

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 821 376**

51 Int. Cl.:

**G01N 35/10** (2006.01)

**G01N 35/00** (2006.01)

**C12M 1/26** (2006.01)

**H01J 49/16** (2006.01)

**C12M 1/22** (2006.01)

**C12M 1/36** (2006.01)

**G01N 1/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2013 E 17182362 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020 EP 3267206**

54 Título: **Selección automática de microorganismos e identificación usando MALDI**

30 Prioridad:

**30.03.2012 US 201261618003 P**

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

**26.04.2021**

73 Titular/es:

**BD Kiestra B.V. (100.0%)  
Marconilaan 6  
9207 JC Drachten, NL**

72 Inventor/es:

**BOTMA, JETZE;  
KLEEFSTRA, MARTIJN y  
VAN DER ZEE, TINO WALTER**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 821 376 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**

Selección automática de microorganismos e identificación usando MALDI

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

En general, la presente invención se refiere a un método para localizar y seleccionar una colonia de microorganismos e identificar microorganismos usando MALDI, y realizar una prueba de susceptibilidad.

10 El análisis MALDI es una herramienta útil para resolver problemas estructurales en bioquímica, inmunología, genética y biología. Las muestras se ionizan en la fase gaseosa y se usa un analizador de tiempo de vuelo (TOF) para medir las masas de iones. El análisis TOF comienza cuando se forman iones y se aceleran a una energía cinética constante a medida que ingresan en una región de desplazamiento. Llegan a un detector luego de tiempos de vuelo proporcionales a la raíz cuadrada de sus masas. Se crea un espectro de masas dado que iones de distinta masa llegan al detector en distintos momentos.

15 La espectrometría de masas puede ser una herramienta potente en el campo de descubrimiento y desarrollo de fármacos, genotipado e investigación proteómica. Además, ya se ha utilizado MALDI para la caracterización e identificación de bacterias y microorganismos. La tendencia de investigación actual es analizar una cantidad cada vez mayor de muestras usando cantidades de muestras individuales que oscilan entre los niveles de micromoles y los niveles de atomoles. Como resultado, las muestras se están volviendo más pequeñas y existe la necesidad de adquisición eficaz y confiable de la cantidad correcta de microorganismos y depositar de forma precisa una muestra de la cantidad adquirida en una placa diana utilizada en el instrumento MALDI.

20 En una operación MALDI TOF MS habitual, la muestra que se analizará se localiza o deposita en una placa de metal (también denominada placa diana o placa MALDI), se agregan reactivos (matriz) que permiten ionización, y luego se secan para formar cristales. En estos instrumentos, la placa diana se ubica en una posición fija en el instrumento MALDI. La placa diana tiene múltiples puntos de depósito (por ejemplo, de 24 a 384 puntos de depósito en una única placa diana) y estos puntos de depósito tienen una orientación fija con respecto a los bordes de la placa diana. La placa diana se ubica en una plataforma X-Y, de manera que se pueda depositar una muestra obtenida de una colonia de microorganismos en un punto de depósito seleccionado. Se mantiene un potencial de alto voltaje entre la placa diana y una rejilla de metal. Este voltaje puede mantenerse o pulsarse, dependiendo de los resultados deseados y se genera un vacío en la cámara. Se emite un láser hacia la muestra/matriz y se forma una pluma de iones. La diferencia de voltaje se usa para acelerar los iones por un tubo de vuelo para que se puedan analizar. El análisis relaciona directamente el tiempo de vuelo con la masa del componente ionizado.

25 30 35 Diversos parámetros pueden afectar la calidad de los resultados, incluida la planitud de la diana, la cantidad y el tipo de matriz, la concentración de la muestra, la conductividad de la diana de muestra, la precisión de la colocación en el punto de depósito, así como otras variables.

40 En particular, un aspecto importante es la manipulación de la muestra y la concentración de la muestra. Se sabe que se crea una suspensión de una muestra de una colonia de microorganismos y que un investigador coloca con pipeta una gota de la suspensión obtenida que contiene la muestra sobre un punto de depósito de la placa diana de forma manual. Para proporcionar un análisis correcto, sin embargo, la suspensión debe contener una concentración suficiente de la muestra desde el inicio.

45 50 55 Al preparar dicha suspensión de una muestra de microorganismos, un dispositivo portátil que comprende un mando. El mando comprende una cubierta con un motor de impulsión giratorio contenido allí, y un conector que está configurado para la unión desmontable del dispositivo de adquisición de muestras al mando. El dispositivo de adquisición de muestras comprende una región de recolección de muestras que, en primer lugar, se pone en contacto con el material biológico (cultivado, en su mayoría, en una placa de cultivo) para que se analice. Luego, la región de recolección de muestras se une al mando giratorio, se pone en contacto con un medio líquido contenido en un tubo y se activa el mando giratorio durante un período de tiempo determinado de manera que se libere una muestra del material biológico en el dispositivo de adquisición de muestras en el medio líquido. Luego de que se retira la región de recolección de muestras del tubo, el tubo de suspensión sostiene una suspensión que contiene la muestra que, por ejemplo, se puede usar para realizar el análisis MALDI.

60 65 Sin embargo, en algunos casos, la eficacia de liberación de la muestra de la región de adquisición de muestras puede ser insuficiente para realizar un análisis correcto del microorganismo suspendido en el medio líquido. Esto puede generar una suspensión preparada inutilizable, lo que puede generar pérdida de tiempo y dinero. Además, dado que la región de recolección de muestras gira dentro del tubo, el tubo debe ser de una dimensión suficiente para permitir dicha rotación sin que la región de adquisición de muestras entre en contacto con la pared interior del tubo, lo que puede ser perjudicial para la liberación del microorganismo en el medio líquido. Por lo tanto, dicho tubo de tamaño relativamente grande contiene un volumen relativamente grande de medio líquido, lo que conlleva un período correspondientemente prolongado de procesamiento adicional de dicho medio de suspensión líquido. Por ejemplo, el tiempo durante el cual la suspensión líquida que contiene la muestra debe incubarse en una incubadora es proporcional a la cantidad de líquido de suspensión. Por lo tanto, existe la necesidad de un método en el cual se realice

la preparación de una suspensión de una muestra de microorganismos de forma automática, lo que conlleva una manera mucho más reproducible de preparar dicha suspensión. Además, existe la necesidad de liberar, de forma confiable y reproducible, la muestra en un punto de depósito de una placa diana.

5 A modo de información previa, Lange et ál. (INDUSTRIAL ROBOT: AN INTERNATIONAL JOURNAL, MCB UNIV. PRESS, BRADFORD, tomo 35, n.º 4, páginas 311-315) describe un robot de laboratorio microbiológico que facilita la preparación de muestras de alto rendimiento a partir de colonias de microorganismos para la identificación usando MALDI-TOF MS. US 2012/009558 A1 se refiere a un método y aparato para la identificación de bacterias mediante prueba de susceptibilidad antimicrobiana (AST) y MALDI.

10 COMPENDIO DE LA INVENCION  
A los efectos de resolver al menos uno de los problemas mencionados anteriormente, la presente invención proporciona un método para localizar y seleccionar automáticamente una o más colonias de microorganismos en una placa de cultivo; obtener automáticamente una primera muestra de al menos una de las colonias de microorganismos seleccionadas; y depositar automáticamente al menos una parte de la primera muestra en al menos uno de los puntos de depósito de la placa diana. Parece que los problemas mencionados anteriormente en su mayoría son causados por el hecho de que las etapas se llevan a cabo de forma manual y, por lo tanto, estas etapas tienden a divergencia y errores no deseados, lo que conlleva resultados incorrectos del instrumento MALDI, costos adicionales y pérdida de tiempo. Al automatizar cada una de las etapas, se pueden superar estos problemas en gran medida. En el campo de la presente, se ha dado por sentado que al menos algunas de las etapas solamente podrían llevarse a cabo de forma manual, sin embargo, por el contrario, la presente invención proporciona la posibilidad por primera vez de automatizar todas las etapas necesarias para localizar y seleccionar una colonia de microorganismos e identificar microorganismos en dicha colonia seleccionada usando MALDI, y realizar una prueba de susceptibilidad.

25 La presente invención se define según las características de la reivindicación independiente. Las realizaciones preferidas de la presente invención se definen según las reivindicaciones dependientes.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

30 Depositar al menos una parte de dicha muestra de dicha colonia de microorganismos seleccionada en una placa diana se puede llevar a cabo colocando directamente dicha muestra obtenida de dicha colonia de microorganismos seleccionada en dicha placa diana. Al colocar directamente una muestra en una placa diana, no hay necesidad de preparar en primer lugar una suspensión de dicha muestra, omitiendo así todo problema que pudiera surgir de la preparación de dicha suspensión. Preferiblemente, el método puede comprender la etapa automática adicional de recubrir una gota de una solución de matriz MALDI sobre la muestra depositada en la placa diana.

35 La etapa de depositar al menos una parte de dicha muestra de dicha colonia de microorganismos seleccionada en una placa diana se puede realizar mediante las etapas automáticas de: transferir dicha muestra obtenida a un tubo de suspensión que contiene una cantidad de un medio de suspensión; preparar una suspensión de muestra mediante la transferencia de al menos una parte de dicha muestra obtenida a dicho medio de suspensión; obtener una gota de dicha suspensión de muestra; y transferir dicha gota de suspensión de muestra a dicha placa diana. Al automatizar por completo la preparación de una suspensión, la invención proporciona un método preciso y reproducible de utilizar suspensiones para identificar microorganismos usando MALDI. En particular, cuando el método comprende además la etapa automática de recubrir una gota de una solución de matriz MALDI sobre dicha gota de suspensión de muestra depositada en la placa diana, el método es extremadamente adecuado para la caracterización de microorganismos. Pueden obtenerse los mejores resultados del análisis cuando dicha gota de suspensión de muestra depositada en la placa diana se deja secar antes de que dicha gota de solución de matriz MALDI se recubra. Esto puede ser, además, extremadamente útil en caso de que deba llevarse a cabo otra prueba o análisis en la muestra de la colonia de microorganismos. Dicho análisis adicional puede, de manera particularmente reproducible y eficaz, realizarse cuando el método comprende además las etapas automáticas de: obtener una segunda gota de dicha suspensión de muestra; depositar dicha segunda gota de suspensión de muestra en una placa de cultivo de prueba; y transferir dicha placa de cultivo de prueba a un aparato para realizar una prueba de susceptibilidad u otro análisis adicional. Por consiguiente, el método se puede utilizar para obtener o seleccionar automáticamente una muestra que puede suministrarse en instrumentos ID/AST disponibles que incluyen, pero no se limitan a, BACTEC™, Phoenix, MGIT, BacT/Alert.

55 La presente descripción también proporciona la posibilidad de realizar dicho análisis adicional en caso de que no se elabore una suspensión de una muestra obtenida. El método descrito en la presente puede comprender además las etapas automáticas de: obtener una segunda muestra de una colonia de microorganismos de la placa de cultivo; transferir dicha segunda muestra de dicha colonia de microorganismos seleccionada; depositar al menos una parte de dicha segunda muestra de dicha colonia de microorganismos seleccionada en una placa de cultivo de prueba; y transferir dicha placa de cultivo de prueba a un aparato para realizar una prueba de susceptibilidad u otra prueba adicional.

65 Dado que, para realizar caracterización e identificación de microorganismos, normalmente se cultivan múltiples colonias en una placa de cultivo, además es importante que se obtenga una muestra de una colonia de interés. Si se toman muestras de colonias no interesantes, se ve comprometido el uso eficaz del tiempo y el instrumento MALDI. De acuerdo con el conocimiento del solicitante hasta el momento, no existe un proceso o aparato automático para

5 distinguir colonias interesantes de colonias no interesantes. Sin embargo, el proceso para distinguir colonias puede automatizarse al menos parcialmente al mantener una certeza muy alta de distinción correcta en un método que comprende, antes de la etapa automática de localizar y seleccionar una colonia de microorganismos en una placa de cultivo, la etapa de proporcionar una placa de cultivo que comprende una cantidad de colonias de microorganismos, obtener una imagen inicial de dicha placa de cultivo que incluye todas las colonias de microorganismos, mostrar dicha imagen inicial de dicha placa de cultivo que incluye todas las colonias de microorganismos en una pantalla, y seleccionar al menos una colonia de microorganismos en dicha imagen inicial. De esta manera, un investigador o analista puede seleccionar las colonias de interés en función del conocimiento y formación exhaustivos. A dicha placa de cultivo se le puede proporcionar una identificación individual que identifica dicha placa de cultivo, tal como un código de barras, y el método comprende además la etapa de almacenar dicha imagen inicial de dicha placa de cultivo que incluye todas las colonias, almacenar información con respecto a dicha al menos una colonia de microorganismos seleccionada, almacenar dicha identificación de dicha placa de cultivo en una memoria de una computadora de control central. Como se describe en la presente, el investigador o analista puede ingresar de forma manual instrucciones de procesamiento con respecto al procesamiento al que debe someterse una colonia de microorganismos seleccionada de dicha placa de cultivo, donde dichas instrucciones de procesamiento se almacenan en dicha memoria de dicha computadora de control central para su posterior uso.

20 El método descrito en la presente puede comprender las etapas automáticas de ubicar dicha placa de cultivo en una plataforma para una placa de cultivo, obtener una imagen de dicha placa de cultivo ubicada en dicha plataforma, obtener la identificación de dicha placa de cultivo, comparar la imagen obtenida por el dispositivo de imagenología de dicho dispositivo de herramienta de selección con la imagen inicial almacenada de dicha placa de cultivo para obtener información con respecto a la ubicación de la colonia de microorganismos seleccionada y opcionalmente para obtener las instrucciones de procesamiento con respecto a los procesos que se realizarán en dicha colonia de microorganismos seleccionada. Al comparar la imagen de la placa de cultivo cuando se coloca en el dispositivo de herramienta de selección con la imagen inicial, la ubicación de las colonias seleccionadas puede obtenerse de forma automática, por ejemplo, mediante comparación de imágenes computarizadas.

Opcionalmente, el método comprende la etapa de preparar automáticamente una suspensión de una muestra de microorganismos que comprende las etapas de:

- proporcionar una primera herramienta de selección y proporcionar un dispositivo de colocación con un soporte de la herramienta de selección para sostener una herramienta de selección, donde dicho dispositivo de colocación se dispone para colocar una herramienta de selección en una posición inicial por encima de la ubicación obtenida de la colonia de microorganismos seleccionada en la placa de cultivo y para hacer descender y elevar de forma automática una herramienta de selección hacia y en sentido contrario a la placa de cultivo y para colocar una herramienta de selección en una posición de transferencia, respectivamente;
- colocar dicha primera herramienta de selección en dicho soporte de la herramienta de selección del dispositivo de colocación;
- mediante la colocación de dicho dispositivo de colocación de la primera herramienta de selección en la posición inicial por encima de la ubicación obtenida de la colonia de microorganismos seleccionada en la placa de cultivo, hacer descender de forma automática la primera herramienta de selección hacia la placa de cultivo para que entre en contacto con el microorganismo para seleccionar una muestra de dicho microorganismo, elevar de forma automática la primera herramienta de selección con dicha muestra del microorganismo en sentido contrario a la placa de cultivo hacia la posición de transferencia;
- proporcionar un soporte del tubo de suspensión para sostener un tubo de suspensión;
- colocar un tubo de suspensión en el soporte del tubo de suspensión;
- proporcionar un dispensador del medio de suspensión automático para dispensar automáticamente un medio de suspensión en un tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión;
- al suministrar de forma automática el dispensador automático una cantidad inicial de medio de suspensión en el tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión;
- proporcionar un dispositivo de transferencia para transferir de forma automática una herramienta de selección de la posición de transferencia del dispositivo de colocación a una posición por encima de un tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión, y para hacer descender y elevar una herramienta de selección hacia y en sentido contrario a un medio de suspensión contenido en un tubo de suspensión, y para colocar una herramienta de selección en una posición de espera por encima de un tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión, respectivamente;
- al transferir de forma automática dicho dispositivo de transferencia dicha primera herramienta de selección con la muestra del microorganismo de la posición de transferencia del dispositivo de colocación a una posición por encima del tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión, hacer descender dicha primera herramienta de selección con la muestra del microorganismo en el medio de suspensión contenido en el tubo de suspensión; al hacer oscilar el dispositivo de transferencia la primera herramienta de selección en un movimiento vertical lineal durante un período de tiempo mientras que la primera herramienta de selección con la muestra de dicho microorganismo se sumerge en el medio de suspensión; y después de que ha transcurrido dicho período de tiempo, elevar la primera herramienta de selección en sentido contrario al medio de suspensión contenido en el tubo de suspensión hacia la posición de espera;
- proporcionar un medidor de turbidez para realizar mediciones de la turbidez de un medio de suspensión

contenido en un tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión;

- al menos después de transcurrido el período de tiempo durante el cual la herramienta de selección oscila medir la turbidez del medio de suspensión contenido en el tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión mediante el medidor de turbidez y proporcionar un valor de medición final que indica la turbidez medida;
- proporcionar un controlador conectado de forma comunicativa al dispositivo de colocación, el dispositivo de transferencia, el dispensador del medio de suspensión automático y el medidor de turbidez para controlar de forma automática el movimiento del dispositivo de colocación, el movimiento del dispositivo de transferencia, el funcionamiento del dispensador del medio de suspensión automático y el funcionamiento del medidor de turbidez, respectivamente;
- mediante dicho controlador:

a) determinar si el valor de medición final se encuentra por encima de un primer valor umbral previamente almacenado en una memoria del controlador, en caso afirmativo, realizar la etapa b); o si el valor de medición final es idéntico o inferior al primer valor de umbral e idéntico o superior al segundo valor de umbral previamente almacenado en la memoria del controlador, donde dicho primer valor de umbral es igual o superior al segundo valor de umbral, en caso afirmativo, realizar la etapa c); o si el valor de medición final es inferior al segundo valor de umbral, en caso afirmativo, realizar la etapa d);

b) controlar el dispensador del medio de suspensión automático para suministrar una cantidad adicional de medio de suspensión en el tubo de suspensión;

c) proporcionar una señal de que se puede retirar el tubo de suspensión con la suspensión del soporte del tubo de suspensión para el procesamiento adicional; o

d) proporcionar una herramienta de selección adicional; colocar dicha herramienta de selección adicional en dicho soporte de la herramienta de selección del dispositivo de colocación; al colocar dicho dispositivo de colocación la herramienta de selección adicional en la posición inicial encima de la placa de cultivo, hacer descender de forma automática la herramienta de selección adicional hacia la placa de cultivo en contacto con el microorganismo para seleccionar una muestra adicional de dicho microorganismo, elevar de forma automática la herramienta de selección adicional con dicha muestra del microorganismo de la placa de cultivo a la posición de transferencia; al transferir de forma automática el dispositivo de transferencia dicha herramienta de selección adicional con la muestra adicional del microorganismo de la posición de transferencia del dispositivo de colocación a una posición encima del tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión, hacer descender dicha herramienta de selección adicional con la muestra adicional del microorganismo en el medio de suspensión contenido en el tubo de suspensión; al oscilar el dispositivo de transferencia la herramienta de selección adicional en un movimiento vertical lineal durante un período de tiempo durante el cual la herramienta de selección adicional con la muestra adicional de dicho microorganismo se sumerge en el medio de suspensión; y después de transcurrido dicho período de tiempo elevar la herramienta de selección adicional del medio de suspensión contenido en el tubo de suspensión hasta la posición de espera; al menos después de transcurrido el período de tiempo durante el cual la herramienta de selección adicional oscila medir la turbidez del medio de suspensión contenido en el tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión mediante el medidor de turbidez y proporcionar un valor de medición final adicional que indica la turbidez medida;

y realizar la etapa a). De esta manera, es posible preparar una suspensión de una muestra de un microorganismo de manera automática avanzada mientras que, mediante el controlador y el medidor de turbidez, es posible proporcionar un tubo de suspensión que contiene un medio de suspensión que contiene una cantidad de microorganismo que siempre es suficiente (y reproducible) para realizar un análisis correcto del microorganismo.

El controlador se puede ubicar de manera que la etapa de medir la turbidez del medio de suspensión contenido en el tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión mediante el medidor de turbidez se realice además durante el período de tiempo durante el cual oscila la herramienta de selección, en donde el medidor de turbidez se ubica para proporcionar un valor de medición en línea que indica la turbidez medida durante el período de tiempo durante el cual oscila la herramienta de selección al controlador. De esta manera, se puede obtener una determinación automática extremadamente rápida de la cantidad de microorganismo en la suspensión. En particular, si durante la oscilación el valor de medición en línea de la turbidez es igual o inferior al primer valor de umbral e igual o superior al segundo valor de umbral, el controlador controla el movimiento del dispositivo de transferencia, de manera que la herramienta de selección se eleve hasta la posición de espera, y el controlador proporciona además una señal de que se puede retirar el tubo de suspensión con la suspensión del soporte del tubo de suspensión para el procesamiento adicional. De esta manera, la oscilación de la herramienta de selección se puede detener cuando el medio de suspensión contiene una cantidad suficiente de microorganismos, de manera que el método pueda realizarse de manera extremadamente eficaz en términos de tiempo.

La disposición mutua de la herramienta de selección y los sensores del medidor de turbidez puede ser tal que durante la oscilación de la herramienta de selección la herramienta de selección no obstruya la trayectoria del medidor de turbidez.

5 El controlador se puede ubicar de manera de controlar el medidor de la turbidez que la etapa de medir la turbidez del medio de suspensión contenido en el tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión mediante el medidor de turbidez se inicie antes de sumergir la herramienta de selección en el medio de suspensión contenido en el tubo de suspensión. De esta manera, por ejemplo, es posible comprobar si el medio de suspensión inicial utilizado no está contaminado. Además, esto proporciona una indicación del valor inicial de la turbidez que es útil para determinar el valor de medición final.

10 El método puede comprender además la etapa de proporcionar como soporte del tubo de suspensión para sostener un tubo de suspensión un soporte giratorio del tubo de suspensión para girar un tubo de suspensión sostenido por el soporte giratorio del tubo de suspensión, la etapa de ubicar el controlador de manera que se conecte de forma comunicativa al soporte giratorio del tubo de suspensión para controlar la rotación del soporte del tubo de suspensión, y la etapa de ubicar el controlador de manera que el tubo de suspensión gire durante la medición de la turbidez del medio de suspensión contenido en el tubo de suspensión. Dicha rotación del tubo de suspensión puede permitir que se realicen las mediciones de turbidez en diversas posiciones dentro del tubo de suspensión que pueden estar separadas de forma giratoria entre sí, lo que genera una medición final más correcta de la turbidez de la suspensión. La rotación como tal no es necesaria para liberar la muestra de la herramienta de selección, el movimiento vertical lineal de oscilación de la herramienta de selección puede ser más que suficiente para liberar la muestra.

20 Si bien se puede utilizar una herramienta de selección adicional que es distinta de la primera herramienta de selección, donde el método se puede realizar de manera económica cuando la primera herramienta de selección se proporciona como una segunda herramienta de selección; y la colocación de dicha segunda herramienta de selección en dicho soporte de herramienta de selección del dispositivo de colocación se puede realizar mediante el dispositivo de transferencia controlado por el controlador.

25 La cantidad adicional del medio de suspensión se puede determinar mediante el controlador en función de la cantidad inicial del medio de suspensión, el valor de medición final y el valor del primer y/o segundo valor de umbral. Esto hace posible utilizar medio de suspensión adicional apenas suficiente según sea necesario y, por lo tanto, en esta realización, se puede utilizar la menor cantidad posible de medio de suspensión.

30 Dado que la herramienta de selección puede oscilar en un movimiento lineal vertical con respecto al tubo de suspensión, la dimensión del tubo de suspensión puede ser relativamente pequeña. Esto hace posible que, en una realización de un método según la invención, el controlador se puede ubicar para controlar el dispensador del medio de suspensión automático, de manera que la cantidad inicial suministrada sea de aproximadamente 0,5 - 2 ml, preferiblemente aproximadamente 1 ml. Dicha cantidad relativamente pequeña del medio de suspensión es suficiente para la preparación de una suspensión correcta de una muestra de microorganismos. De esa manera es posible utilizar como tubo de suspensión un tubo de suspensión con una sección transversal sustancialmente circular con un diámetro de aproximadamente 6 a aproximadamente 12 mm, preferiblemente aproximadamente 10 mm, que es relativamente pequeño en comparación con los tubos tradicionales que tienen un diámetro de aproximadamente 16 mm. Con dicho tubo de suspensión relativamente pequeño, se puede obtener una liberación correcta de la muestra de la herramienta de selección cuando el controlador se ubica para controlar la oscilación del dispositivo de transferencia, de manera que la herramienta de selección oscile a una frecuencia de entre aproximadamente 5 Hz a aproximadamente 120 Hz, preferiblemente aproximadamente 30 Hz a aproximadamente 90 Hz, más preferiblemente aproximadamente 50 Hz. Preferiblemente, el controlador se dispone para controlar la oscilación del dispositivo de transferencia, de manera que la herramienta de selección oscile con una amplitud de aproximadamente 0.5 mm a aproximadamente 4 mm, preferiblemente aproximadamente 2 mm a aproximadamente 3 mm, lo que genera una liberación óptima de la muestra de la herramienta de selección. En caso de que el controlador se disponga para controlar la oscilación del dispositivo de transferencia de manera que el período de tiempo durante el cual la herramienta de selección oscila sea de aproximadamente 3 segundos hasta aproximadamente 10 segundos, preferiblemente aproximadamente 6 segundos, parece que prácticamente en todos los casos se puede liberar toda la muestra de la herramienta de selección.

50 Los valores para la frecuencia, amplitud y duración dependen de las propiedades del microorganismo específico y, por ejemplo, su adherencia a la herramienta de selección. A partir de la inspección mediante imagenología, se puede deducir si la muestra se ha liberado en su mayor parte o no de la herramienta de selección utilizando en primer lugar los valores preferidos mencionados anteriormente. Si todavía queda algo de material en la herramienta de selección, se puede repetir la oscilación vertical dentro de los intervalos determinados en distintos valores.

60 El método puede comprender además la etapa de proporcionar un dispositivo de colocación y retiro automático de la placa de cultivo para colocar y retirar de forma automática una placa de cultivo que comprende dicho microorganismo en y sobre la plataforma, respectivamente. Luego, el controlador se dispone de manera que se conecte de forma comunicativa al dispositivo de colocación y retiro automático de la placa de cultivo para controlar el funcionamiento del dispositivo de colocación y retiro automático de la placa de cultivo. De esta manera, la colocación de una placa de cultivo que comprende dicho microorganismo en la plataforma se puede realizar de forma automática bajo el control del controlador. Una automatización adicional se puede realizar al proporcionar un dispositivo de colocación y retiro automático del tubo de suspensión para colocar y retirar de forma automática un tubo de suspensión en y del soporte del tubo de suspensión, respectivamente. Luego, el controlador se dispone de manera que se conecte de forma comunicativa al dispositivo de colocación y retiro automático del tubo de suspensión para controlar el funcionamiento

5 del dispositivo de colocación y retiro automático del tubo de suspensión, de manera que la colocación de un tubo de  
 suspensión en el soporte del tubo de suspensión se pueda realizar de forma automática bajo el control del controlador.  
 De manera ventajosa, el controlador se dispone de manera que se permita retirar de forma automática una placa de  
 cultivo de la plataforma mediante el dispositivo de colocación y retiro automático de la placa de cultivo solamente  
 después de que se haya proporcionado la señal de que se puede retirar el tubo de suspensión con la suspensión del  
 soporte del tubo de suspensión para el procesamiento adicional. Además, es preferible que el controlador se disponga  
 de manera que se retire de forma automática un tubo de suspensión del soporte del tubo de suspensión mediante el  
 dispositivo de colocación y retiro automático del tubo de suspensión solamente después de que se haya proporcionado  
 la señal de que se puede retirar el tubo de suspensión con la suspensión del soporte del tubo de suspensión para el  
 procesamiento adicional.

15 El método puede comprender la etapa de proporcionar una marca de identificación en el tubo de suspensión, y la  
 etapa de almacenar la marca de identificación de dicho tubo de suspensión junto con las propiedades de la suspensión  
 con un enlace con la identidad de la placa de cultivo de la que se obtuvo la colonia de microorganismos seleccionada  
 en la memoria de dicha computadora de control central, el método no solamente puede funcionar automáticamente  
 de manera extremadamente eficaz sino que también se mejora el procesamiento correcto y rápido de los resultados  
 del análisis obtenidos.

20 El método puede comprender las siguientes etapas automáticas: proporcionar una primera herramienta de selección  
 y proporcionar un dispositivo de colocación con un soporte de la herramienta de selección para sostener una  
 herramienta de selección, dicho dispositivo de colocación se dispone para colocar una herramienta de selección en  
 una posición inicial por encima de la ubicación obtenida de la colonia de microorganismos seleccionada en la placa  
 de cultivo y para hacer descender y elevar de forma automática una herramienta de selección hacia y en sentido  
 contrario a la placa de cultivo y para colocar una herramienta de selección en una posición de transferencia,  
 respectivamente; colocar dicha primera herramienta de selección en dicho soporte de la herramienta de selección del  
 dispositivo de colocación; al colocar dicho dispositivo de colocación la primera herramienta de selección en la posición  
 inicial por encima de la ubicación obtenida de la colonia de microorganismos seleccionada en la placa de cultivo, hacer  
 descender de forma automática la primera herramienta de selección hacia la placa de cultivo en contacto con el  
 microorganismo para seleccionar una muestra de dicho microorganismo, elevar de forma automática la primera  
 herramienta de selección con dicha muestra del microorganismo en sentido contrario a la placa de cultivo hasta la  
 posición de transferencia; proporcionar un soporte de la placa diana para sostener una placa diana, donde dicha placa  
 diana tiene múltiples puntos de depósito; colocar una placa diana en el soporte de la placa diana; proporcionar un  
 dispositivo de transferencia para transferir de forma automática la herramienta de selección de la posición de  
 transferencia del dispositivo de colocación a una posición por encima de uno de los puntos de depósito de la placa  
 35 diana, y para hacer descender la herramienta de selección de manera que la muestra de la colonia de microorganismos  
 presente en la herramienta de selección entre en contacto con la placa diana, mover la herramienta de selección en  
 un plano paralelo al plano de la placa diana de manera que la muestra de la colonia de microorganismos se deposite  
 en el punto de depósito, en particular, cubriendo como máximo aproximadamente la mitad de uno de los puntos de  
 depósito mencionados de la placa diana; y elevar dicha herramienta de selección de la placa diana. Al realizar el  
 depósito de la muestra de forma automática, se puede obtener un depósito más reproducible y preciso de la muestra  
 en el punto de depósito que al depositar una muestra de forma manual. Además, parece que cuando la muestra cubre  
 como máximo aproximadamente la mitad de uno de los puntos de depósito mencionados de la placa diana, los  
 resultados del análisis, obtenidos del instrumento MALDI de la parte del punto de depósito que inicialmente no estaba  
 cubierto con la muestra son, sorprendentemente, extremadamente más precisos que los resultados del análisis,  
 obtenidos del instrumento MALDI de la parte del punto de depósito que inicialmente estaba cubierto con la muestra.  
 Si bien los inventores no desean limitarse a una teoría en particular, se cree que la cristalización que tiene lugar  
 después de que una gota de material de matriz se recubre sobre la muestra que cubre parte del punto de depósito  
 garantiza que también la parte del punto de depósito que no está cubierta contenga una cantidad de material de  
 muestra, y que esta cantidad sea extremadamente adecuada para proporcionar excelentes resultados de análisis. En  
 caso de que las instrucciones de procesamiento para una colonia de microorganismos seleccionada indiquen obtener  
 una gota de dicha suspensión de muestra y transferir dicha gota a dicha placa diana, el método puede comprender  
 las siguientes etapas automáticas: proporcionar una herramienta de pipeteado en dicho dispositivo de herramienta de  
 selección y proporcionar un dispositivo de colocación con un soporte de la herramienta de pipeteado para sostener  
 dicha herramienta de pipeteado, donde dicho dispositivo de colocación se dispone para colocar dicha herramienta de  
 pipeteado en una posición inicial encima del tubo de suspensión y para hacer descender y elevar de forma automática  
 la herramienta de pipeteado hacia el interior y exterior de la suspensión y para colocar la herramienta de pipeteado en  
 una posición de transferencia, respectivamente; colocar dicha herramienta de pipeteado en dicho soporte de la  
 herramienta de pipeteado del dispositivo de colocación; al colocar dicho dispositivo de colocación la herramienta de  
 pipeteado en la posición inicial encima del tubo de suspensión, hacer descender la herramienta de pipeteado hacia el  
 interior de la suspensión en dicho tubo de suspensión, hacer funcionar la herramienta de pipeteado para seleccionar  
 una cantidad de suspensión, elevar la herramienta de pipeteado con dicha cantidad de suspensión hasta la posición  
 de transferencia; donde dicha herramienta de pipeteado comprende una cámara presurizable encerrada por una  
 válvula controlada para contener la cantidad de medio de suspensión; proporcionar un soporte de la placa diana para  
 sostener una placa diana, donde dicha placa diana tiene múltiples puntos de depósito; colocar una placa diana en el  
 soporte de la placa diana; proporcionar un dispositivo de transferencia para transferir de forma automática la  
 herramienta de pipeteado de la posición de transferencia del dispositivo de colocación a una posición encima de uno

de los puntos de depósito de la placa diana, y para hacer descender la herramienta de pipeteado hasta una distancia predefinida encima de la placa diana, presurizar la cámara a una presión en un intervalo de aproximadamente 0,5 bar a 1,1 bar, y abrir la válvula durante un período tal que se deposite una gota de suspensión con un volumen en un intervalo de aproximadamente 0,5 a 3,0 µl en el punto de depósito, en particular, cubriendo como máximo aproximadamente la mitad de uno de los puntos de depósito mencionados de la placa diana; y elevar dicha herramienta de pipeteado de la placa diana. Dependiendo de las propiedades del microorganismo específico, por ejemplo, su pegajosidad, el valor de presión y el momento de apertura pueden ajustarse para obtener una pequeña gota de suspensión que puede prepararse de forma reproducible y que, como resultado del proceso automático, puede depositarse de forma precisa en la placa diana.

A los efectos de evitar la contaminación cruzada, la forma de la herramienta de pipeteado, en particular, la punta dispensadora de esta, puede ser tal que el depósito de la gota de suspensión en la placa diana tenga lugar sin salpicaduras. Parece que, dependiendo del tipo de microorganismo utilizado, y particularmente el espesor de este, además de elegir una presión correcta en el intervalo mencionado anteriormente y el momento de apertura de la válvula en el intervalo mencionado anteriormente, una forma adecuada de la herramienta de pipeteado puede garantizar que se pueda depositar una gota de suspensión sin salpicaduras.

El método puede comprender la etapa de proporcionar una marca de identificación en la placa diana y, opcionalmente, proporcionar una marca de identificación en los puntos de depósito de dicha placa diana, y la etapa de almacenar la marca de identificación de dicha placa diana y los puntos de depósito junto con las propiedades de la suspensión con un enlace con la identidad de la placa de cultivo de la que se obtuvo la colonia de microorganismos seleccionada en la memoria de dicha computadora de control central, el método no solamente puede funcionar automáticamente de manera extremadamente eficaz sino que también se mejora el procesamiento correcto y rápido de los resultados del análisis obtenidos.

Se describe además un método para la preparación automática de una suspensión de una muestra de microorganismos, donde dicho método comprende las etapas de:

- proporcionar una plataforma para una placa de cultivo que comprende dicho microorganismo;
- colocar una placa de cultivo que comprende dicho microorganismo en la plataforma;
- proporcionar una primera herramienta de selección y proporcionar un dispositivo de colocación con un soporte de la herramienta de selección para sostener una herramienta de selección, donde dicho dispositivo de colocación se dispone para colocar una herramienta de selección en una posición inicial por encima de la placa de cultivo y para hacer descender y elevar de forma automática una herramienta de selección hacia y en sentido contrario a la placa de cultivo y para colocar una herramienta de selección en una posición de transferencia, respectivamente;
- colocar dicha primera herramienta de selección en dicho soporte de la herramienta de selección del dispositivo de colocación;
- mediante la colocación de dicho dispositivo de colocación de la primera herramienta de selección en la posición inicial por encima de la placa de cultivo, hacer descender de forma automática la primera herramienta de selección hacia la placa de cultivo para que entre en contacto con el microorganismo para seleccionar una muestra de dicho microorganismo, elevar de forma automática la primera herramienta de selección con dicha muestra del microorganismo en sentido contrario a la placa de cultivo hacia la posición de transferencia;
- proporcionar un soporte del tubo de suspensión para sostener un tubo de suspensión;
- colocar un tubo de suspensión en el soporte del tubo de suspensión;
- proporcionar un dispensador del medio de suspensión automático para dispensar automáticamente un medio de suspensión en un tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión;
- al suministrar de forma automática el dispensador automático una cantidad inicial de medio de suspensión en el tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión;
- proporcionar un dispositivo de transferencia para transferir de forma automática una herramienta de selección por la posición de transferencia del dispositivo de colocación a una posición por encima de un tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión, y para hacer descender y elevar una herramienta de selección hacia y en sentido contrario a un medio de suspensión contenido en un tubo de suspensión, y para colocar una herramienta de selección en una posición de espera por encima de un tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión, respectivamente;
- al transferir de forma automática dicho dispositivo de transferencia dicha primera herramienta de selección con la muestra del microorganismo de la posición de transferencia del dispositivo de colocación a una posición por encima del tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión, hacer descender dicha primera herramienta de selección con la muestra del microorganismo en el medio de suspensión contenido en el tubo de suspensión; al hacer oscilar el dispositivo de transferencia la primera herramienta de selección en un movimiento vertical lineal durante un período de tiempo mientras que la primera herramienta de selección con la muestra de dicho microorganismo se sumerge en el medio de suspensión; y después de que ha transcurrido dicho período de tiempo, elevar la primera herramienta de selección en sentido contrario al medio de suspensión contenido en el tubo de suspensión hacia la posición de espera;
- proporcionar un medidor de turbidez para realizar mediciones de la turbidez de un medio de suspensión contenido en un tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión;

- al menos después de transcurrido el período de tiempo durante el cual la herramienta de selección oscila medir la turbidez del medio de suspensión contenido en el tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión mediante el medidor de turbidez y proporcionar un valor de medición final que indica la turbidez medida;
- 5 - proporcionar un controlador conectado de forma comunicativa al dispositivo de colocación, el dispositivo de transferencia, el dispensador del medio de suspensión automático y el medidor de turbidez para controlar de forma automática el movimiento del dispositivo de colocación, el movimiento del dispositivo de transferencia, el funcionamiento del dispensador del medio de suspensión automático y el funcionamiento del medidor de turbidez, respectivamente;
- 10 - mediante dicho controlador:
  - a) determinar si el valor de medición final se encuentra por encima de un primer valor umbral previamente almacenado en una memoria del controlador, en caso afirmativo, realizar la etapa b); o si el valor de medición final es idéntico o inferior al primer valor de umbral e idéntico o superior al segundo valor de umbral previamente almacenado en la memoria del controlador, donde dicho primer valor de umbral es igual o superior al segundo valor de umbral, en caso afirmativo, realizar la etapa c); o si el valor de medición final es inferior al segundo valor de umbral, en caso afirmativo, realizar la etapa d);
  - 15 b) controlar el dispensador del medio de suspensión automático para suministrar una cantidad adicional de medio de suspensión en el tubo de suspensión;
  - 20 c) proporcionar una señal de que se puede retirar el tubo de suspensión con la suspensión del soporte del tubo de suspensión para el procesamiento adicional; o
  - 25 d) proporcionar una herramienta de selección adicional; colocar dicha herramienta de selección adicional en dicho soporte de la herramienta de selección del dispositivo de colocación; al colocar dicho dispositivo de colocación la herramienta de selección adicional en la posición inicial encima de la placa de cultivo, hacer descender de forma automática la herramienta de selección adicional hacia la placa de cultivo en contacto con el microorganismo para seleccionar una muestra adicional de dicho microorganismo, elevar de forma automática la herramienta de selección adicional con dicha muestra del microorganismo de la placa de cultivo a la posición de transferencia; al transferir de forma automática el dispositivo de transferencia dicha herramienta de selección adicional con la muestra adicional del microorganismo de la posición de transferencia del dispositivo de colocación a una posición encima del tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión, hacer descender dicha herramienta de selección adicional con la muestra adicional del microorganismo en el medio de suspensión contenido en el tubo de suspensión; al oscilar el dispositivo de transferencia la herramienta de selección adicional en un movimiento vertical lineal durante un período de tiempo durante el cual la herramienta de selección adicional con la muestra adicional de dicho microorganismo se sumerge en el medio de suspensión; y después de transcurrido dicho período de tiempo elevar la herramienta de selección adicional del medio de suspensión contenido en el tubo de suspensión hasta la posición de espera; al menos después de transcurrido el período de tiempo durante el cual la herramienta de selección adicional oscila medir la turbidez del medio de suspensión contenido en el tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión mediante el medidor de turbidez y proporcionar un valor de medición final adicional que indica la turbidez medida; y realizar la etapa a). De esta manera, es posible preparar una suspensión de una muestra de un microorganismo de manera automática avanzada mientras que, mediante el controlador y el medidor de turbidez, es posible proporcionar un tubo de suspensión que contiene un medio de suspensión que contiene una cantidad de microorganismo que siempre es suficiente (y reproducible) para realizar un análisis correcto del microorganismo.

El controlador se puede ubicar de manera que la etapa de medir la turbidez del medio de suspensión contenido en el tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión mediante el medidor de turbidez se realice además durante el período de tiempo durante el cual oscila la herramienta de selección, en donde el medidor de turbidez se ubica para proporcionar un valor de medición en línea que indica la turbidez medida durante el período de tiempo durante el cual oscila la herramienta de selección al controlador. De esta manera, se puede obtener una determinación automática extremadamente rápida de la cantidad de microorganismo en la suspensión. En particular, si durante la oscilación el valor de medición en línea de la turbidez es igual o inferior al primer valor de umbral e igual o superior al segundo valor de umbral, el controlador puede controlar el movimiento del dispositivo de transferencia, de manera que la herramienta de selección se eleve hasta la posición de espera, y el controlador puede proporcionar además una señal de que se puede retirar el tubo de suspensión con la suspensión del soporte del tubo de suspensión para el procesamiento adicional.

El controlador se puede ubicar de manera de controlar el medidor de la turbidez que la etapa de medir la turbidez del medio de suspensión contenido en el tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión mediante el medidor de turbidez se inicie antes de sumergir la herramienta de selección en el medio de suspensión contenido en el tubo de suspensión. De esta manera, por ejemplo, es posible comprobar si el medio de suspensión inicial utilizado no está contaminado. Esto se puede realizar, por ejemplo, al realizar una medición de la turbidez de un tubo de suspensión y comparar el valor obtenido con un valor predeterminado que indica que la suspensión no está contaminada. En caso de que la diferencia supere un valor de umbral, entonces, por ejemplo, se puede proporcionar una señal de advertencia que indica que la suspensión está contaminada.

5 El método puede comprender además la etapa de proporcionar un soporte del tubo de suspensión para sostener un tubo de suspensión, un soporte giratorio del tubo de suspensión para girar un tubo de suspensión sostenido por el soporte giratorio del tubo de suspensión, la etapa de ubicar el controlador de manera que se conecte de forma comunicativa al soporte giratorio del tubo de suspensión para controlar la rotación del soporte del tubo de suspensión, y la etapa de ubicar el controlador de manera que el tubo de suspensión gire durante la medición de la turbidez del medio de suspensión contenido en el tubo de suspensión. Dicha rotación del tubo de suspensión permite que se realicen las mediciones de turbidez en diversas posiciones dentro del tubo de suspensión que están separadas de forma giratoria entre sí, lo que genera una medición final más correcta de la turbidez de la suspensión. La rotación como tal no es necesaria para liberar la muestra de la herramienta de selección, el movimiento vertical lineal de oscilación de la herramienta de selección puede ser más que suficiente para liberar la muestra.

15 Si bien se puede utilizar una herramienta de selección adicional que es distinta de la primera herramienta de selección, donde el método se puede realizar de manera económica cuando en la etapa d) la primera herramienta de selección se proporciona como una segunda herramienta de selección; y la colocación de dicha herramienta de selección adicional en dicho soporte de herramienta de selección del dispositivo de colocación se puede realizar mediante el dispositivo de transferencia controlado por el controlador.

20 La cantidad adicional del medio de suspensión se puede determinar mediante el controlador en función de la cantidad inicial del medio de suspensión, el valor de medición final y el valor del primer y/o segundo valor de umbral. Esto hace posible utilizar medio de suspensión adicional apenas suficiente según sea necesario y, por lo tanto, en esta realización, se puede utilizar la menor cantidad posible de medio de suspensión. En caso de que el valor medido indique que la cantidad de microorganismos es demasiado baja, el sistema de control puede controlar la herramienta de selección para obtener una muestra adicional de la misma colonia seleccionada, y se puede repetir el proceso.

25 Dado que la herramienta de selección puede oscilar en un movimiento lineal vertical solamente, la dimensión del tubo de suspensión puede ser relativamente pequeña. Esto hace posible que el controlador se pueda ubicar para controlar el dispensador del medio de suspensión automático, de manera que la cantidad inicial suministrada sea de aproximadamente 0,5 - 2 ml, preferiblemente aproximadamente 1 ml. Dicha cantidad relativamente pequeña del medio de suspensión es suficiente para la preparación de una suspensión correcta de una muestra de microorganismos. En dicho método para la preparación automática de una suspensión de una muestra de microorganismos, es posible utilizar como tubo de suspensión un tubo de suspensión con una sección transversal sustancialmente circular con un diámetro de aproximadamente 6 a aproximadamente 12 mm, preferiblemente aproximadamente 10 mm, que es relativamente pequeño en comparación con los tubos tradicionales que tienen un diámetro de aproximadamente 16 mm. Con dicho tubo de suspensión relativamente pequeño, se obtiene una liberación correcta de la muestra de la herramienta de selección cuando el controlador se ubica para controlar la oscilación del dispositivo de transferencia, de manera que la herramienta de selección oscile a una frecuencia de entre aproximadamente 5 Hz a aproximadamente 120 Hz, preferiblemente aproximadamente 30 Hz a aproximadamente 90 Hz, más preferiblemente aproximadamente 50 Hz. Preferiblemente, el controlador se dispone para controlar la oscilación del dispositivo de transferencia, de manera que la herramienta de selección oscile con una amplitud de aproximadamente 0.5 mm a aproximadamente 4 mm, preferiblemente aproximadamente 2 mm a aproximadamente 3 mm, lo que genera una liberación óptima de la muestra de la herramienta de selección. En caso de que el controlador se disponga para controlar la oscilación del dispositivo de transferencia de manera que el período de tiempo durante el cual la herramienta de selección oscila sea de aproximadamente 3 segundos hasta aproximadamente 10 segundos, preferiblemente aproximadamente 6 segundos, parece que prácticamente en todos los casos se puede liberar toda la muestra de la herramienta de selección.

50 Se describe, además, un aparato para la preparación automática de una suspensión de una muestra de microorganismos para realizar un método para localizar y seleccionar una colonia de microorganismos en una placa de cultivo e identificar los microorganismos en dicha colonia seleccionada usando MALDI o para realizar una etapa de un método para la preparación automática de una suspensión de una muestra de microorganismos de acuerdo con los métodos, donde dicho aparato comprende:

- 55 - una plataforma para una placa de cultivo que comprende dicho microorganismo;
- una primera herramienta de selección y una adicional y un dispositivo de colocación con un soporte de la herramienta de selección para sostener una herramienta de selección, donde dicho dispositivo de colocación se dispone para colocar una herramienta de selección en una posición inicial por encima de la placa de cultivo y para hacer descender y elevar de forma automática una herramienta de selección hacia y en sentido contrario a la placa de cultivo y para colocar una herramienta de selección en una posición de transferencia, respectivamente;
- 60 - un soporte del tubo de suspensión para sostener un tubo de suspensión;
- un dispensador del medio de suspensión automático para dispensar automáticamente un medio de suspensión en un tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión;
- 65 - un dispositivo de transferencia para transferir de forma automática una herramienta de selección de la posición de transferencia del dispositivo de colocación a una posición por encima de un tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión, y para hacer descender y elevar una herramienta de

- selección hacia y en sentido contrario a un medio de suspensión contenido en un tubo de suspensión, y para colocar una herramienta de selección en una posición de espera por encima de un tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión, respectivamente, donde dicho dispositivo de transferencia se dispone además para hacer oscilar una herramienta de selección en un movimiento vertical lineal durante un período de tiempo;
- 5 - un medidor de turbidez para realizar mediciones de la turbidez de un medio de suspensión contenido en un tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión y para proporcionar un valor de medición final que indique la turbidez medida;
- 10 - un controlador conectado de forma comunicativa al dispositivo de colocación, el dispositivo de transferencia, el dispensador del medio de suspensión automático y el medidor de turbidez para controlar de forma automática el movimiento del dispositivo de colocación, el movimiento del dispositivo de transferencia, el funcionamiento del dispensador del medio de suspensión automático y el funcionamiento del medidor de turbidez, respectivamente;
- 15 - donde dicho controlador se dispone para:
- a) determinar si el valor de medición final se encuentra por encima de un primer valor umbral previamente almacenado en una memoria del controlador, en caso afirmativo, dicho controlador se dispone para realizar la etapa b);
- 20 o si el valor de medición final es idéntico o inferior al primer valor de umbral e idéntico o superior al segundo valor de umbral previamente almacenado en la memoria del controlador, donde dicho primer valor de umbral es igual o superior al segundo valor de umbral, en caso afirmativo, dicho controlador se dispone para realizar la etapa c); o si el valor de medición final es inferior al segundo valor de umbral, en caso afirmativo, dicho controlador se dispone para realizar la etapa d);
- 25 b) controlar el dispensador del medio de suspensión automático para suministrar una cantidad adicional de medio de suspensión en el tubo de suspensión;
- c) proporcionar una señal de que se puede retirar el tubo de suspensión con la suspensión del soporte del tubo de suspensión para el procesamiento adicional; o
- 30 d) colocar dicha herramienta de selección adicional en dicho soporte de la herramienta de selección del dispositivo de colocación; al colocar dicho dispositivo de colocación la herramienta de selección adicional en la posición inicial encima de la placa de cultivo, hacer descender de forma automática la herramienta de selección adicional hacia la placa de cultivo en contacto con el microorganismo para seleccionar una muestra adicional de dicho microorganismo, elevar de forma automática la herramienta de selección adicional con dicha muestra del microorganismo en sentido contrario a la placa de cultivo hacia la posición de transferencia; al transferir de forma automática el dispositivo de transferencia dicha herramienta de selección adicional con la muestra adicional del microorganismo de la posición de transferencia del dispositivo de colocación a una posición encima del tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión, hacer descender dicha herramienta de selección adicional con la muestra adicional del microorganismo en el medio de suspensión contenido en el tubo de suspensión;
- 35 al oscilar el dispositivo de transferencia la herramienta de selección adicional en un movimiento vertical lineal durante un período de tiempo durante el cual la herramienta de selección adicional con la muestra adicional de dicho microorganismo se sumerge en el medio de suspensión; y después de transcurrido dicho período de tiempo elevar la herramienta de selección adicional del medio de suspensión contenido en el tubo de suspensión hasta la posición de espera; al menos después de transcurrido el período de tiempo durante el cual la herramienta de selección adicional oscila medir la turbidez del medio de suspensión contenido en el tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión mediante el medidor de turbidez y proporcionar un valor de medición final adicional que indica la turbidez medida; y realizar la etapa a).
- 40
- 45
- 50 El controlador se puede disponer de manera de controlar el medidor de la turbidez, de manera que la medición de la turbidez del medio de suspensión contenido en el tubo de suspensión sostenido por el soporte del tubo de suspensión mediante el medidor de turbidez se inicie antes de sumergir la herramienta de selección en el medio de suspensión contenido en el tubo de suspensión.
- 55 El soporte del tubo de suspensión para sostener un tubo de suspensión puede ser un soporte giratorio del tubo de suspensión para girar un tubo de suspensión sostenido por el soporte giratorio del tubo de suspensión, donde el controlador se dispone para que se conecte de forma comunicativa al soporte giratorio del tubo de suspensión para controlar la rotación del soporte del tubo de suspensión, y donde dicho controlador se puede disponer para que el tubo de suspensión gire durante la medición de la turbidez del medio de suspensión contenido en el tubo de suspensión.
- 60 En el aparato, se puede proporcionar la primera herramienta de selección como una segunda herramienta de selección; y dicho controlador se puede disponer para controlar el dispositivo de transferencia para colocar dicha segunda herramienta de selección en dicho soporte de la herramienta de selección del dispositivo de colocación.
- 65 Preferiblemente, el controlador se dispone para determinar la cantidad adicional de medio de suspensión en función de la cantidad inicial de medio de suspensión, el valor de medición final y el valor del primer y/o segundo valor de

umbral. En particular, el controlador puede disponerse para controlar el dispensador del medio de suspensión automático de manera que la cantidad inicial suministrada sea de aproximadamente 0,5-2 ml, preferiblemente aproximadamente 1 ml. El controlador se puede disponer para controlar la oscilación del dispositivo de transferencia de manera que la herramienta de selección oscile a una frecuencia de entre aproximadamente 5 Hz y aproximadamente 120 Hz, preferiblemente aproximadamente 30 Hz y aproximadamente 90Hz, más preferiblemente aproximadamente 50 Hz. Además, el controlador se puede disponer para controlar la oscilación del dispositivo de transferencia de manera que la herramienta de selección oscile con una amplitud de aproximadamente 0.5 mm a aproximadamente 4 mm, preferiblemente aproximadamente 2 mm a aproximadamente 3 mm, y para controlar la oscilación del dispositivo de transferencia de manera que el período de tiempo durante el cual la herramienta de selección oscila sea de aproximadamente 3 segundos a aproximadamente 10 segundos, preferiblemente aproximadamente 6 segundos.

El tubo de suspensión puede tener una sección transversal sustancialmente circular con un diámetro de aproximadamente 6 a aproximadamente 12 mm, preferiblemente aproximadamente 10 mm.

Cuando el aparato comprende un dispositivo de colocación y retiro automático de la placa de cultivo para colocar y retirar de forma automática una placa de cultivo que comprende dicho microorganismo en y desde la plataforma, respectivamente, donde dicho controlador se dispone para que se conecte de forma comunicativa al dispositivo de colocación y retiro automático de la placa de cultivo para controlar el funcionamiento del dispositivo de colocación y retiro automático de la placa de cultivo, y para colocar de forma automática una placa de cultivo que comprende dicho microorganismo en la plataforma, y cuando el aparato comprende un dispositivo de colocación y retiro automático del tubo de suspensión para colocar y retirar de forma automática un tubo de suspensión en y desde el soporte del tubo de suspensión, respectivamente, donde dicho controlador se dispone para que se conecte de forma comunicativa al dispositivo de colocación y retiro automático del tubo de suspensión para controlar el funcionamiento del dispositivo de colocación y retiro automático del tubo de suspensión, y para colocar de forma automática un tubo de suspensión en el soporte del tubo de suspensión. En este caso, es preferible que el controlador se disponga de manera que se permita retirar de forma automática una placa de cultivo de la plataforma mediante el dispositivo de colocación y retiro automático de la placa de cultivo solamente después de que se haya proporcionado la señal de que se puede retirar el tubo de suspensión con la suspensión del soporte del tubo de suspensión para el procesamiento adicional. Además, es preferible que el controlador se disponga para retirar de forma automática un tubo de suspensión del soporte del tubo de suspensión mediante el dispositivo de colocación y retiro automático del tubo de suspensión solamente después de que se haya proporcionado la señal de que se puede retirar el tubo de suspensión con la suspensión del soporte del tubo de suspensión para el procesamiento adicional.

El método comprende depositar de forma automática al menos una parte de la primera muestra en al menos uno de los puntos de depósito de una placa diana para MALDI de manera que la muestra cubra como máximo aproximadamente la mitad de al menos uno de los puntos de depósito de la placa diana. Se ha descubierto que cuando la muestra cubre como máximo aproximadamente la mitad de uno de los puntos de depósito mencionados de la placa diana, los resultados del análisis, obtenidos del instrumento MALDI de la parte del punto de depósito que inicialmente no estaba cubierto con la muestra son, sorprendentemente, extremadamente más precisos que los resultados del análisis, obtenidos del instrumento MALDI de la parte del punto de depósito que inicialmente estaba cubierto con la muestra. Se supone que la cristalización que tiene lugar después de que una gota de material de matriz se recubre sobre la muestra que cubre parte del punto de depósito garantiza que también la parte del punto de depósito que no está cubierta contenga una cantidad de material de muestra, y que esta cantidad sea extremadamente adecuada para proporcionar excelentes resultados de análisis. Los procesos físicos o químicos que causan este efecto, actualmente, no son claros, pero tal vez pueda lograrse una mayor claridad cuando se conozcan los procesos fundamentales subyacentes de MALDI. La muestra de la suspensión se puede depositar en un punto de depósito de la placa diana en forma de una gota con un volumen en un intervalo de aproximadamente 0,5 a 3,0 µl.

Se describe, además, un método para depositar de forma automática una gota de una suspensión que contiene una muestra de una colonia de microorganismos en un punto de depósito de una placa diana para MALDI, en donde el método comprende las siguientes etapas automáticas:

- proporcionar una herramienta de pipeteado en un dispositivo de la herramienta de selección y proporcionar un dispositivo de colocación con un soporte de la herramienta de pipeteado para sostener dicha herramienta de pipeteado, donde dicho dispositivo de colocación se dispone para colocar dicha herramienta de pipeteado en una posición inicial por encima de un tubo de suspensión que sostiene dicha suspensión que contiene una muestra de una colonia de microorganismos, y para hacer descender y elevar de forma automática la herramienta de pipeteado hacia el interior y exterior de la suspensión y para colocar la herramienta de pipeteado en una posición de transferencia, respectivamente;
- colocar dicha herramienta de pipeteado en dicho soporte de la herramienta de pipeteado del dispositivo de colocación;
- al colocar dicho dispositivo de colocación la herramienta de pipeteado en la posición inicial por encima del tubo de suspensión, hacer descender la herramienta de pipeteado hacia el interior de la suspensión en dicho tubo de suspensión, hacer funcionar la herramienta de pipeteado para seleccionar una cantidad de suspensión, elevar la herramienta de pipeteado con dicha cantidad de suspensión hasta la posición de

transferencia; donde dicha herramienta de pipeteado comprende una cámara presurizable encerrada por una válvula controlada para contener la cantidad de medio de suspensión;

- proporcionar un soporte de la placa diana para sostener la placa diana, donde dicha placa diana tiene múltiples puntos de depósito;

5 - colocar la placa diana en el soporte de la placa diana;

- proporcionar un dispositivo de transferencia para transferir de forma automática la herramienta de pipeteado de la posición de transferencia del dispositivo de colocación a una posición por encima de uno de los puntos de depósito de la placa diana, y para hacer descender la herramienta de selección hasta una distancia predefinida por encima de la placa diana, presurizar la cámara hasta una presión en un intervalo de aproximadamente 0,5 bar a 1,1 bar, y abrir la válvula durante un período tal que se deposite una gota de suspensión con un volumen en un intervalo de aproximadamente 0,5 a 3,0 µl en uno de los puntos de depósito mencionados; y

10 - elevar dicha herramienta de pipeteado de la placa diana. Preferiblemente, la forma de la herramienta de pipeteado es tal que el depósito de la gota de suspensión en la placa diana tenga lugar sin salpicaduras. En particular, el método puede comprender presurizar la cámara a una presión en un intervalo de aproximadamente 0,5 bar a 1,1 bar, y abrir la válvula durante un período tal que se deposite una gota de suspensión con un volumen en un intervalo de aproximadamente 0,5 a 3,0 µl como máximo en la mitad de uno de los puntos de depósito mencionados.

20 Se ha descubierto que cuando la muestra cubre como máximo aproximadamente la mitad de uno de los puntos de depósito mencionados de la placa diana, los resultados del análisis, obtenidos del instrumento MALDI de la parte del punto de depósito que inicialmente no estaba cubierto con la muestra son, sorprendentemente, extremadamente más precisos que los resultados del análisis, obtenidos del instrumento MALDI de la parte del punto de depósito que inicialmente estaba cubierto con la muestra. Se supone que la cristalización que tiene lugar después de que una gota de material de matriz se recubre sobre la muestra que cubre parte del punto de depósito garantiza que también la parte del punto de depósito que no está cubierta contenga una cantidad de material de muestra, y que esta cantidad sea extremadamente adecuada para proporcionar excelentes resultados de análisis. Los procesos físicos o químicos que causan este efecto, actualmente, no son claros, pero tal vez pueda lograrse una mayor claridad cuando se conozcan los procesos fundamentales subyacentes de MALDI.

30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La descripción se explicará de manera adicional con referencia a la Figura 1, en la cual se muestra un ejemplo no taxativo de un aparato, la Figura 1 se usará además para explicar los ejemplos de realizaciones de los métodos descritos.

35 Descripción detallada de la divulgación con referencia a la Figura 1

En la presente invención, se usa MALDI o MALDI-TOF- MS para identificar microorganismos. En una operación MALDI TOF MS, se localiza o deposita una muestra de una colonia de microorganismos en una placa diana que se mantiene en una posición fija en el instrumento MALDI. Dicha placa diana tiene múltiples puntos de depósito (por ejemplo, de 40 24 a 384 puntos de depósito en una única placa diana) y estos puntos de depósito tienen una orientación fija con respecto a los bordes de la placa diana. La placa diana se ubica en una plataforma X-Y de manera de poder depositar una muestra obtenida de una colonia de microorganismos en un punto de depósito seleccionado, en donde la ubicación en la que se ha depositado una muestra específica se indica según los parámetros X-Y y se almacena en una memoria de una computadora de control central.

45 Si bien no se ilustra en detalle en la Figura 1, la placa diana se ubica debajo de una vía de transferencia 18 en una posición indicada por B. Una muestra se puede transferir a lo largo de la vía de transferencia 18 desde una placa de cultivo 3 y/o un tubo de suspensión 11 hasta arriba de la placa diana en una posición B, donde la muestra se hace descender para que se deposite en un punto de depósito de la placa diana.

50 Si bien la descripción se describirá en detalle más adelante con referencia a la preparación de una suspensión que contiene una muestra y el depósito de una gota de dicha suspensión en un punto de depósito de una placa diana, la presente descripción también se refiere a depositar directamente una muestra obtenida (seleccionada) de una placa de cultivo en un punto de depósito de una placa diana.

55 En general, en el método mencionado anteriormente, se ubica y detecta una colonia de microorganismos de forma automática en una placa de cultivo. Se obtiene una muestra de dicha colonia de microorganismos seleccionada de forma automática, por ejemplo, mediante una herramienta de selección que se pone en contacto con la colonia. Al menos una parte de dicha muestra de dicha colonia de microorganismos seleccionada se deposita directamente en 60 una placa diana de forma automática, al hacer descender la herramienta de selección de manera que la muestra de la colonia de microorganismos presente en la herramienta de selección entre en contacto con la placa diana, y mover la herramienta de selección en un plano paralelo al plano de la placa diana de manera que la muestra de la colonia de microorganismos se deposite en el punto de depósito, en particular, cubriendo como máximo aproximadamente la mitad de uno de los puntos de depósito mencionados de la placa diana. Luego, la placa diana con dicha muestra se transfiere de forma automática a un aparato para realizar MALDI para la identificación de dicha muestra de dicha 65 colonia de microorganismos seleccionada.

Más detalladamente, este método de la descripción comprende las siguientes etapas automáticas:

- 5 - proporcionar una primera herramienta de selección y proporcionar un dispositivo de colocación con un soporte de la herramienta de selección para sostener una herramienta de selección, donde dicho dispositivo de colocación se dispone para colocar una herramienta de selección en una posición inicial por encima de la ubicación obtenida de la colonia de microorganismos seleccionada en la placa de cultivo y para hacer descender y elevar de forma automática una herramienta de selección hacia y en sentido contrario a la placa de cultivo y para colocar una herramienta de selección en una posición de transferencia, respectivamente;
- 10 - colocar dicha primera herramienta de selección en dicho soporte de la herramienta de selección del dispositivo de colocación;
- 15 - mediante la colocación de dicho dispositivo de colocación de la primera herramienta de selección en la posición inicial por encima de la ubicación obtenida de la colonia de microorganismos seleccionada en la placa de cultivo, hacer descender de forma automática la primera herramienta de selección hacia la placa de cultivo para que entre en contacto con el microorganismo para seleccionar una muestra de dicho microorganismo, elevar de forma automática la primera herramienta de selección con dicha muestra del microorganismo en sentido contrario a la placa de cultivo hacia la posición de transferencia;
- 20 - proporcionar un soporte de la placa diana para sostener una placa diana, donde dicha placa diana tiene múltiples puntos de depósito;
- 25 - colocar una placa diana en el soporte de la placa diana;
- 30 - proporcionar un dispositivo de transferencia para transferir de forma automática la herramienta de selección de la posición de transferencia del dispositivo de colocación hasta una posición encima de uno de los puntos de depósito de la placa diana, y para hacer descender la herramienta de selección de manera que la muestra de la colonia de microorganismos presente en la herramienta de selección entre en contacto con la placa diana, mover la herramienta de selección en un plano paralelo al plano de la placa diana de manera que la muestra de la colonia de microorganismos se deposite en el punto de depósito, en particular, cubriendo como máximo aproximadamente la mitad de uno de los puntos de depósito mencionados de la placa diana; y elevar dicha herramienta de selección desde la placa diana. Luego, una gota de una solución de matriz MALDI se recubre de forma automática sobre la cantidad de la muestra depositada en la placa diana.

35 Como se describe en la presente, en caso de que la misma colonia de microorganismos deba someterse a otro análisis o prueba, tal como, pero sin limitarse a, una prueba de susceptibilidad de antibiótico (AST), se puede obtener una segunda muestra de dicha colonia de microorganismos seleccionada de manera similar a obtener la muestra inicial. Dado que la ubicación de la colonia de microorganismos en la placa de cultivo ya se ha seleccionado, y, por lo tanto, es «conocida» por la computadora de control central, es posible obtener de manera fácil y reproducible una segunda muestra de la misma colonia. Luego, al menos una parte de la segunda muestra de dicha colonia de microorganismos seleccionada se transfiere y deposita en una placa de cultivo de prueba que, por ejemplo, puede colocarse de forma automática en otra posición debajo de la vía de transferencia 18. Luego, dicha placa de cultivo de prueba se transfiere de forma automática a un aparato para realizar una prueba de susceptibilidad u otro análisis adicional.

40 Dado que para realizar caracterización e identificación de microorganismos normalmente se cultivan múltiples colonias en una placa de cultivo, y, además, se utilizan múltiples placas de cultivo distintas, la invención proporciona la posibilidad de identificar cada placa de cultivo por separado, por ejemplo, mediante un código de barras, y, además, se selecciona cada colonia de interés en una única placa de cultivo y se le proporciona una marca de identificación.

45 Hasta el momento, la etapa automática de localizar y seleccionar una colonia de microorganismos en una placa de cultivo, el método según la invención comprende una etapa de proporcionar una placa de cultivo que comprende una cantidad de colonias de microorganismos, obtener una imagen inicial de dicha placa de cultivo que incluye todas las colonias de microorganismos, mostrar dicha imagen inicial de dicha placa de cultivo que incluye todas las colonias de microorganismos en una pantalla, y seleccionar al menos una colonia de microorganismos en dicha imagen inicial. De esta manera, un investigador o analista puede seleccionar las colonias de interés en función del conocimiento y formación exhaustivos. Dado que a cada placa de cultivo se le proporciona una identificación individual que identifica dicha placa de cultivo, tal como un código de barras, se almacena la imagen inicial de dicha placa de cultivo que incluye todas las colonias, y se almacena información relacionada con dicha al menos una colonia de microorganismos seleccionada (preferiblemente con enlaces proporcionados en la imagen inicial (electrónica)), almacenar toda dicha información e identificaciones de la placa de cultivo en una memoria de una computadora de control central permite un muy correcto procesamiento adicional. De esta manera, la única operación manual es la acción de seleccionar las colonias interesantes, mientras que se procesan todos los datos pertinentes de forma automática. Opcionalmente, el investigador o analista puede ingresar de forma manual instrucciones de procesamiento con respecto al procesamiento al que debe someterse una colonia de microorganismos seleccionada de dicha placa de cultivo, donde dichas instrucciones de procesamiento también se almacenan en dicha memoria de dicha computadora de control central para su posterior uso. Después de esta acción manual, se realizan todas las etapas adicionales de forma completamente automática de manera confiable y eficaz. Para este procesamiento adicional automático, la placa de cultivo se ubica de forma automática en una plataforma para una placa de cultivo de un dispositivo de la herramienta de selección que comprende un dispositivo de imagenología. Se obtiene una imagen de dicha placa de cultivo ubicada en dicho dispositivo de la herramienta de selección, y junto con la identificación de dicha placa de cultivo, es posible comparar esta imagen obtenida por el dispositivo de imagenología de dicho dispositivo de la herramienta de selección

con la imagen inicial almacenada de dicha placa de cultivo y, por lo tanto, obtener información relacionada con la ubicación de la colonia de microorganismos seleccionada y, opcionalmente, relacionada con las instrucciones de procesamiento relacionadas con los procesos que deben realizarse en dicha colonia de microorganismos seleccionada. Al comparar la imagen de la placa de cultivo cuando se coloca en el dispositivo de herramienta de selección con la imagen inicial, la ubicación de las colonias seleccionadas puede obtenerse de forma automática, por ejemplo, mediante comparación de imágenes computarizadas. Además, a cada placa diana se le puede proporcionar una marca de identificación y, opcionalmente, cada punto de depósito de dicha placa diana tiene una marca de identificación o identificador de ubicación individual, por lo tanto, después de almacenar la marca de identificación de dicha placa diana y puntos de depósito junto con las propiedades de la suspensión con un enlace a la identidad de la placa de cultivo de la que se obtuvo la colonia de microorganismos seleccionada en la memoria de dicha computadora de control central es posible establecer un enlace correcto de los resultados de MALDI obtenidos con la colonia de microorganismos específica que se esté analizando de manera correcta y automática.

Se describe, además, un método en el cual se genera una suspensión a partir de una muestra de una colonia de microorganismos seleccionada de una placa de cultivo junto con un aparato para realizar dicho método.

La Figura 1 muestra de forma esquemática un aparato 1 para la preparación automática de una suspensión de una muestra de un microorganismo según la descripción. Dicho aparato 1 comprende una plataforma 2 para una placa de cultivo 3 que comprende un microorganismo 4 en una capa nutritiva 5, tal como una capa de gel agar.

El aparato 1 comprende además una primera herramienta de selección 6 y una herramienta de selección adicional 7. Un dispositivo de colocación 8 comprende un soporte de la herramienta de selección 9 para, en la realización que se muestra, sostener de forma removible una herramienta de selección, en la realización que se muestra en la Figura 1, el soporte de la herramienta de selección 9 sostiene la primera herramienta de selección 6. El dispositivo de colocación 8 se dispone para colocar la primera herramienta de selección 6 en una posición inicial (que se muestra con líneas continuas en la Figura 1) encima de la placa de cultivo 3 y se dispone para hacer descender y elevar de forma automática la primera herramienta de selección 6 hacia y en sentido contrario a la placa de cultivo 3, de manera que la primera herramienta de selección 6 pueda ubicarse en una posición (indicada con las líneas discontinuas 6') en la cual entra en contacto con el microorganismo 4 y selecciona una muestra de dicho microorganismo. Después de que la primera herramienta de selección 6 ha seleccionado una muestra, el dispositivo de colocación 8 eleva y coloca la primera herramienta de selección 6 en una posición de transferencia, que, en la realización que se muestra en la Figura 1, es idéntica a la posición inicial. En otras realizaciones, las posiciones inicial y de transferencia pueden ser distintas entre sí.

El aparato 1 comprende además un soporte del tubo de suspensión 10 para sostener un tubo de suspensión 11 que puede contener un medio de suspensión que se dispensa desde un dispensador del medio de suspensión automático 12 que, en la realización que se muestra, tiene una boquilla dispensadora 13 para dispensar de forma automática un medio de suspensión 14 en el tubo de suspensión 11 sostenido en el soporte del tubo de suspensión 10. El soporte del tubo de suspensión 10 es un soporte del tubo de suspensión giratorio para hacer girar el tubo de suspensión 11 alrededor de un eje vertical A.

Se incorpora un dispositivo de transferencia 15 en el aparato 1 para transferir de forma automática una herramienta de selección desde la posición de transferencia del dispositivo de colocación 8 hasta una posición encima del tubo de suspensión 11 sostenido en el soporte del tubo de suspensión 10. En la realización que se muestra, el dispositivo de transferencia 15 comprende un soporte de transferencia 16 con un medio de sujeción 17 para sostener de forma removible una herramienta de selección. El dispositivo de transferencia 15, de manera conocida de por sí, puede montarse sobre una vía de transferencia 18, tal como un riel, para el movimiento lineal sobre este, como se indica mediante las flechas. De esta manera, el dispositivo de transferencia 15 puede moverse hasta el dispositivo de colocación 8, de manera que el medio de sujeción 17 pueda relevar a la herramienta de selección desde el dispositivo de colocación 8, donde el soporte de la herramienta de selección 9 de este libera la herramienta de selección después de que el medio de sujeción 17 ha sujetado la herramienta de selección. En la Figura 1, la segunda herramienta de selección o adicional 7, habiendo seleccionado previamente una muestra 19 del microorganismo 4, se coloca sobre el tubo de suspensión 11 mediante el dispositivo de transferencia 15 en una posición inicial indicada por las líneas continuas. El dispositivo de transferencia 15 se dispone para hacer descender la segunda herramienta de selección 7 hacia el interior del medio de suspensión 14 contenido en el tubo de suspensión 11, donde la posición de la segunda herramienta de selección T con la muestra 19 se sumerge en el medio de suspensión 14 como se indica con las líneas discontinuas en la Figura 1. En esta posición, el dispositivo de transferencia 15 se activa para hacer oscilar la segunda herramienta de selección 7 en un movimiento vertical lineal durante un período de tiempo que es suficiente para que la muestra 19 se libere de la segunda herramienta de selección 7. Luego, el dispositivo de transferencia 15 coloca la segunda herramienta de selección 7 en una posición de espera encima del tubo de suspensión 11 que, en la realización que se muestra en la Figura 1, es idéntica a la posición inicial. Sin embargo, la posición de espera y la posición inicial pueden ser distintas entre sí.

El aparato 1 se proporciona además con un medidor de la turbidez 20 para realizar mediciones de la turbidez del medio de suspensión 14 contenido en el tubo de suspensión 11 sostenido por el soporte del tubo de suspensión 10. Como se conoce generalmente en la técnica, un medidor de turbidez puede proporcionar valores de medición que

constituyen una medida de la concentración del material, en el caso de la presente, la concentración de un microorganismo suspendido en el medio de suspensión. En la Figura 1, el medidor de la turbidez 20 comprende un láser 21 que transmite luz láser hacia y a través del medio de suspensión y un sensor 22 que detecta la cantidad de luz láser transmitida a través del medio de suspensión. Además, hay un sensor adicional (que no se indica en el dibujo) que, por ejemplo, se dispone en sentido perpendicular a la trayectoria de la luz láser para detectar la cantidad de luz láser que se ha dispersado mediante la suspensión.

El funcionamiento del dispositivo es controlado por un controlador 23, por ejemplo, que comprende un microprocesador, que se conecta de forma comunicativa (como se indica mediante las líneas de señal) al dispositivo de colocación 8, el dispositivo de transferencia 15, el dispensador del medio de suspensión automático 12 y el medidor de turbidez 20 para controlar de forma automática el movimiento del dispositivo de colocación 8, el movimiento del dispositivo de transferencia 15, el funcionamiento del dispensador del medio de suspensión automático 12 y el funcionamiento del medidor de turbidez 20, respectivamente. Además, el controlador 23 puede estar directamente conectado de forma comunicativa a otras partes del aparato, tales como, por ejemplo, el soporte de la herramienta de selección 9, el soporte de transferencia 16, el láser 21 y el sensor 22.

En la Figura 1, el controlador 23 se dispone para controlar el medidor de turbidez 20, de manera que la medición de la turbidez del medio de suspensión 14 comience antes de que la segunda herramienta de selección 7 se sumerja en el medio de suspensión 14. Además, el controlador 23 controla el soporte del tubo de suspensión giratorio 10 para iniciar la rotación del tubo de suspensión 11 sostenido por el soporte 10 antes de que la segunda herramienta de selección 7 se sumerja en el medio de suspensión 14, y para mantener la rotación del tubo de suspensión 11 durante la medición de la turbidez del medio de suspensión 14. Como se muestra, el controlador 23 controla el medidor de turbidez 20 de manera que la medición de la turbidez se realice durante el período de tiempo total durante el cual oscila la segunda herramienta de selección 7. De esta manera, el medidor de turbidez 20 proporciona un valor de medición en línea al controlador 23 que indica la turbidez medida y, por lo tanto, la concentración del microorganismo, en el período de tiempo durante el cual oscila la segunda herramienta de selección.

El controlador 23 comprende una memoria en la cual se almacenan un primer y un segundo valor de umbral, donde dicho primer valor de umbral es igual o superior al segundo valor de umbral. Si el valor de medición de la turbidez proporcionado por el medidor de turbidez es igual o intermedio al primer y segundo valor de umbral, la concentración/cantidad de microorganismo en el medio de suspensión es suficiente para permitir que el tubo de suspensión con la suspensión se procese adicionalmente. En dicho caso, el controlador 23 proporciona una señal de que el tubo de suspensión puede procesarse adicionalmente. Además, en esta situación, la segunda herramienta de selección 7 puede desecharse, por ejemplo, mediante la transferencia del dispositivo de transferencia hasta una posición C en la cual se activa el medio de sujeción 17 para liberar la segunda herramienta de selección 7.

En caso de que el valor de medición final del medidor de la turbidez sea superior al primer valor de umbral previamente almacenado en una memoria del controlador 23, la concentración del microorganismo es demasiado alta para permitir que el tubo de suspensión se procese adicionalmente. En esta situación, el controlador 23 controla el dispensador del medio de suspensión automático 12 para suministrar una cantidad adicional de medio de suspensión en el tubo de suspensión 11. Esta cantidad adicional de medio de suspensión se basa en la cantidad inicial de medio de suspensión, el valor de medición final y el valor del primer y/o segundo valor de umbral, de manera que la adición de la cantidad adicional del medio de suspensión al medio de suspensión que ya se encuentra presente en el tubo de suspensión 11 conllevará una concentración de microorganismo en el medio de suspensión que satisface el requisito de procesamiento adicional, como lo puede confirmar una medición adicional de la turbidez mediante el medidor de turbidez 20.

En caso de que el valor de medición final del medidor de turbidez 20 sea inferior al segundo valor de umbral, lo que significa que la concentración de microorganismo en el medio de suspensión es demasiado baja, el controlador 23 controla el aparato 1 de manera que se seleccione una cantidad adicional del microorganismo mediante la primera herramienta de selección 6 (de manera alternativa, la segunda u otra herramienta de selección se puede usar para seleccionar una muestra adicional). Por lo tanto, el controlador 23, en este caso, controla la colocación del dispositivo de transferencia 15, de manera que la segunda herramienta de selección 7 se deseche, como se describió anteriormente. Luego (o de forma simultánea), la primera herramienta de selección 6 en el soporte de la herramienta de selección 9 del dispositivo de colocación 8 se hace descender desde la posición inicial por encima de la placa de cultivo 3 hacia la placa de cultivo y en contacto con el microorganismo 4 para seleccionar una muestra adicional de dicho microorganismo. Luego, la primera herramienta de selección 6 se eleva de forma automática con la muestra adicional del microorganismo en sentido contrario a la placa de cultivo hasta la posición de transferencia. Luego, dicho dispositivo de transferencia transfiere de forma automática la primera herramienta de selección con la muestra adicional del microorganismo desde la posición de transferencia del dispositivo de colocación 8 hasta una posición por encima del tubo de suspensión 11. La primera herramienta de selección 6 con la muestra adicional del microorganismo se hace descender hacia el interior del medio de suspensión 14 y oscila mediante el dispositivo de transferencia 15 en un movimiento vertical lineal para un período de tiempo para liberar la muestra adicional de dicho microorganismo en el medio de suspensión. Nuevamente, la turbidez se mide durante la oscilación, y el valor medido se compara con el primer y el segundo valor de umbral almacenados en la memoria del controlador 23. En este caso, el controlador 23 se puede disponer para controlar el movimiento del dispositivo de transferencia 15 de manera que la primera

herramienta de selección 6 se eleve hasta la posición de espera si durante la oscilación el valor de medición en línea de la turbidez realizado por el medidor de turbidez 20 es igual o inferior al primer valor de umbral e igual o superior al segundo valor de umbral.

5 Los tubos de suspensión que son particularmente útiles en el aparato de la invención tienen una sección transversal sustancialmente circular con un diámetro de aproximadamente 6 a aproximadamente 12 mm, preferiblemente aproximadamente 10 mm. En estos tubos de suspensión relativamente pequeños, el controlador 23 puede controlar el dispensador del medio de suspensión automático 12 de manera que la cantidad inicial suministrada de medio de suspensión sea de aproximadamente 0,5 - 2 ml, preferiblemente aproximadamente 1 ml.

10 La oscilación del dispositivo de transferencia 15 es controlada por el controlador 23, de manera que la herramienta de selección oscile a una frecuencia de entre aproximadamente 5 Hz y aproximadamente 120 Hz, preferiblemente aproximadamente 30 Hz y aproximadamente 90Hz, más preferiblemente aproximadamente 50 Hz, con una amplitud de aproximadamente 0.5 mm a aproximadamente 4 mm, preferiblemente aproximadamente 2 mm a aproximadamente 3 mm. El controlador, además, se dispone para controlar la oscilación del dispositivo de transferencia 15, de manera que el período de tiempo durante el cual oscila la herramienta de selección sea de aproximadamente 3 segundos a aproximadamente 10 segundos, preferiblemente aproximadamente 6 segundos.

20 El aparato 1, además, comprende un transportador 24, del cual la posición de extremo puede formar la plataforma 2 para la placa de cultivo o, como se muestra en la Figura 1, un transportador 24 y una plataforma 2, que se ubican mutuamente de forma que una placa de cultivo pueda transportarse hacia la plataforma y retirarse de la plataforma mediante el funcionamiento apropiado del transportador 24. El transportador 24 es controlado por el controlador 23 para colocar y retirar de forma automática una placa de cultivo que comprende dicho microorganismo sobre y de la plataforma, respectivamente. Cabe destacar que se pueden usar distintos medios para colocar y retirar de forma automática una placa de cultivo sobre y de la plataforma, respectivamente. En particular, el controlador 23 se dispone para permitir retirar de forma automática una placa de cultivo de la plataforma mediante el dispositivo de colocación y retiro automático de la placa de cultivo solamente después de que se haya proporcionado la señal de que se puede retirar el tubo de suspensión con la suspensión del soporte del tubo de suspensión para el procesamiento adicional. Esto garantiza que siempre sea posible seleccionar una muestra adicional, si fuera necesario.

30 Como se muestra en la Figura 1, el aparato 1 comprende además un dispositivo de colocación y retiro automático del tubo de suspensión 25 para colocar y retirar de forma automática un tubo de suspensión en y del soporte del tubo de suspensión, respectivamente. El dispositivo de colocación y retiro automático del tubo de suspensión 25 comprende el medio de sujeción 26 para sujetar de forma removible un tubo de suspensión 11. Nuevamente, el controlador 23 se dispone para conectarse de forma comunicativa al dispositivo de colocación y retiro automático del tubo de suspensión 25, 26 para controlar el funcionamiento del dispositivo de colocación y retiro automático del tubo de suspensión, y para colocar de forma automática un tubo de suspensión en el soporte del tubo de suspensión. El controlador 23, en particular, se dispone para retirar de forma automática un tubo de suspensión del soporte del tubo de suspensión mediante el dispositivo de colocación y retiro automático del tubo de suspensión 25, 26 solamente después de que se haya proporcionado la señal de que se puede retirar el tubo de suspensión con la suspensión del soporte del tubo de suspensión para el procesamiento adicional. En la realización que se muestra, el dispositivo de colocación y retiro automático del tubo de suspensión 25 puede moverse a lo largo del riel 18 de forma independiente del movimiento del dispositivo de transferencia 15. En la posición indicada por C, se pueden traer tubos de suspensión vacíos y se pueden entregar tubos de suspensión con un medio de suspensión que contiene una concentración suficiente de microorganismo al equipo para el procesamiento adicional, tal como una incubadora. Cabe destacar que la posición C, por ejemplo, puede estar formada por un sistema multipista que puede llevar el dispositivo de colocación y retiro del tubo de suspensión 25 y el dispositivo de transferencia 15 hasta una ubicación distinta en la cual hay componentes distintos o se pueden realizar procesos.

50 La suspensión de muestra así preparada se utiliza para realizar caracterización o identificación de los microorganismos usando MALDI y se utiliza para AST. Para identificar microorganismos usando MALDI, se obtiene una gota de dicha suspensión de muestra; y esta gota se transfiere a dicha placa diana. Se puede obtener una gota mediante el uso de otra herramienta de selección que es sostenida por el medio de sujeción 17 y que se hace descender de forma automática en la suspensión. Cuando esta herramienta de selección se eleva y se retira de la suspensión, aparece una gota de suspensión en la punta de esta herramienta de selección, que puede transferirse a lo largo del riel hasta la posición B, donde la herramienta de selección con la gota se hace descender hasta que la gota entra en contacto con el punto de depósito en la placa diana, y al menos una parte de la gota permanecerá en el punto de depósito después de que la herramienta de selección se ha elevado de la placa diana. De manera alternativa, una herramienta de pipeteado, que se describirá más adelante, se puede utilizar para seleccionar una cantidad de suspensión del tubo de suspensión, transferir esta cantidad hasta la posición B y depositar una gota de suspensión sobre la placa diana. Después de haber depositado una gota de suspensión sobre la placa diana y, en particular, cuando se ha permitido secar esta gota, se recubre de forma automática una gota de una solución de matriz MALDI sobre la cantidad o parte de la muestra depositada sobre la placa diana. Para realizar otras pruebas u otro análisis, se puede obtener una segunda gota de dicha suspensión de muestra de manera similar, y dicha gota puede transferirse y depositarse de forma automática sobre, por ejemplo, una placa de cultivo de prueba que se transfiere de manera adicional de forma automática para realizar una prueba de susceptibilidad u otro análisis adicional.

5 Cada tubo de suspensión comprende una marca de identificación única, que se almacena junto con las propiedades de la suspensión con un enlace a la identidad de la placa de cultivo de la cual se obtuvo la colonia de microorganismos seleccionada en la memoria de dicha computadora de control central para, entre otras cosas, relacionar de forma correcta y rápida los resultados obtenidos del análisis con la placa de cultivo y la colonia que pertenece a dichos resultados.

10 Si bien no se muestra en la Figura 1, se puede tomar una cantidad de suspensión de la suspensión del tubo de suspensión mediante una herramienta de pipeteado que puede ser sostenida y colocada de forma automática por el medio de sujeción (que funciona como soporte de la herramienta de pipeteado) 17 y el dispositivo de transferencia o colocación 15 de la misma manera que la herramienta de selección. El dispositivo de colocación 15 se dispone para colocar dicha herramienta de pipeteado en una posición inicial por encima del tubo de suspensión y para hacer descender y elevar de forma automática la herramienta de pipeteado hacia el interior y exterior de la suspensión y para colocar la herramienta de pipeteado en una posición de transferencia, respectivamente. Cuando la herramienta de pipeteado se hace descender hacia el interior de la suspensión en dicho tubo de suspensión, la herramienta de pipeteado funciona de manera conocida por sí misma (por ejemplo, usando sub presión) para seleccionar una cantidad de suspensión. Luego, la herramienta de pipeteado con dicha cantidad de suspensión se eleva hasta la posición de transferencia. Para contener la cantidad, la herramienta de pipeteado comprende una cámara presurizable encerrada por una válvula controlada. La herramienta de pipeteado se transfiere de forma automática mediante el dispositivo de transferencia 15 hasta la posición B encima de uno de los puntos de depósito de la placa diana. En esta posición, la herramienta de pipeteado se hace descender hasta una distancia predefinida encima de la placa diana, luego de lo cual la cámara se presuriza hasta una presión en un intervalo de aproximadamente 0,5 bar a 1,1 bar. Luego, la válvula se abre durante un período que permita depositar una gota de suspensión con un volumen en un intervalo de aproximadamente 0.5 a 3.0  $\mu$ l en el punto de depósito, en particular, cubriendo como máximo aproximadamente la mitad de uno de dichos puntos de depósito de la placa diana. Después de haber depositado la gota, la herramienta de pipeteado se eleva desde la placa diana y puede transferirse hasta la posición C, donde puede desecharse o limpiarse para reutilizarse.

REIVINDICACIONES

1. Un método que comprende:

- proporcionar una placa de cultivo (3) que comprende una cantidad de colonias de microorganismos (4);
- obtener una imagen inicial de la placa de cultivo (3) que incluye una o más colonias de microorganismos (4) en la placa de cultivo (3);
- seleccionar de forma manual una o más colonias de microorganismos (4) de una o más colonias de la imagen inicial;
- localizar y seleccionar de forma automática una o más de dichas colonias de microorganismos (4) en la placa de cultivo (3);
- proporcionar un dispositivo de colocación (8) con un soporte de la herramienta de selección (9) para sostener una herramienta de selección (6), donde dicho dispositivo de colocación (8) se dispone para: (a) colocar una herramienta de selección (6) por encima de las colonias de microorganismos seleccionadas (4) en la placa de cultivo (3); (b) hacer descender y elevar de forma automática una herramienta de selección (6) hacia y en sentido contrario a la placa de cultivo (3); y (c) colocar una herramienta de selección (6) en una posición de transferencia;
- proporcionar una primera herramienta de selección (6);
- colocar la primera herramienta de selección (6) en el soporte de la herramienta de selección (9) del dispositivo de colocación (8);
- obtener de forma automática una primera muestra de al menos una de las colonias de microorganismos seleccionadas (4) con el dispositivo de colocación (8) para realizar MALDI al: (a) colocar la primera herramienta de selección (6) por encima de una de las colonias de microorganismos seleccionadas (4) en la placa de cultivo (3), (b) hacer descender de forma automática la primera herramienta de selección (6) hacia la placa de cultivo (3) y en contacto con una o más de las colonias de microorganismos seleccionadas (4) para seleccionar una muestra de una de las colonias de microorganismos seleccionadas (4), y (c) elevar de forma automática la primera herramienta de selección (6) con la muestra de una de las colonias de microorganismos seleccionadas (4) en sentido contrario a la placa de cultivo (3) hacia la posición de transferencia;
- proporcionar un soporte de la placa diana para sostener una placa diana;
- proporcionar una placa diana con múltiples puntos de depósito;
- colocar la placa diana en el soporte de la placa diana;
- depositar de forma automática al menos una parte de la primera muestra en al menos uno de los puntos de depósito de la placa diana con el dispositivo de colocación (8) al: (a) transferir la primera herramienta de selección (6) desde la posición de transferencia hacia una posición por encima de uno de los puntos de depósito de la placa diana, (b) hacer descender la primera herramienta de selección (6) de manera que al menos una parte de la primera muestra entre en contacto con la placa diana, y (c) hacer elevar la primera herramienta de selección (6) desde la placa diana, donde al menos una parte de la primera muestra se deposita en la placa diana de manera que cubra como máximo aproximadamente la mitad de al menos uno de los puntos de depósito de la placa diana;
- opcionalmente proporcionar una segunda herramienta de selección (7);
- colocar opcionalmente la segunda herramienta de selección (7) en el soporte de la herramienta de selección (9) del dispositivo de colocación (8);
- obtener de forma automática una segunda muestra de al menos una de las colonias de microorganismos seleccionadas (4) con el dispositivo de colocación (8) para realizar una prueba de susceptibilidad al: (a) colocar la primera (6) o segunda (7) herramienta de selección por encima de una de las colonias de microorganismos seleccionadas (4) en la placa de cultivo (3), (b) hacer descender de forma automática la primera (6) o segunda (7) herramienta de selección hacia la placa de cultivo (3) y en contacto con una de las colonias de microorganismos seleccionadas (4) para seleccionar una muestra de una de las colonias de microorganismos seleccionadas (4) y (c) elevar de forma automática la primera (6) o segunda (7) herramienta de selección con la muestra de una de las colonias de microorganismos seleccionadas (4) en sentido contrario a la placa de cultivo (3) hacia la posición de transferencia;
- proporcionar una placa de cultivo de prueba; y
- depositar de forma automática al menos una parte de la segunda muestra en la placa de cultivo de prueba.

2. Un método según la reivindicación 1, que comprende, además:

transferir la placa diana con al menos una parte de la primera muestra a un aparato para realizar MALDI para identificación de la primera muestra; y  
transferir la placa de cultivo de prueba con al menos una parte de la segunda muestra a un aparato para realizar una prueba de susceptibilidad.

3. Un método según la reivindicación 1 o 2, que comprende, además:

recubrir una gota de una solución de matriz MALDI sobre al menos una parte de la primera muestra depositada en la placa diana.

4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la placa de cultivo (3) cuenta con una

identificación individual que identifica la placa de cultivo (3), tal como un código de barras, y el método comprende, además:

almacenar (a) la imagen inicial de la placa de cultivo (3), (b) información sobre una o más colonias de microorganismos seleccionadas (4), y (c) la identificación de la placa de cultivo (3) en una memoria de una computadora de control central.

5. Un método según la reivindicación 4, en donde el método comprende, además:

ingresar de forma manual instrucciones de procesamiento con respecto al procesamiento al que deben someterse una o más colonias de microorganismos seleccionadas (4) de la placa de cultivo (3), y almacenar las instrucciones de procesamiento en la memoria de la computadora de control central.

6. Un método según las reivindicaciones 4 o 5, en donde la etapa de ubicar y seleccionar de forma automática una o más de las colonias de microorganismos seleccionadas (4) en la placa de cultivo (3) comprende: (a) colocar la placa de cultivo (3) en una plataforma (2) que comprende un dispositivo de imagenología, (b) obtener una imagen de la placa de cultivo (3), (c) obtener la identificación de dicha placa de cultivo (3), y (d) comparar la imagen obtenida por el dispositivo de imagenología con la imagen inicial almacenada de la placa de cultivo (3).

7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la etapa de depositar de forma automática al menos una parte de la primera muestra en al menos uno de los puntos de depósito de la placa diana con el dispositivo de colocación (8) comprende, además: mover la primera herramienta de selección (6) en un plano paralelo al plano de la placa diana después de que la primera herramienta de selección (6) entra en contacto con la placa diana.

8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde se proporciona la segunda herramienta de selección (7), (b) se coloca la segunda herramienta de selección (7) en el soporte de la herramienta de selección (9) del dispositivo de colocación (8), y (c) se obtiene la segunda muestra con la segunda herramienta de selección (7), no la primera herramienta de selección (6).

9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde se obtiene la segunda muestra con la primera herramienta de selección (6), no la segunda herramienta de selección (7).

10. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde las primeras y segundas muestras comprenden al menos una de las mismas colonias de microorganismos seleccionadas (4) en la placa de cultivo (3).

11. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde las primeras y segundas muestras consisten completamente en una única de las colonias de microorganismos seleccionadas (4) en la placa de cultivo (3).

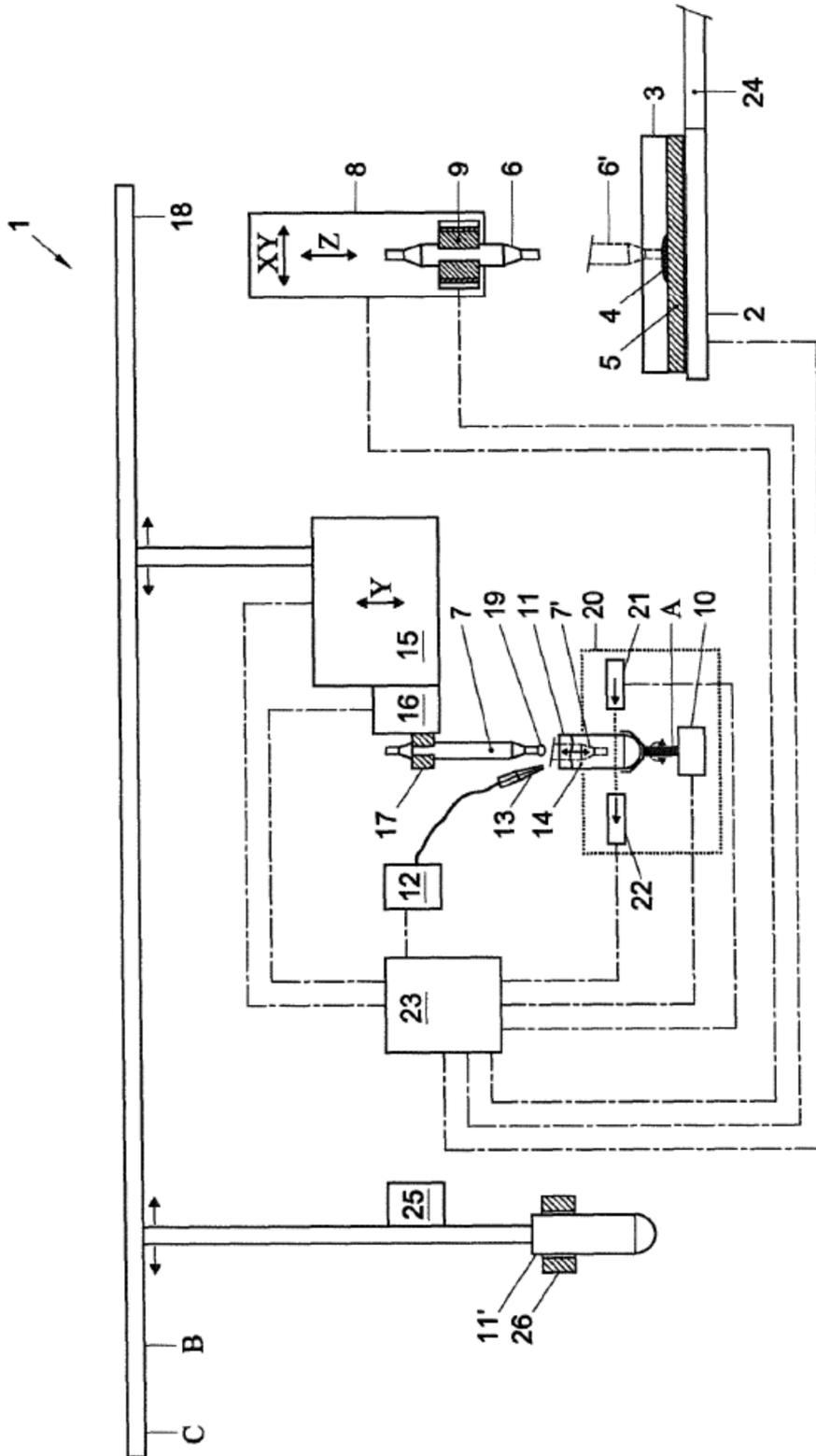


Fig. 1