serie de micrografías que muestran el crecimiento de bacterias en un casete.

5 Las figuras no están necesariamente a escala.

Descripción detallada de la invención

10 La invención presenta un método para ensayo de esterilidad de bucle cerrado completamente contenido que usa un dispositivo de captura celular y cultivo celular, por ejemplo, dispositivos para capturar y cultivar células (por ejemplo, microorganismos o células que contienen microorganismos) y el uso de estos dispositivos. Un ejemplo es un casete que contiene medios nutrientes que pueden ser empleados en un sistema automatizado de enumeración rápida tal como el sistema Growth Direct™ (Rapid Micro Biosystems, Inc., Bedford, MA), por ejemplo, según se describe en la Publicación de los EE.UU. N.º 2003/0082516. La invención proporciona un ensayo de esterilidad, de bucle cerrado, 15 completamente contenido, que permite al usuario final filtrar muestras a través de una membrana (por ejemplo, de 0,45 µm), añadir medios nutrientes para dar soporte al crecimiento, y captar la imagen del casete, por ejemplo, con el Sistema Growth Direct™, sin exponer la muestra u otros componentes internos a una posible contaminación exterior. Los casetes pueden ser usados en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Se pueden empaquetar múltiples casetes juntos en un kit, por ejemplo, al menos un casete se configurará para ensayos aeróbicos y otro se configurará para 20 ensayos anaeróbicos. También se describe un conjunto de tubos que permiten la introducción de la muestra, los medios nutrientes y/o el drenaje del exceso de fluido. El conjunto de tubos puede permitir también la distribución uniforme de la muestra por medio de múltiples casetes.

Casetes

25 En general, un casete incluirá una tapa que tiene una ventana ópticamente transparente; un canal de distribución de fluido; un puerto para la inyección de la muestra conectado de manera fluida al canal de distribución de fluido; una base que aloja una almohadilla de medios porosa; y un puerto para la inyección de medios conectado de manera fluida a la almohadilla de medios. El puerto para la inyección de la muestra está dispuesto en general en el lado de la tapa, pero puede estar dispuesto también en la parte superior. En ciertas realizaciones, la tapa está hecha de un material ópticamente transparente. Alternativamente, la ventana ópticamente transparente está alojada dentro de un bastidor óptico. 30

35 En ciertas realizaciones, el canal de distribución de fluido incluye una pluralidad de canales. Se muestran diversas vistas de dicho casete en las figuras 1A-1F. Las figuras muestran una tapa que tiene una ventana ópticamente transparente, una base que aloja una almohadilla de medios, un puerto para la inyección de la muestra, un puerto para la inyección de medios y el canal de distribución de fluido, que incluye un canal de estabilización y una pluralidad de canales para distribución de la muestra a la almohadilla de medios. Se muestra también un puerto de drenaje y una membrana, que pueden ser o pueden no ser retirables. Típicamente, la tapa se aplica a la base para formar un sello estéril, que puede ser o puede no ser hermético. La membrana está situada en la almohadilla de medios para que sea visible a través de la ventana óptica. La figura 1F muestra tapas hechas de un material ópticamente transparente o que tienen la ventana ópticamente transparente alojada dentro de un bastidor óptico. El puerto para la inyección de la muestra está dispuesto en la parte superior de la tapa, pero puede estar dispuesto también en el lado. 40

45 Se muestran diversas vistas de un casete alternativo en las figuras 2A-2C. Las figuras muestran una tapa que tiene una ventana ópticamente transparente, una base que aloja una almohadilla de medios, un puerto para la inyección de la muestra, un puerto para la inyección de medios y el canal de distribución de fluido, que incluye un canal de estabilización y una pluralidad de canales para la distribución de la muestra a la almohadilla de medios. También se muestran un puerto de drenaje y una membrana, que pueden ser o pueden no ser retirables. Típicamente, la tapa se aplica a la base para formar un sello estéril, que puede ser o puede no ser hermético. La membrana está dispuesta en la almohadilla de medios para que sea visible a través de la ventana óptica. La figura 2C muestra tapas que tienen la ventana ópticamente transparente alojada dentro de un bastidor óptico. Alternativamente, la tapa está hecha de un material ópticamente transparente. El puerto para la inyección de la muestra está dispuesto en el lado de la tapa, pero puede estar dispuesto también en la parte superior. Este casete presenta una válvula de alivio de presión en la tapa. 50

55 Se muestran diversas vistas de otro casete en las figuras 3A-3D. Las figuras muestran una tapa que tiene una ventana ópticamente transparente, una base que aloja una almohadilla de medios, un puerto para la inyección de la muestra, un puerto para la inyección de medios y el canal de distribución de fluido, que incluye un canal de estabilización y una pluralidad de canales para la distribución de la muestra a la almohadilla de medios. Se muestra también un puerto de drenaje y una membrana, que pueden ser o pueden no ser retirables. Típicamente, la tapa se aplica a la base para formar un sello estéril, que puede ser o puede no ser hermético. La membrana está dispuesta en la almohadilla de medios para que sea visible a través de la ventana óptica. Las figuras 3B y 3C muestran versiones aeróbicas y anaeróbicas de este casete. La figura 3D muestra tapas que tienen la ventana ópticamente transparente alojada dentro de un bastidor óptico. Alternativamente, la tapa está hecha de un material ópticamente transparente. El puerto para la inyección de la muestra está dispuesto en el lado de la tapa, pero puede estar dispuesto también en la parte superior. La tapa incluye también un puerto de ventilación (figura 3D). 60 65

Los casetes pueden incluir un canal de distribución de fluido que suministra fluido a la almohadilla de medios por un solo canal. Dicho casete se muestra en las figuras 4A-4B. Las figuras muestran una tapa que tiene una ventana ópticamente transparente, una base que aloja una almohadilla de medios, un puerto para la inyección de la muestra, un puerto para la inyección de medios y el canal de distribución de fluido, que incluye un canal de estabilización para la distribución de la muestra a la almohadilla de medios. Se muestra también un puerto de drenaje y una membrana, que pueden ser o pueden no ser retirables. Típicamente, la tapa se aplica a la base para formar un sello estéril, que puede ser o puede no ser hermético. La membrana está dispuesta en la almohadilla de medios para que sea visible a través de la ventana óptica. El puerto para la inyección de la muestra está dispuesto en el lado de la tapa, pero puede estar dispuesto también en la parte superior. La tapa incluye también un puerto de ventilación.

El canal de distribución de fluido puede incluir o puede no incluir una pista helicoidal. La pista helicoidal está diseñada para reducir el exceso de turbulencia y distribuir la muestra de manera uniforme a la almohadilla de medios o a una membrana situada en la parte superior de la almohadilla de medios, por ejemplo, a través de la pluralidad de canales. Según se muestra en las figuras 5A-5C, la pista incluye típicamente dos circuitos alrededor del dispositivo, aunque se pueden emplear tres o más. Cuando está presente, una pista puede proporcionar fluido a la almohadilla de medios por medio de un solo canal o de una pluralidad de canales (figuras 5A-5D). La figura 5D muestra un casete alternativo que emplea un único canal de distribución de fluido. Según se muestra en la figura 5D, el casete incluye una superficie inclinada que rodea circunferencialmente la almohadilla de medios. El fluido fluye alrededor de la superficie inclinada y sobre la almohadilla de medios. En casetes con una pluralidad de canales que conducen a la almohadilla de medios, la pluralidad de canales puede estar formada también sobre o en una superficie circunferencial inclinada. El casete puede incluir o puede no incluir un componente que cubre el canal de distribución de fluido, con o sin una pista helicoidal o una pluralidad de canales, por ejemplo, la figura 1A-4B. Se muestra una cubierta ejemplar para una pluralidad de canales en las figuras 6A-6C. La figura 6A muestra un canal de distribución de fluido con una pluralidad de canales con la cubierta en su sitio. La figura 6B muestra el canal de distribución de fluido con una pluralidad de canales. La figura 6C muestra la cubierta de una pluralidad de canales. En las figuras 7A-7C se muestra una cubierta ejemplar para un solo canal de distribución de fluido. La figura 7A muestra un canal de distribución de fluido con un solo canal con la cubierta en su sitio. La figura 7B muestra el único canal de distribución de fluido. La figura 7C muestra la cubierta del canal único. Esta cubierta incluye un manipulador de fluidos que reduce la altura de la columna del canal de distribución de fluido cuando entra en una región circunferencial inclinada. El manipulador de fluidos puede causar también que el fluido se extienda a lo largo de la superficie que conduce a la almohadilla de medios. Los casetes pueden incluir también una posición de protección contra salpicaduras sobre el canal de distribución de fluido donde la muestra es suministrada a la almohadilla de medios. El protector contra salpicaduras puede formar parte de una cubierta o ser un componente separado. Los bordes de la almohadilla de medios y la membrana, si están presentes, están cubiertos típicamente por el canal de distribución de fluido o la cubierta o la protección contra salpicaduras para impedir que los bordes sean formados en imagen.

La almohadilla de medios está diseñada para alojar medio para el crecimiento o el mantenimiento de las células. En ciertas realizaciones, la almohadilla de medios está dimensionada para que aloje medios suficientes para el crecimiento celular durante una semana, dos semanas o más tiempo. El medio es suministrado a la almohadilla a través del puerto para la inyección de medios. El puerto para la inyección de medios está típicamente dispuesto en el lado o en el fondo de la base. El casete puede incluir también un canal para la distribución de medios conectado al puerto para la inyección de medios. El canal para la distribución de medios puede tener una pluralidad de salidas alrededor del perímetro de la almohadilla de medios para distribuir los medios a la almohadilla de medios de manera uniforme. En la figura 8 se muestra una base ejemplar con almohadilla de medios.

El medio está líquido cuando es introducido en el casete y puede permanecer líquido en la almohadilla o hacerse gel o también solidificarse dentro de la almohadilla. Los ejemplos incluyen caldo LB o agar de dextrosa Sabouraud (SDA), agar R2A, agar de tripticasa de soja (TSA), agar de recuento en placa (PCA), agar de sangre de Schaedler o medios similares sin el agente de solidificación de agar. Se puede disponer una membrana en la almohadilla de medios, por ejemplo, entre el canal de distribución de fluido y la almohadilla. La membrana tiene poros capaces de retener células de interés, pero deja pasar los fluidos. Ejemplos de tamaños de poros son 0,45 μm y 0,22 μm . La membrana puede ser separable o enteriza con la almohadilla de medios. Alternativamente, la superficie de la almohadilla de medios puede ser fabricada o tratada para producir la membrana.

El casete puede incluir o puede no incluir un eliminador de oxígeno para hacerlo anaeróbico (por ejemplo, las figuras 1E, 2A y 3A). El eliminador de oxígeno se guarda típicamente dentro del casete en una bandeja sellada o en un compartimento sellado, cuya situación exacta dentro del casete no es crítica. El sello puede ser roto, a continuación, una vez que la muestra y los medios han sido suministrados al casete. En la técnica se conocen diversos métodos para romper el sello. En una realización, el compartimento sellado está situado adyacente a un saliente de la tapa (o de la base). La tapa puede ser sobregirada para hacer que el saliente perfora el sello del eliminador (figura 1E). La actuación puede realizarse también por medio de una lengüeta de arrastre, accesible a través de una membrana o septo dispuesta en el exterior del casete (figuras 2A y 3A). Ejemplos de eliminadores de oxígeno incluyen óxido de hierro, glucosa oxidasa o agentes similares. Los casetes pueden incluir también un indicador del contenido de oxígeno interior, dispuesto en el interior del casete. En la técnica se conocen indicadores adecuados.

Los puertos de entrada y salida del casete pueden ser autosellantes, por ejemplo, septos de goma u otra válvula de cierre automático. Como se analiza a continuación, se puede proporcionar un casete sin la porción autosellante instalada antes del uso. Además del puerto para la inyección de la muestra y del puerto para la inyección de medios, un casete puede incluir un puerto de drenaje, por ejemplo, dispuesto en el fondo o en el lado de la base. El casete puede incluir o puede no incluir una válvula de alivio de presión para controlar la presión máxima dentro del casete. El volumen entre la tapa y la membrana puede ser presurizable también, por ejemplo, para impedir que el exceso de medios se acumule en la parte superior de la almohadilla o se fugue a través de una membrana. La base puede incluir también canales u otras zonas para permitir la liberación de presión durante la introducción de medios en la almohadilla.

Un casete puede ser apilado en un portador diseñado, por ejemplo, para transferir e introducir un grupo de casetes en un instrumento de formación de imagen automatizado. Tal manejo automatizado de un casete puede incluir transporte, interconexión entre el casete y el portador, posicionamiento para manejo automatizado y capacidad de transferencia robotizada. El casete puede ser diseñado también para que permita un posicionamiento mecánico reproducible, es decir, que el mismo casete pueda volver repetidamente a la misma posición para formar imágenes automatizadas.

Un casete puede incluir también características de diseño que facilitan la alineación de múltiples imágenes. Las marcas de referencia de imagen incluyen una abertura de orificio pasante sobre plástico o medios fluorescentes. Las marcas de referencia de imagen incluyen también material fluorescente impreso o en relieve en un casete. Se conocen otras marcas de referencia en la técnica.

Los materiales para la fabricación de los diversos componentes de un casete son conocidos en la técnica. Dichos materiales incluyen plásticos, polímeros, metales, cristal y cerámica. En diversas realizaciones, el casete facilita la formación de imágenes automatizadas de microcolonias microbianas autofluorescentes que contienen menos de 500 células, por ejemplo, se emplean materiales con propiedades de fluorescencia acordes con dicha detección. Un material ejemplar es K-Resin® negro (copolímero de estireno-butadieno, Chevron Phillips). El casete puede emplear también una tapa transparente que tenga propiedades de fluorescencia acordes con la detección de microcolonias microbianas autofluorescentes. Un material ejemplar para la tapa es Zeonor® 1060R (resina de policicloolefina, Zeon Chemicals LP). Se puede emplear también el cristal. Se puede emplear también una membrana porosa que tenga propiedades de fluorescencia acordes con la detección de microcolonias microbianas autofluorescentes. Las membranas pueden ser fabricadas a partir de materiales que incluyen celulosa, acetato de celulosa, poliestireno, polietileno, policarbonato, tereftalato de polietileno, poliolefina, acetato de etileno de vinilo, polipropileno, polisulfona, politetrafluoroetileno, nylon y copolímero de silicona. La elección de la membrana depende, en parte, del tipo de célula a ser cultivado (por ejemplo, microorganismos que crecen fijados a una superficie (dependientes del anclaje), microorganismos que crecen en suspensión (independientes del anclaje) o microorganismos que crecen fijados a una superficie o en suspensión), grado de permeabilidad y velocidad de transferencia de fluidos y gases. Una membrana ejemplar es una membrana de éster de celulosa mixta negra (Sartorius AG). Las porciones del casete de las que no se formarán imágenes pueden estar hechas de cualquier material adecuado, por ejemplo, acrilonitrilobutadieno-estireno o estireno-acrilonitrilo. Una almohadilla de medios ejemplar está formada a partir de polietileno sinterizado (Porex Corp) que puede proporcionar un volumen y tamaño predefinidos de poro.

Conjunto de tubos

También se describen conjuntos de tubos que permiten realizar conexiones estériles a los casetes. Un conjunto de tubos incluye al menos un conector que es aplicado a un puerto de entrada o de salida de un casete. El otro extremo del tubo está abierto, por ejemplo, para drenaje o deslizamiento en una boquilla u otra fuente de fluido o un sumidero. Alternativamente, el otro extremo puede contener un conector, por ejemplo, una aguja Luer Lock o un accesorio similar. Los conjuntos de tubos pueden ser diseñados para que suministren fluido de una fuente a múltiples casetes o entradas o para extraer fluido de múltiples casetes o salidas. Cada conjunto de tubos puede ser accionado por una bomba separada, por ejemplo, una bomba peristáltica, o múltiples conjuntos de tubos pueden ser accionados por una única bomba.

En una realización, el conector que se aplica al casete incluye una aguja rodeada por una pantalla, de manera que la punta de la aguja está separada del borde de la pantalla. La pantalla es aplicada a un puerto del casete y la aguja proporciona conectividad fluida para la entrega o eliminación de fluidos. En una realización específica mostrada en las figuras 9A-9B, el conector incluye un septo que rodea la aguja. El conector está aplicado al puerto del casete y está asegurado en su sitio. Una vez que se completa el suministro o la retirada del fluido, la aguja y el tubo pueden ser retirados dejando el septo en su sitio, sellando así el casete (figura 9B).

En otra realización mostrada en las figuras 10A-10B, el conector incluye dos líneas de fluido separadas, es decir, tubos, cada uno con su propia aguja y configurados para impedir una instalación impropia en el casete. En esta configuración, el conector se ajusta por salto elástico en su sitio, proporcionando al usuario una realimentación positiva que indica que se ha conseguido una inserción adecuada (figura 10B). Se puede aumentar el número de líneas de fluido según lo requiera el uso particular. Las figuras 11A-11B muestran un ejemplo de un conjunto de tubos que incluye tres líneas de fluido, de las que una proporciona un alivio de presión. Según se muestra, la línea de alivio de presión puede incluir una válvula de alivio de presión y un filtro. Una vez que se completa el suministro o la retirada

del fluido, se puede retirar la aguja y el tubo apretando suavemente el conector, mientras que se tira del casete para liberarlo.

5 Se pueden conseguir más accesos al casete haciendo conexiones adicionales con agujas. El conector puede ser aplicado al casete mediante cualquier mecanismo adecuado, por ejemplo, con rosca de tornillo, Luer Lock, ajuste por fricción y por ajuste elástico. Uno o más conjuntos de tubos, por ejemplo, uno de cada para suministro de muestras y medios y para la eliminación de desechos, pueden ser empaquetados también en un kit con uno o más casetes.

10 Los tubos del conjunto de tubos pueden estar hechos de cualquier material adecuado, tal como polietileno, politetrafluoroetileno y tubos flexibles Tygon®. Los conectores y agujas pueden ser fabricados a partir de metales, por ejemplo, acero inoxidable, plásticos, cerámica o sus combinaciones.

Métodos de uso

15 Los casetes y conjuntos de tubos pueden ser usados para el crecimiento o el mantenimiento de células, incluyendo la detección, enumeración, diagnóstico y respuesta terapéutica. Campos ejemplares del uso incluyen hacer ensayos con líquido, aire o muestras superficiales para la carga biológica microbiana; muestras de ensayo industrial, muestras de productos farmacéuticos estériles, muestras de productos farmacéuticos no estériles para la carga biológica microbiana; y ensayos de muestras de la carga biológica microbiana anaeróbica. Puede emplearse cualquier tipo de
20 células cultivables, incluyendo bacterias, cianobacterias, protozoos, hongos, células de mamífero, células de plantas u otras células eucariotas, junto con el casete descrito en este documento. Los casetes pueden ser usados para ensayos aeróbicos y anaeróbicos. Los casetes pueden ser empaquetados en kits estériles o ser esterilizados por el usuario final (figura 12). Los casetes serán típicamente empleados en un entorno de laboratorio usando una campana de flujo laminar o una cámara de aislamiento.

25 En un experimento típico se esteriliza el casete o se proporciona previamente esterilizado. Se introducen los fluidos previos al enjuague, medios de muestra y los fluidos después del enjuague a través del puerto para la inyección de la muestra. A la entrada al casete, los fluidos viajan a través del canal de distribución de fluidos, que puede incluir un canal de estabilización helicoidal para reducir el exceso de turbulencia, antes de pasar a través de la cara de la membrana. La introducción de estos fluidos a través de la cara de la membrana, dentro de una cámara sellada, puede causar que el aire residual, atrapado en el casete, se comprima conforme se eleva la columna de fluido, dando como resultado una barrera protectora para la parte inferior de la ventana óptica. A la terminación del muestreo y de los pasos de enjuague, se puede bombear aire adicional dentro del casete para asegurar que todos los fluidos han sido forzados a través de la membrana y/o almohadilla de medios. Esto puede causar que se presurice la cámara situada
30 sobre la membrana.

A continuación, los medios nutrientes son bombeados a la almohadilla de medios a través del puerto para la inyección de medios. Los medios son absorbidos por la almohadilla de medios y proporcionan una fuente de alimento durante un período de tiempo especificado, por ejemplo, 7 o 14 días al menos. El uso de una membrana, por ejemplo, con un tamaño de poro de 0,45 µm, combinado con la presurización de la cámara entre la tapa y la membrana puede ser usado para impedir que el exceso de medios nutrientes pase a través de la membrana.

45 Cuando un puerto de drenaje está presente, el exceso de fluido de muestra o de los medios puede ser retirado del casete a través del puerto de drenaje. Alternativamente, el exceso de fluido de muestra puede ser retirado a través del puerto para la inyección de medios. También se puede suministrar un volumen preestablecido de medios a través del puerto para la inyección de medios con gas desplazado dentro del casete que está siendo ventilado a través del puerto para la inyección de la muestra, del puerto de ventilación o de una válvula de alivio de presión. Otras configuraciones son posibles.

50 Los casetes pueden procesar grandes volúmenes de fluidos, por ejemplo, 2 litros de muestra y 2 litros de soluciones de enjuague. La cantidad exacta de fluido dependerá de la muestra.

Los casetes pueden ser esterilizados por cualquier método adecuado. La esterilización con gas, por ejemplo, con óxido de etileno, puede ser realizada presurizando el casete con el gas, reteniendo el gas durante un período de
55 tiempo predeterminado y evacuando el gas bajo un alto vacío.

En una realización, a la terminación del proceso de filtración y de la transferencia de nutrientes, el casete fue dispuesto en una incubadora, por ejemplo, dentro del sistema Growth Direct™, a una temperatura predefinida y estuvo almacenado mientras esperaba que se formaran imágenes. A intervalos predefinidos, el casete fue retirado y enviado automáticamente a una estación de formación de imágenes donde fue sometido a una luz de excitación de alta intensidad de longitudes de onda particulares. Cualquier crecimiento microbiano presente en la membrana fluorescerá naturalmente como respuesta. Una imagen de la fluorescencia fue capturada por medio de un filtro óptico y una cámara CCD y se grabaron objetos fluorescentes. Con el tiempo, las imágenes siguientes fueron capturadas y estos objetos fluorescentes fueron medidos y monitorizados para medir el crecimiento. Los que cumplían con los criterios de
60 crecimiento fueron contados como colonias. Otros objetos fluorescentes fueron caracterizados como desechos.

Un casete alojaba una membrana de filtración de éster de celulosa mixta, negra, de 0,45 micras, soportada por una almohadilla de medios hecha de perlas de polietileno sinterizado. Una muestra que contenía microorganismos mezclados fue bombeada a través del tubo Tygon® S-50-HL, por medio de una bomba peristáltica, dentro del puerto para la inyección de la muestra del casete. Durante la adición de la muestra, el tubo del puerto para la inyección de medios estuvo sellado y el tubo del puerto de drenaje estuvo abierto. Fluid D (un fluido de lavado de peptona Tween 80) fue bombeado durante la siguiente adición de muestra, seguido de la adición de aire para forzar todo el fluido a través de la membrana y presurizar la cámara superior a 0,70 kg/cm² aproximadamente (10 psi). El puerto para la inyección de la muestra fue sellado a continuación con un clip y se abrió el puerto para la inyección de medios. Se añadieron medios líquidos de Schaedler sangre a través del puerto para la inyección de medios y se bombearon a la almohadilla de medios por debajo de la membrana, para reemplazar el Fluid D de enjuague con medios de crecimiento.

A continuación, se retiró el tubo de todos los puertos y los puertos fueron sellados con parafilm. El casete fue incubado a 32,5 °C. El casete fue dispuesto manualmente en un formador de imágenes a diversos intervalos de tiempo (con incubación entre imágenes). Se proporcionaron aproximadamente 600 vatios/cm² de luz de excitación a 460–500 nm mediante LED azules modulados por filtros ópticos de paso de banda. Los filtros de paso de banda de 505–550 nm permitieron capturar la luz de emisión mediante una cámara CCD.

Para los fines de estos experimentos, la tapa fue retirada antes de que los casetes fueran dispuestos en el formador de imágenes y se reemplazaran antes de continuar la incubación. El formador de imágenes capturó nueve imágenes de mosaico en cada punto de tiempo y estas imágenes fueron unidas para mostrar el casete completo. La alineación del casete fue a estima y manual.

La serie de tiempos de la figura 13 muestra las imágenes fluorescentes de colonias en crecimiento de los microorganismos del casete. Si bien hay partículas de desechos al comienzo, solo la fluorescencia de los microorganismos en crecimiento aumenta con el tiempo. Los puntos fluorescentes crecientes pueden ser detectados como colonias en crecimiento usando algoritmos de software y pueden ser identificados cuando todavía son pequeños, en parte debido a la resolución del sistema de formación de imágenes no magnificadas. El último panel de la figura 13 muestra una imagen del casete al final del período de incubación, tomada con iluminación regular con una cámara digital. Como es visible al comparar los dos últimos paneles, hay una correspondencia uno a uno entre las colonias fluorescentes y las colonias de la imagen regular.

REIVINDICACIONES

1. Un método para un ensayo de esterilidad de bucle cerrado completamente contenido que usa un dispositivo de captura celular y de cultivo celular, en donde el método incluye los pasos de
5 filtración de una muestra a través de una membrana del dispositivo, la adición de medios nutrientes para dar soporte al crecimiento celular y formar la imagen del dispositivo, sin exponer la muestra u otros componentes internos a unos posibles contaminantes externos.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la membrana está dispuesta en una almohadilla de medios configurada para que sea visible a través de una ventana ópticamente transparente.
10
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el dispositivo comprende además un puerto de entrada y un puerto de drenaje, en donde una muestra introducida a través del puerto entrada de muestra fluye a través de la membrana al puerto de drenaje.
15
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el dispositivo comprende además un eliminador de oxígeno suficientemente capaz para hacer que el interior del dispositivo sea anaeróbico, preferentemente en donde el dispositivo comprende además un actuador para el eliminador de oxígeno.
- 20 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el dispositivo comprende además un indicador de oxígeno, una válvula de alivio de presión y/o un puerto de ventilación para ventilar el interior del dispositivo cuando son introducidos líquidos, preferentemente en donde el puerto de ventilación es autosellante.
- 25 6. Uso de un dispositivo de captura celular y de cultivo celular que comprende un alojamiento que contiene:
i) una tapa con una ventana ópticamente transparente;
ii) un canal de distribución de fluido;
iii) un puerto para la inyección de la muestra conectado de manera fluida al canal de distribución de fluido;
iv) una base que comprende una almohadilla de medios porosa;
30 v) un puerto para la inyección de medios conectado de manera fluida a la almohadilla de medios; y
vi) opcionalmente, una membrana dispuesta en la almohadilla de medios,
en donde
35 la tapa se aplica a la base para formar un sello estéril;
el canal de distribución de fluido está dispuesto sobre la almohadilla de medios;
la almohadilla de medios o la membrana opcional es visible a través de la ventana ópticamente transparente; y
el fluido de muestra introducido en el canal de distribución de fluido es distribuido de manera uniforme por la
40 almohadilla de medios,
en un ensayo de esterilidad de bucle cerrado completamente contenido, en donde el dispositivo permite la filtración de una muestra a través de una membrana y la adición de medios nutrientes para dar soporte al crecimiento celular y en donde el dispositivo está adaptado para formar la imagen del dispositivo, sin exponer la muestra u otros componentes internos a unos posibles contaminantes exteriores.
45
7. El uso de la reivindicación 6, en donde el dispositivo comprende además un puerto de entrada y un puerto de drenaje, en donde una muestra introducida a través del puerto de entrada de muestra fluye a través de la membrana al puerto de drenaje.
- 50 8. El uso de una cualquiera de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en donde el dispositivo comprende además un eliminador de oxígeno suficientemente capaz para hacer que el interior del dispositivo sea anaeróbico, preferentemente en donde el dispositivo comprende además un actuador para el eliminador de oxígeno.
- 55 9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde el dispositivo comprende además un indicador de oxígeno, una válvula de alivio de presión y/o un puerto de ventilación para ventilar el interior del dispositivo cuando son introducidos líquidos, preferentemente en donde el puerto de ventilación es autosellante.

Figura 1A

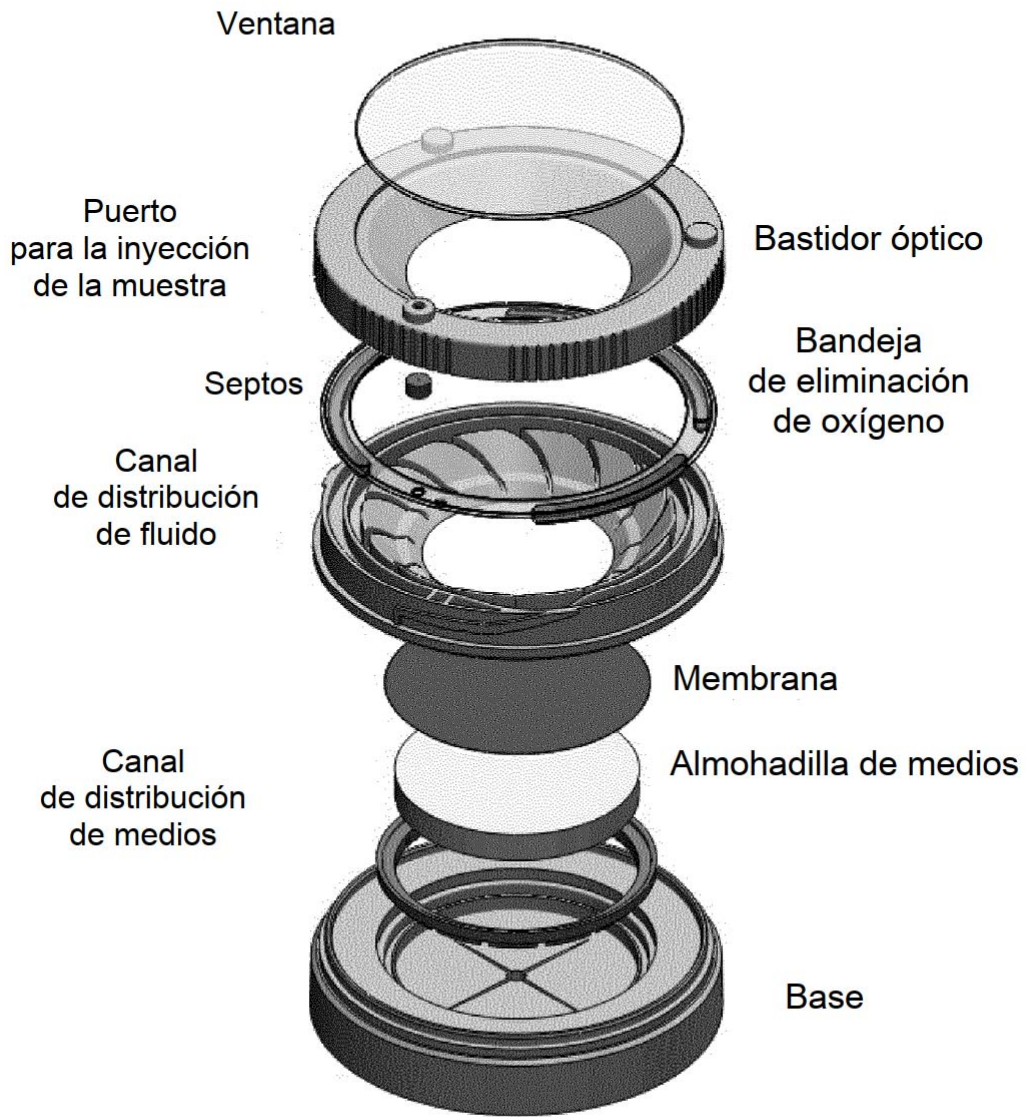


Figura 1B

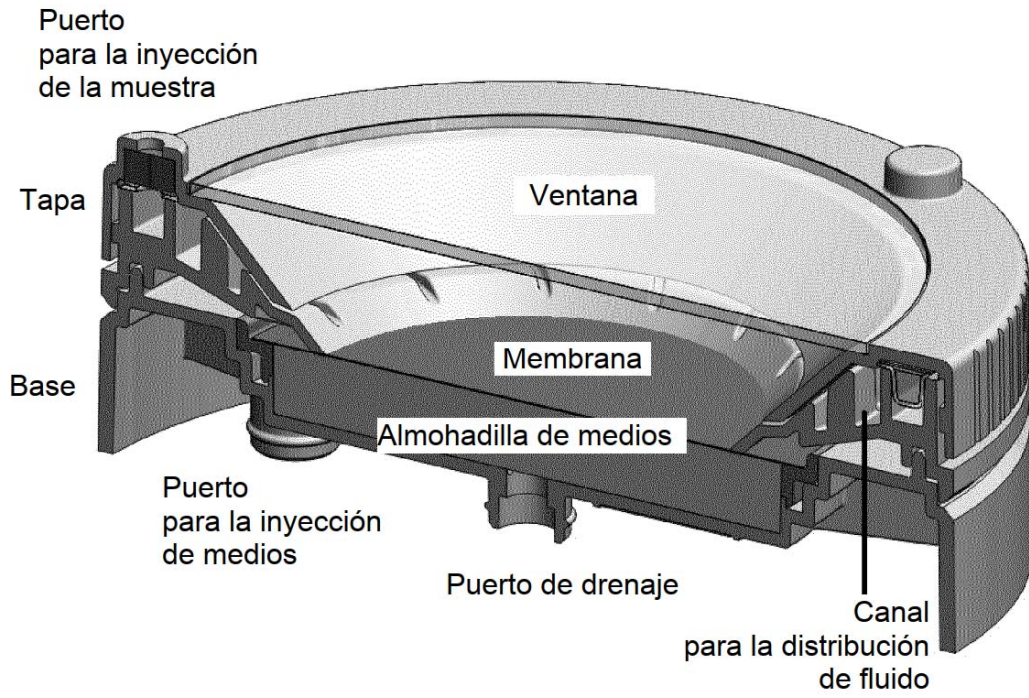


Figura 1C

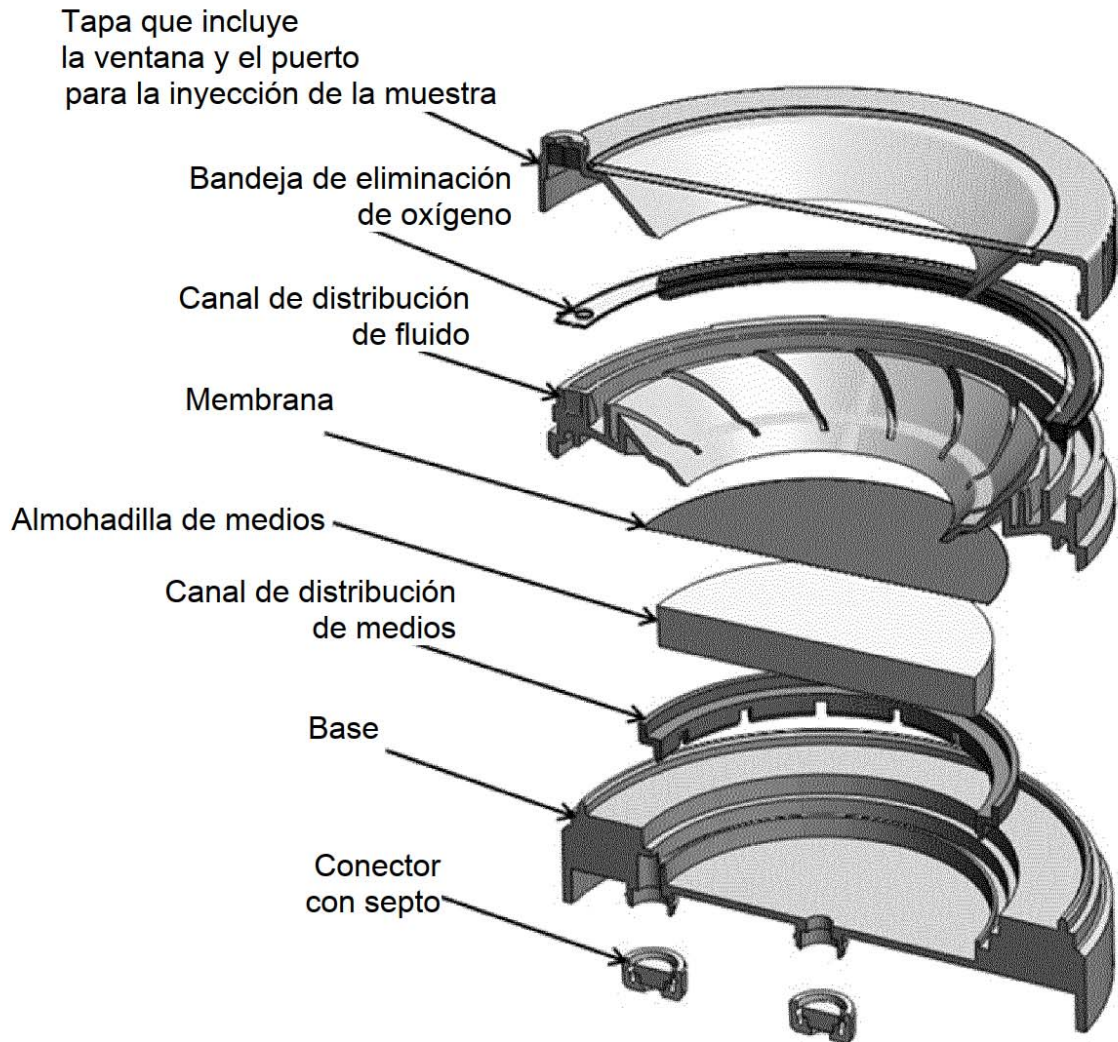


Figura 1D

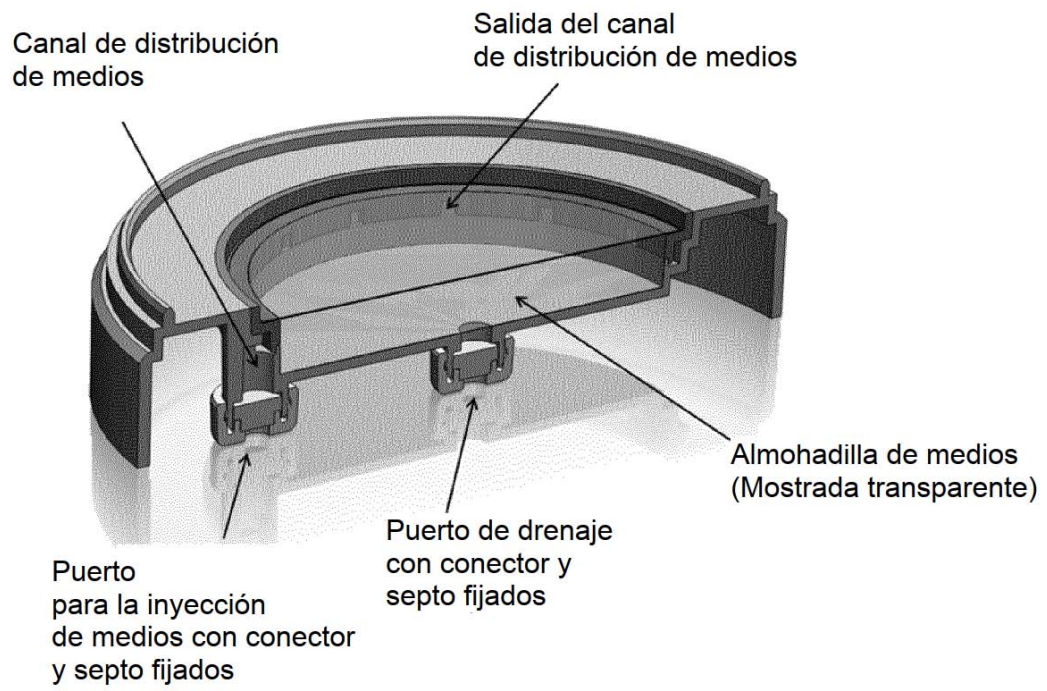
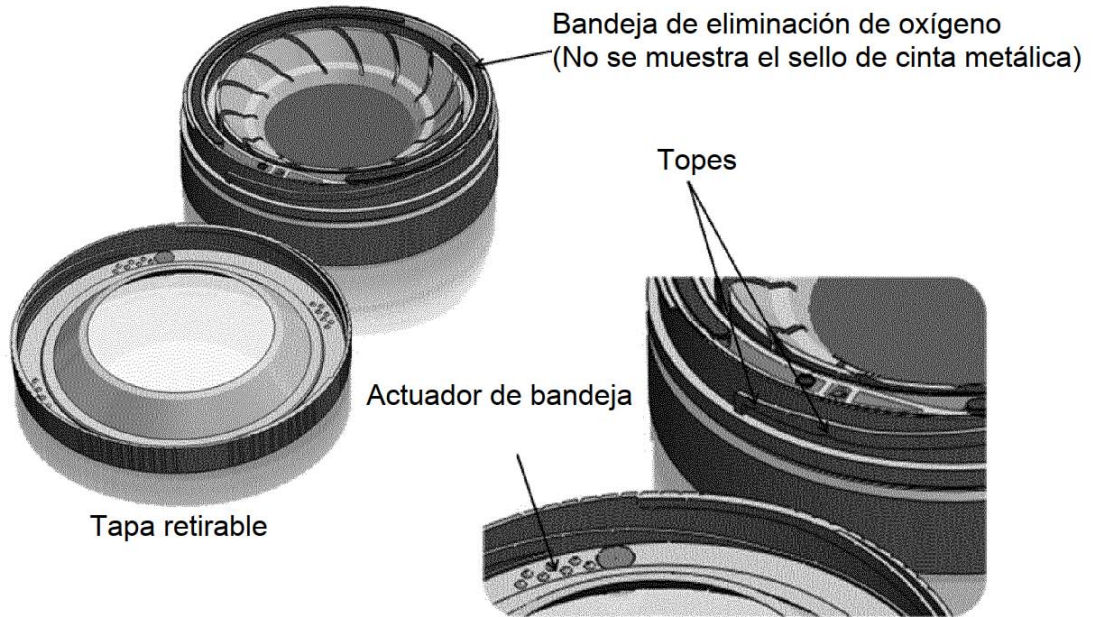


Figura 1E



Tapa con ventana
y bastidor óptico

Tapa ópticamente transparente



Figura 1F

Figura 2A

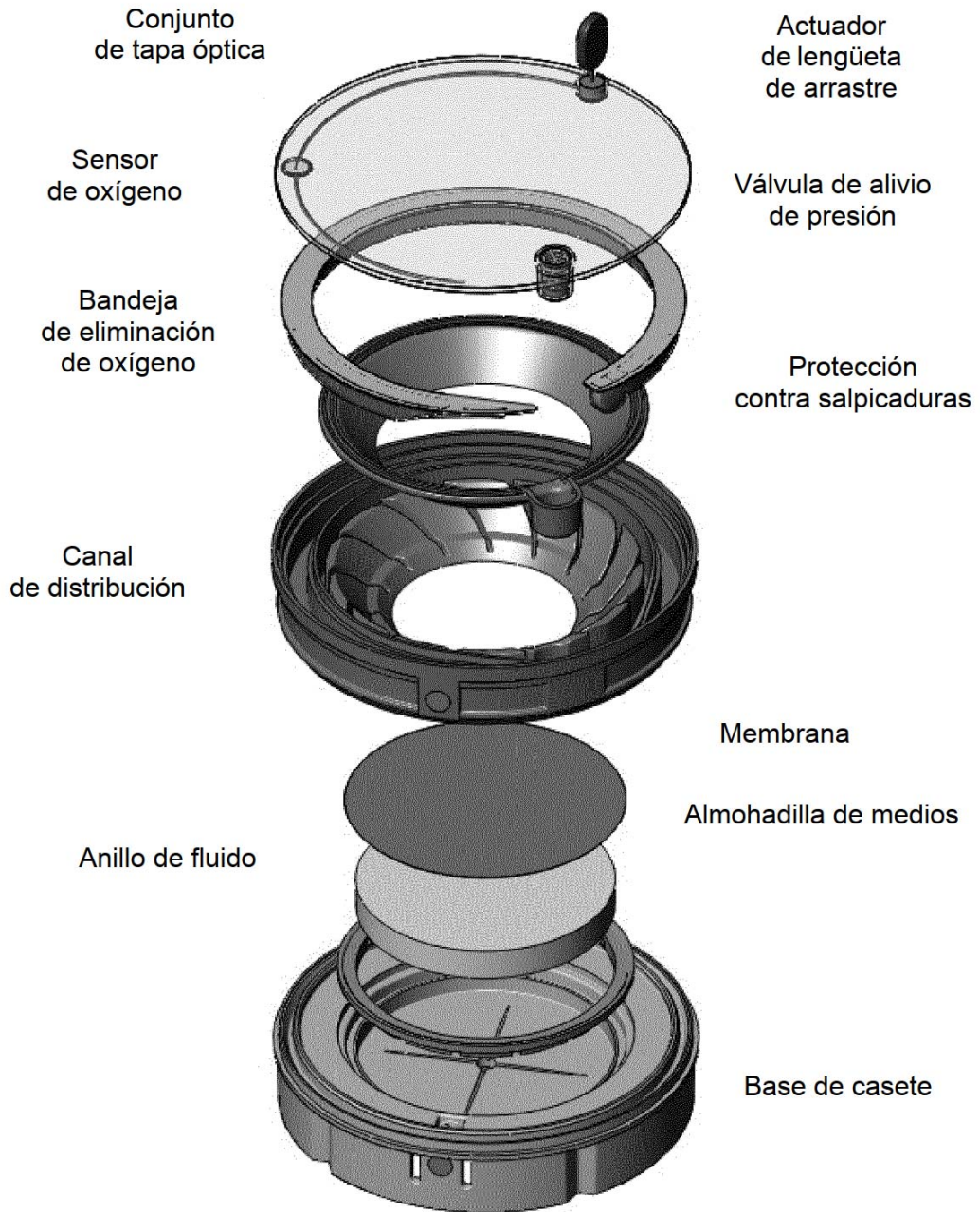
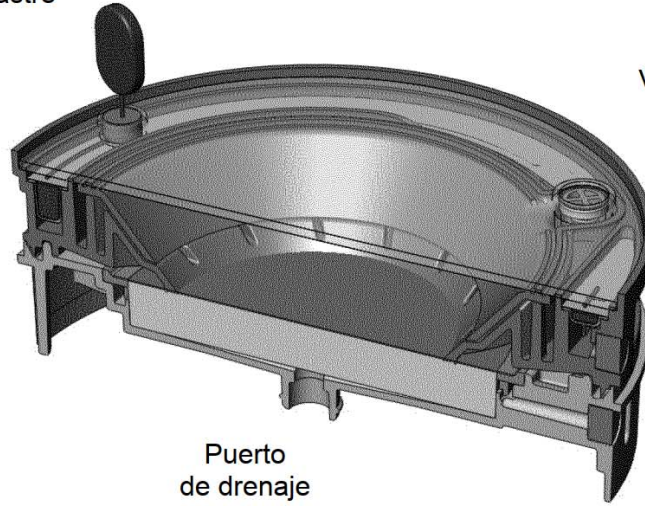


Figura 2B

Lengüeta de arrastre

Bandeja anaeróbica



Válvula de alivio de presión

Puerto para la inyección de la muestra

Puerto de drenaje

Puerto para la inyección de medios

Figura 2C



Figura 3A

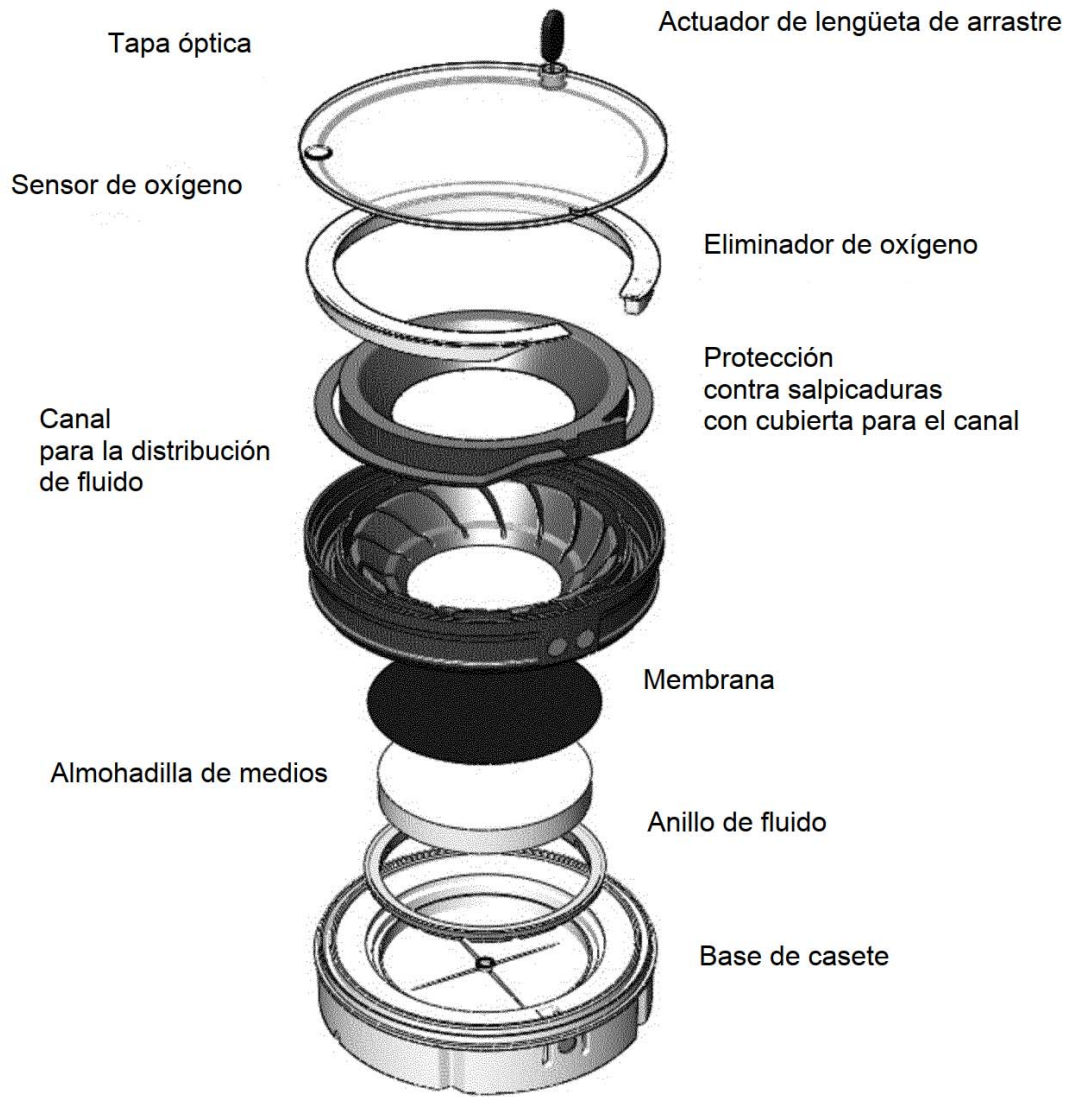
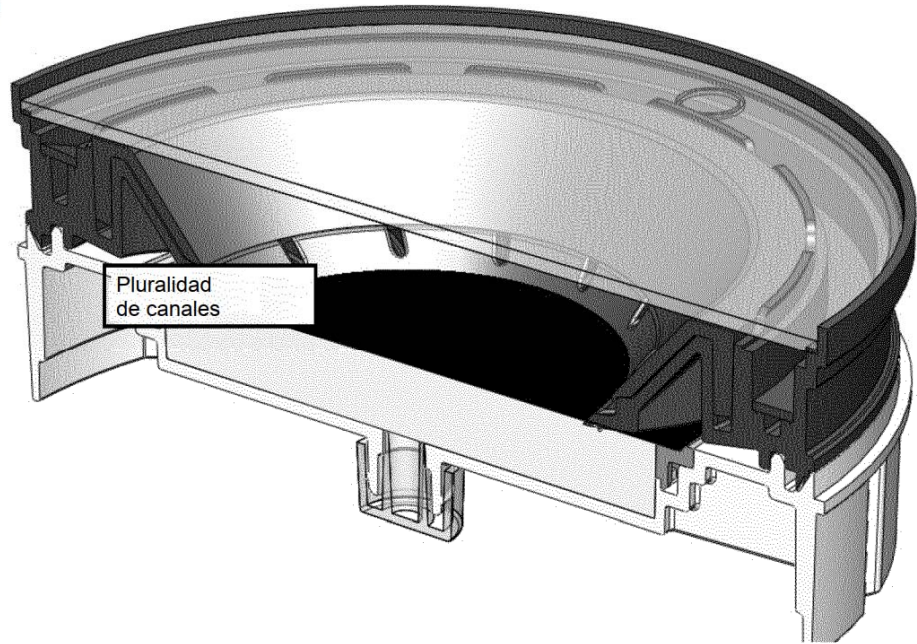


Figura 3B

Canal de estabilización
(Pista exterior)



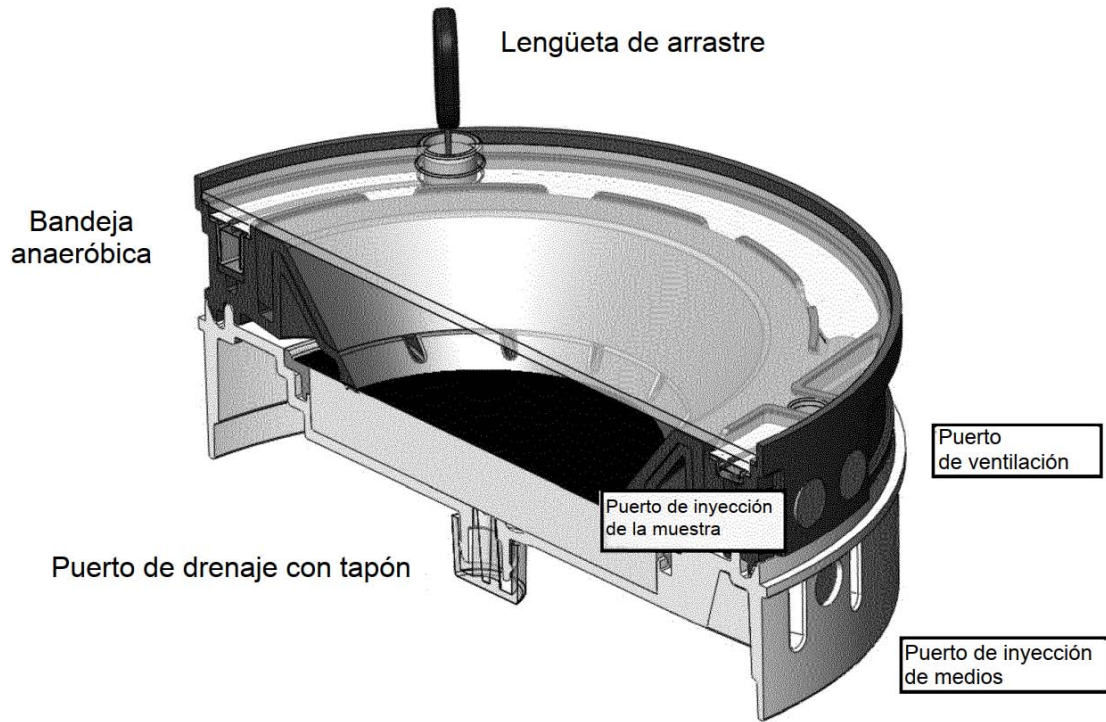


Figura 3C
Figura 3D

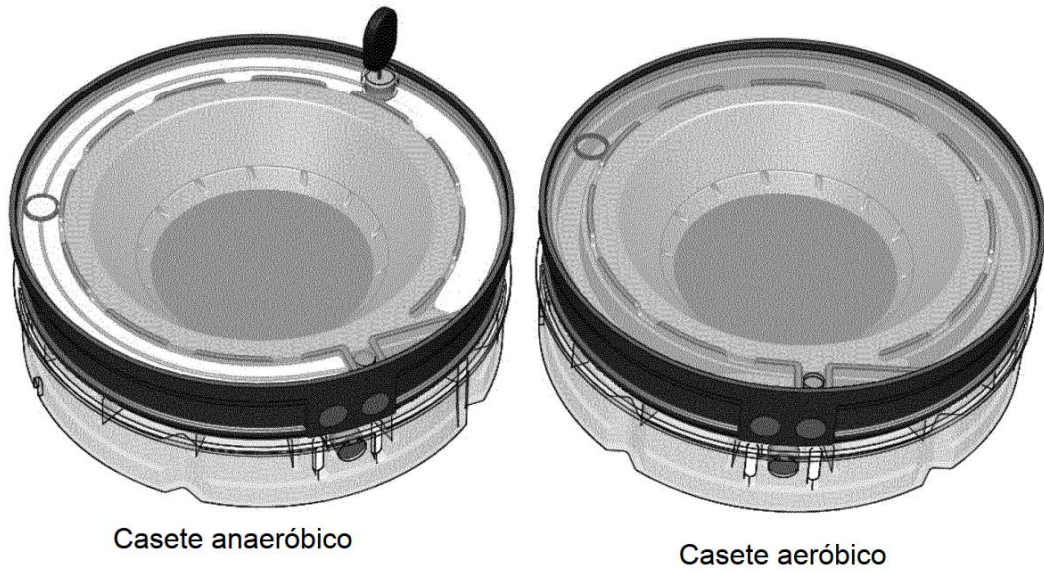


Figura 4A

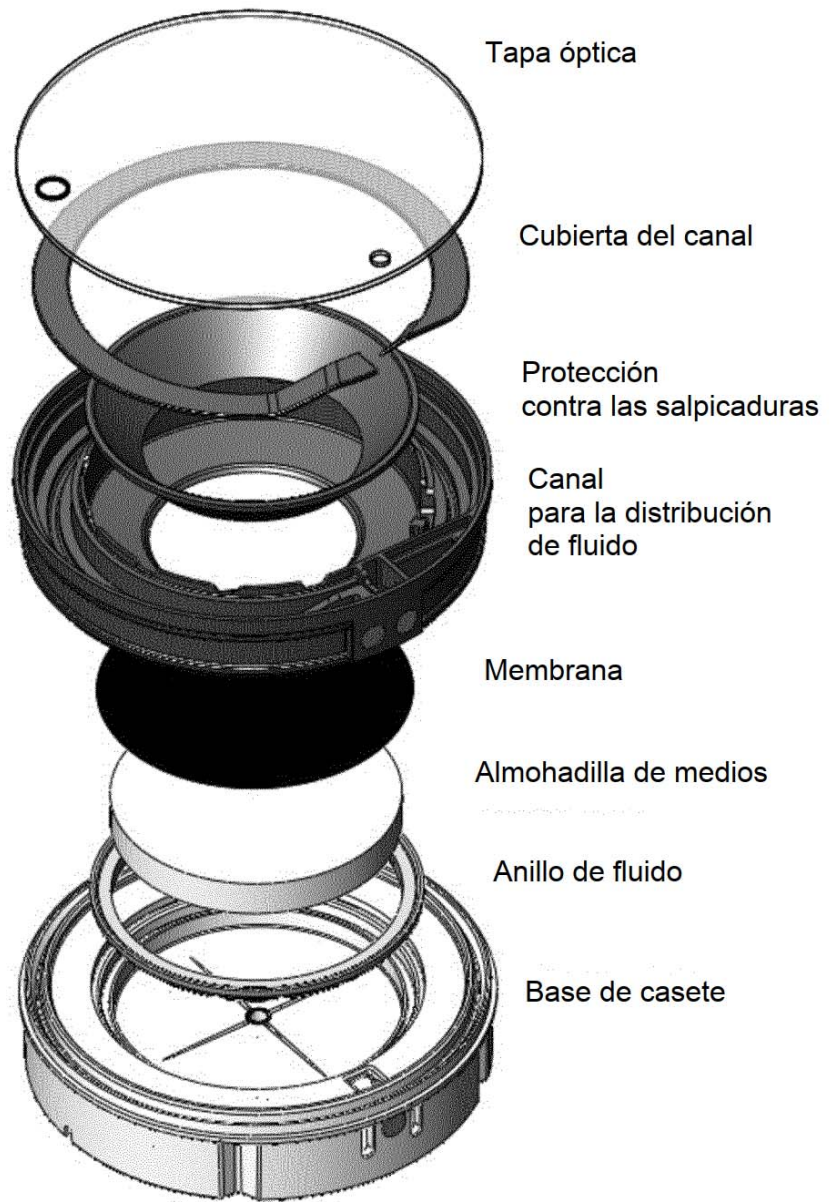


Figura 4B

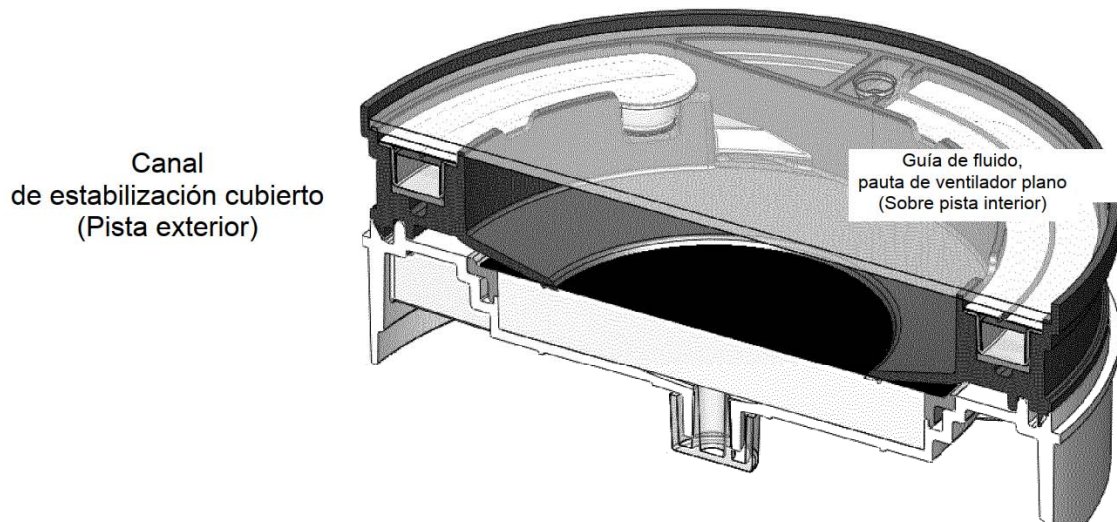


Figura 5A

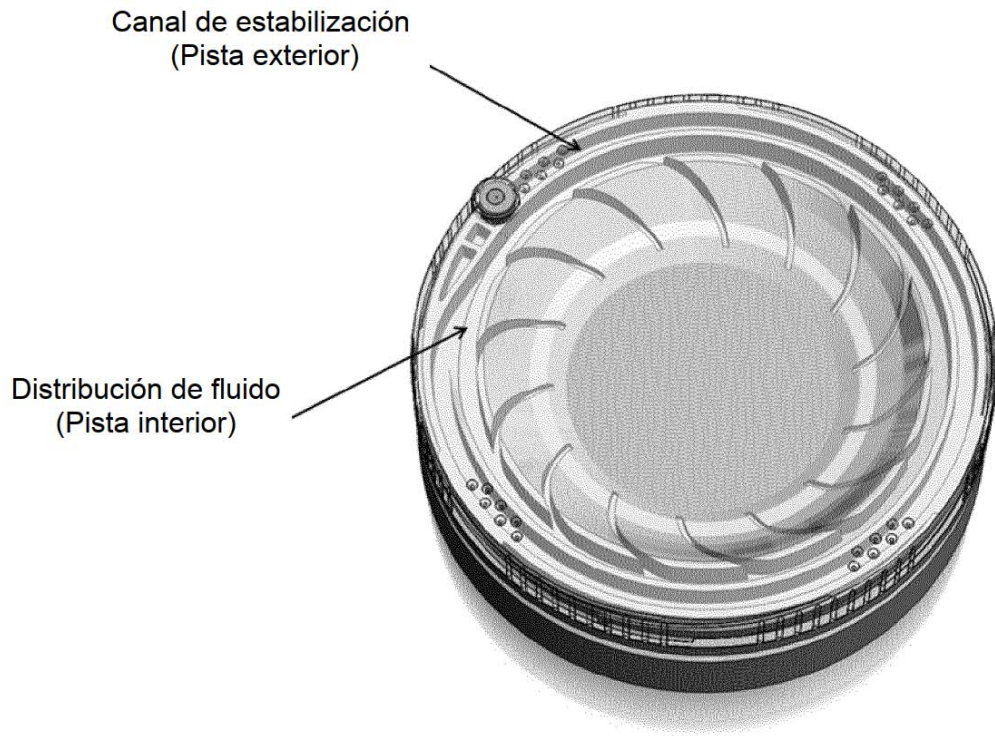


Figura 5B

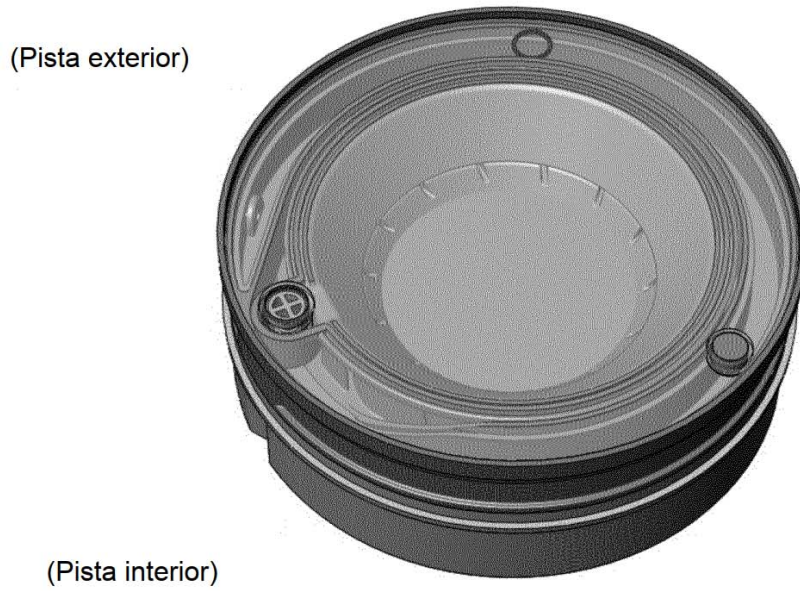
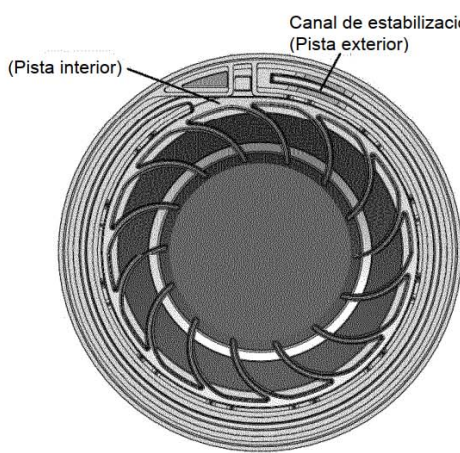


Figura 5C



Camino de fluido multicanal

Figura 5D

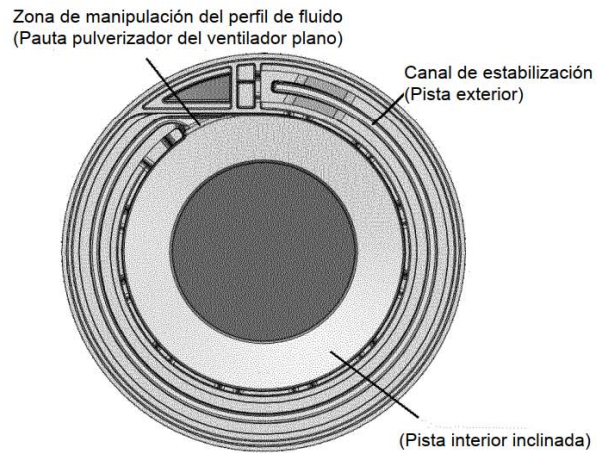


Figura 6A

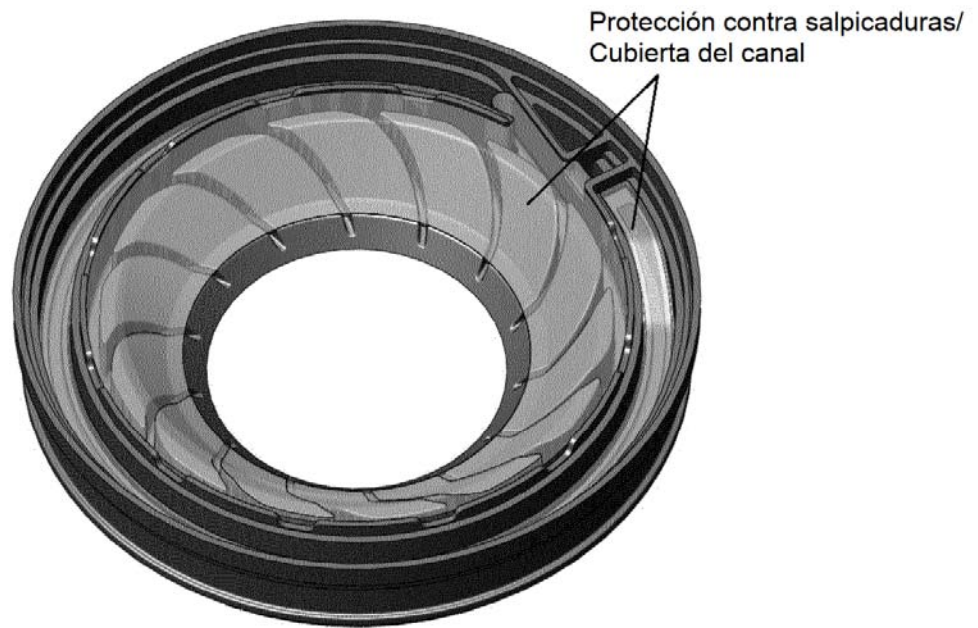


Figura 6B

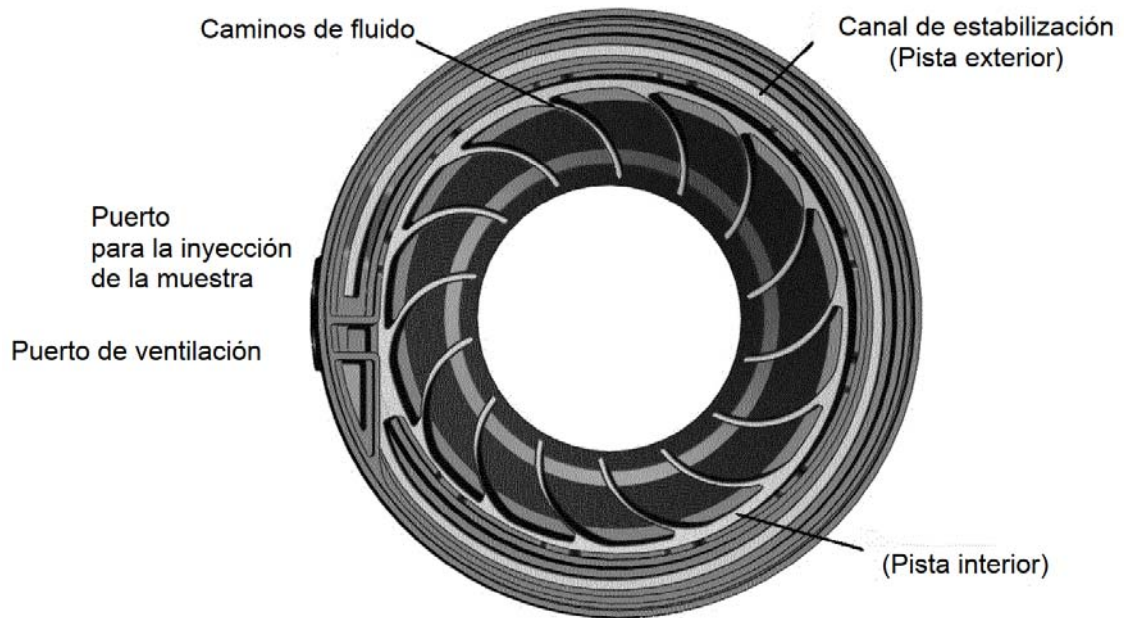


Figura 6C



Figura 7A



Figura 7B

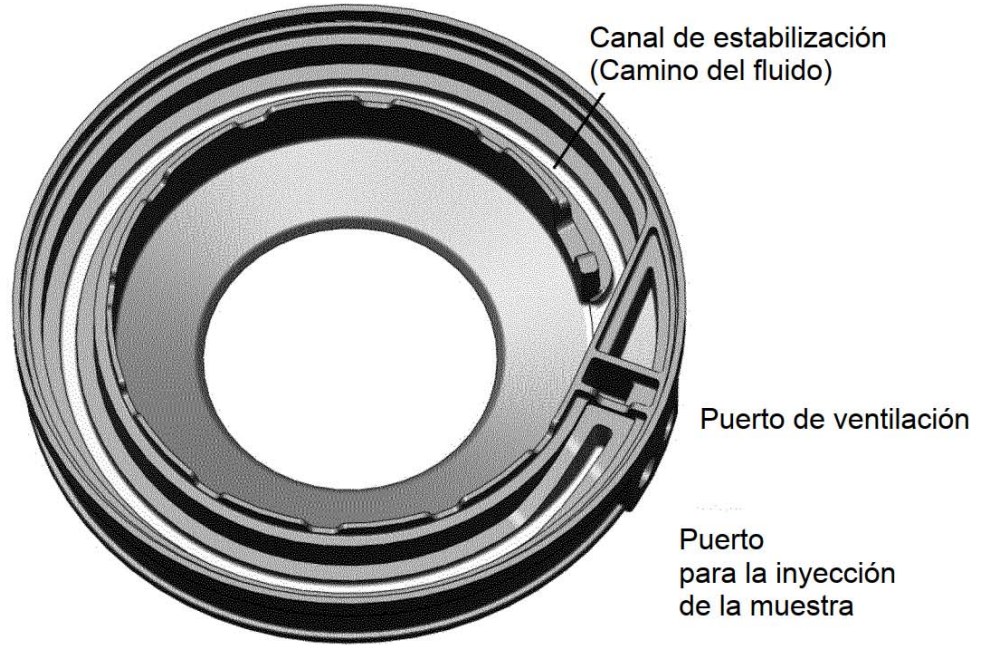


Figura 7C

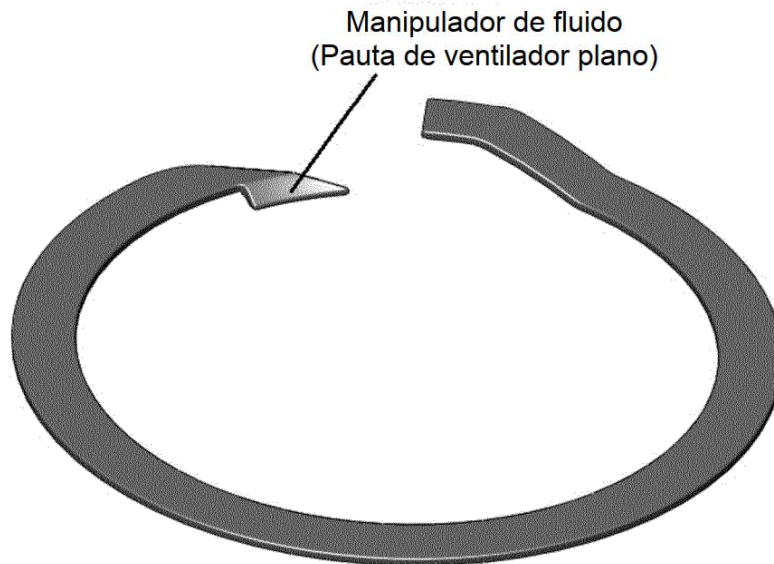


Figura 8

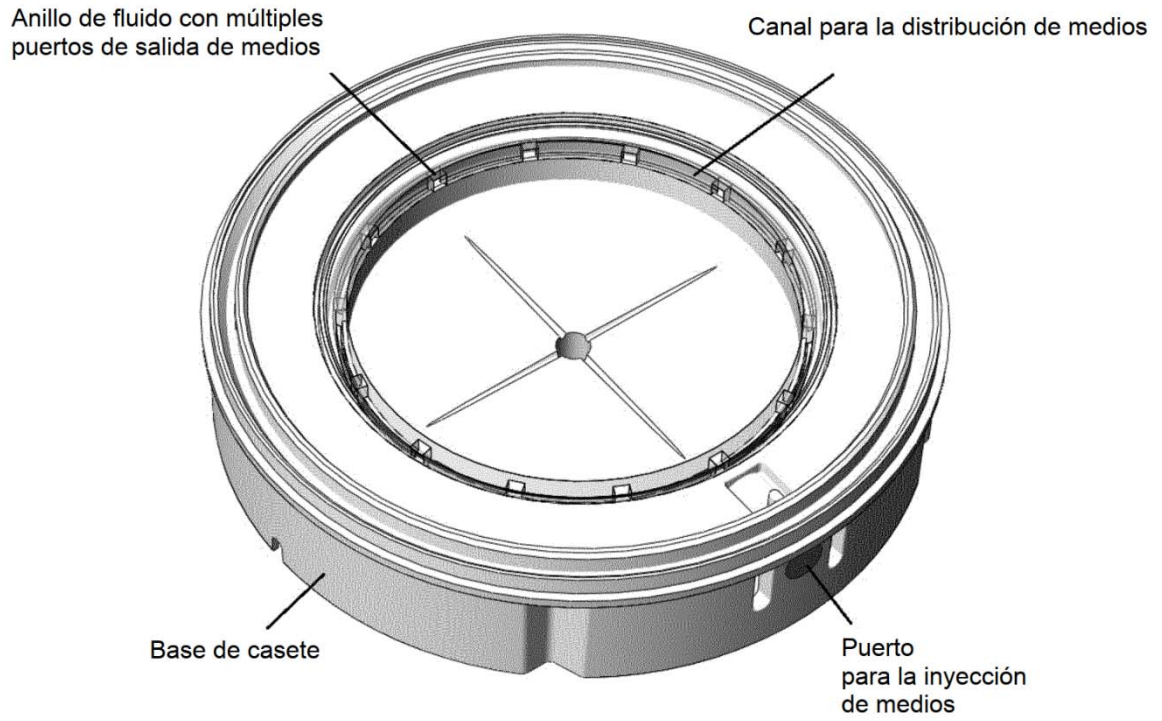


Figura 9A

Las agujas de muestra/nutriente están revestidas con una pantalla de seguridad retractable.

Las agujas de los septos tienen codificado el color y están moldeadas en su sitio, subniveladas con la cara del conector y selladas con Tyvek o cinta metálica.

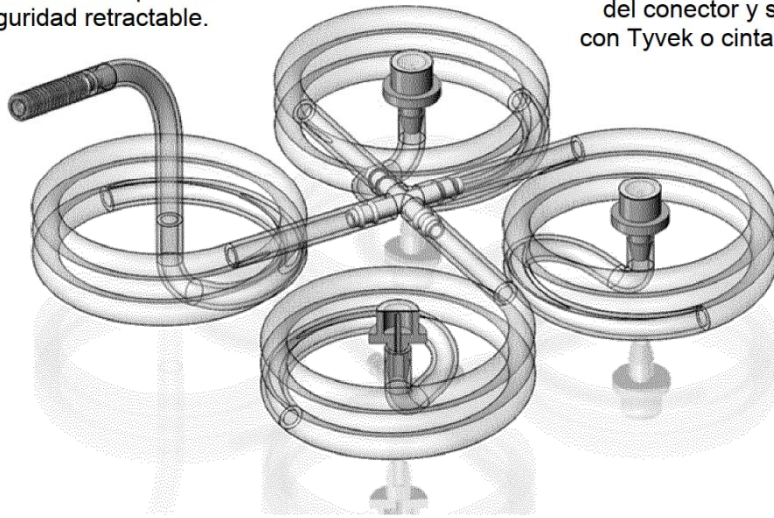


Figura 9B

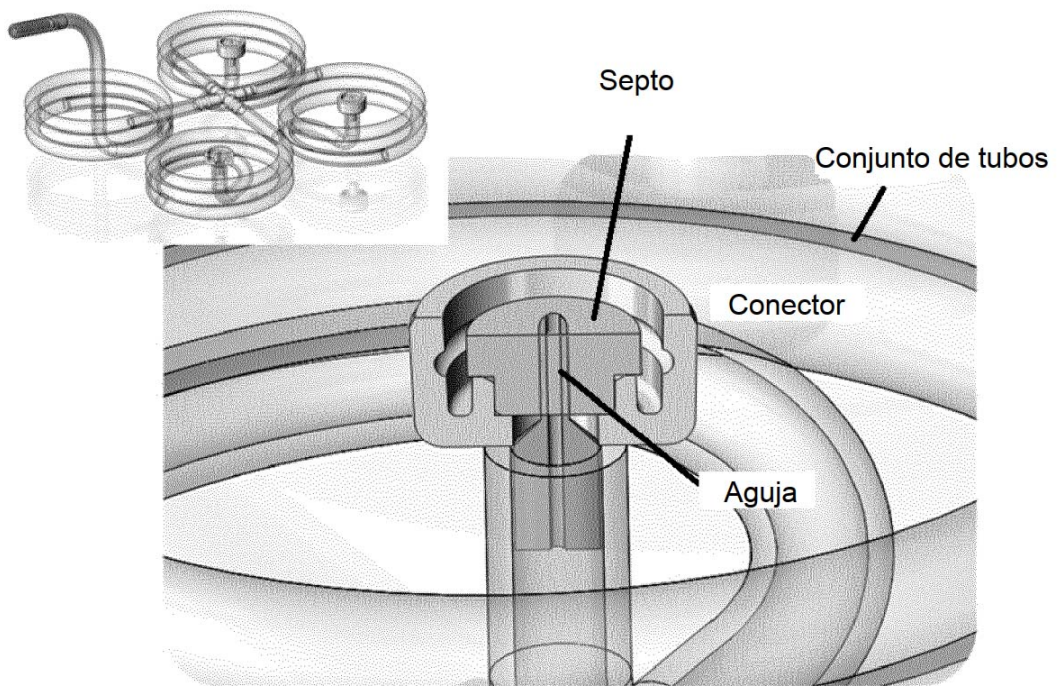


Figura 10A

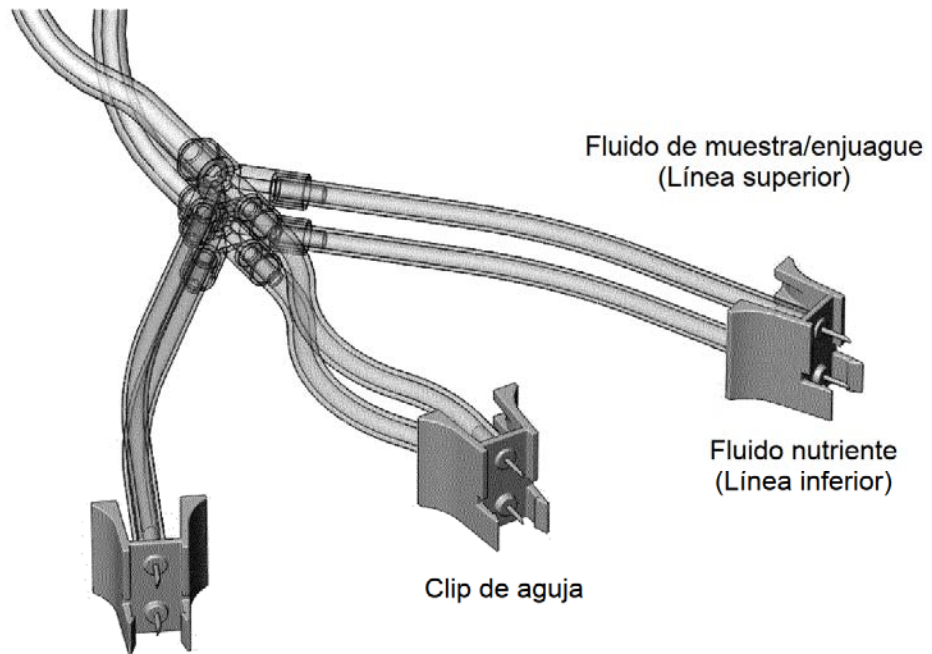


Figura 10B



Figura 11A

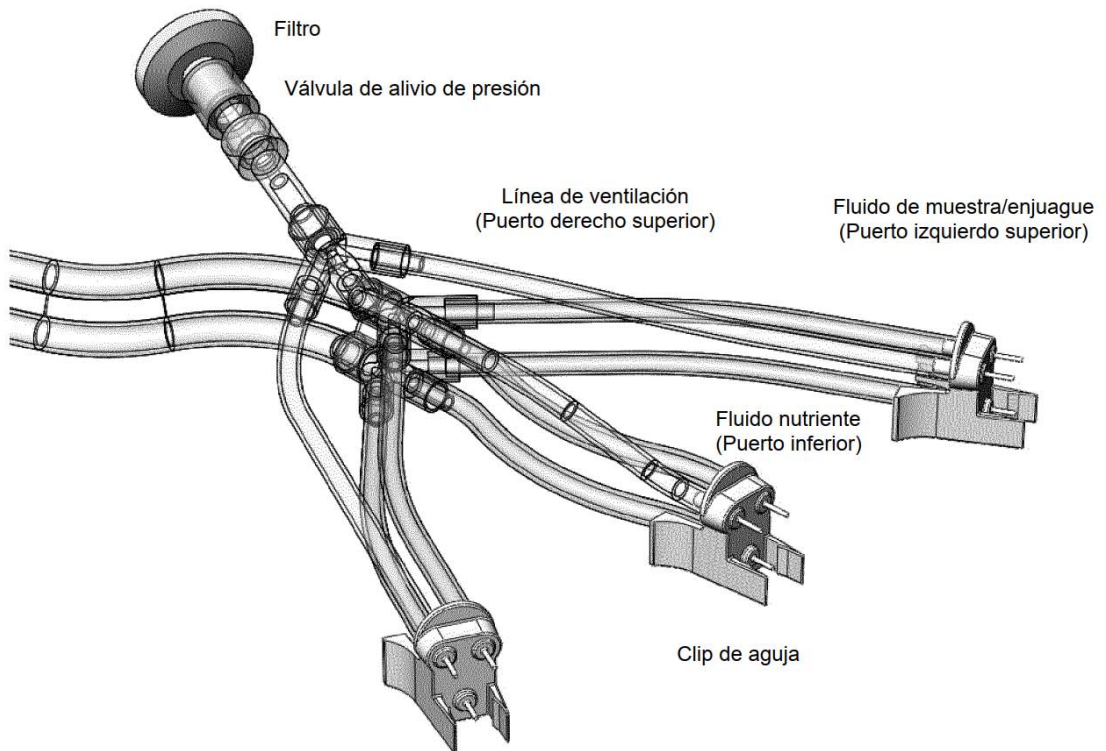


Figura 11B

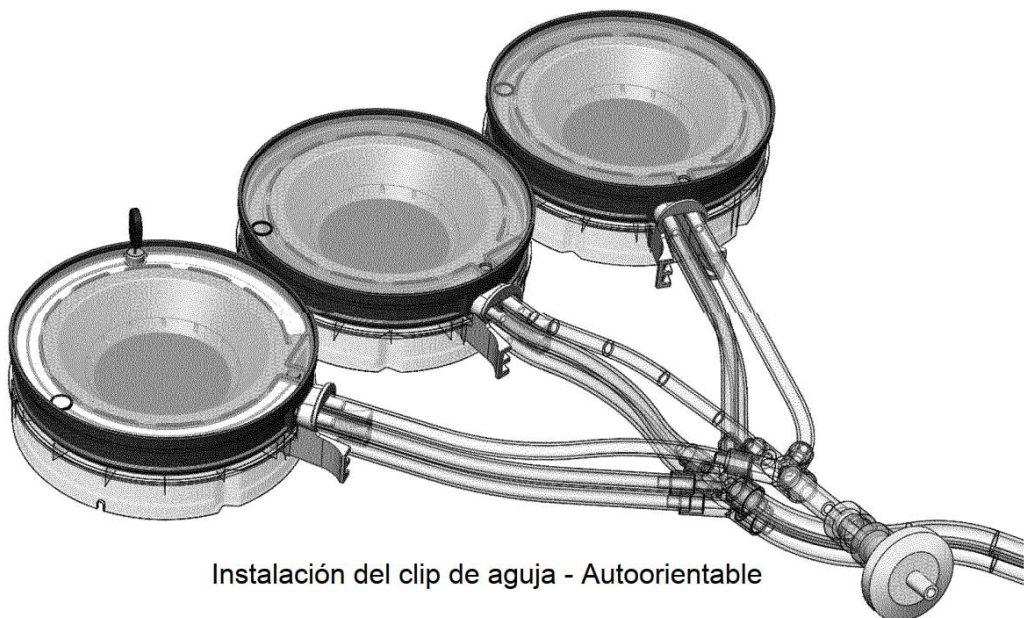


Figura 12



Figura 13

