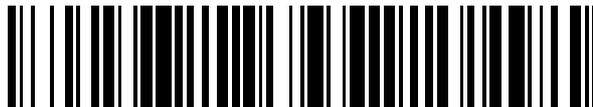


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 958**

51 Int. Cl.:
C12M 1/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08846927 .5**
96 Fecha de presentación: **04.11.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2217693**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.08.2010**

54 Título: **MÉTODOS Y APARATO PARA MANIPULAR MUESTRAS MICROBIANAS.**

30 Prioridad:
05.11.2007 EP 07119955

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.12.2011

73 Titular/es:
**KIESTRA LAB AUTOMATION DRACHTEN B.V.
MARCONILAAAN 6
9207 JC DRACHTEN, NL**

72 Inventor/es:
**VAN DER KAAP, Trienko Marten;
KLEEFSTRA, Martijn;
TJERNBERG, Ingela Marie Sofie Edlund y
BOTMA, Jetze**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 370 958 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

Métodos y aparato para manipular muestras microbianas

Esta invención se refiere al campo general de la microbiología y, de modo más específico, a la transferencia, inoculación y/o siembra en estrías de microorganismos, por ejemplo, para obtener colonias individuales. Entre otros, se refiere a métodos para manipular y sembrar en estrías especímenes microbianos, y a un aparato (semi)automático para preparar especímenes para el recuento visual, la tipificación y otros análisis de poblaciones bacterianas, por ejemplo en microbiología de diagnóstico.

Uno de los muchos procedimientos que deben realizarse en microbiología es la siembra en estrías de placas con el fin de aislar colonias microbiológicas. Las colonias aisladas son absolutamente necesarias para observar la morfología de las colonias y para la realización de tinciones y otros procedimientos que son necesarios para determinar el género y, en muchos casos, la especie, cepa, etc. de un organismo desconocido. En la técnica clásica, conocida como siembra en estrías, un asa de siembra estéril en primer lugar se pone en contacto con la muestra o el inóculo cuyas células se desea transferir, después se pone en contacto con la placa que contiene el medio sólido estéril al cual se desea transferir las células, y se mueve de un lado a otro sobre la superficie de una porción (por ejemplo, una cuarta parte) de la placa fresca. En la etapa inicial, pueden transferirse millones de células a la nueva placa, y deben diluirse más en muchos órdenes de magnitud de modo que se obtengan colonias individuales, en lugar de un crecimiento confluyente. Puesto que la superficie del asa de siembra ya está contaminada con muchos miles de células, debe volver a esterilizarse (por ejemplo, mediante esterilización con llama en el caso de asas de siembra de alambre), o debe sustituirse por una nueva asa de siembra estéril (por ejemplo, en el caso de asas de siembra de plástico desechables de un solo uso). El asa de siembra estéril entonces se pone en contacto con la superficie de la placa fresca que previamente se había sembrado en estrías, por ejemplo mediante varios movimientos a través de la zona de la primera siembra en estrías, y después se siembra en estrías otra porción de la placa (por ejemplo, un cuarto de la placa adyacente a la primera siembra en estrías). Esto produce otra dilución de las células. El asa de siembra después se vuelve a esterilizar o se sustituye, se pone en contacto con la segunda área de siembra en estrías, y después se siembra en estrías una tercera zona de la placa. Este proceso debe realizarse al menos tres o cuatro veces para asegurarse de obtener colonias individuales, en lugar de un crecimiento confluyente, tras la incubación de la placa fresca.

El ensayo de especímenes microbianos clínicos requiere en general la siembra en estrías de varias placas (por ejemplo, de 2 a 6) por espécimen de ensayo. El proceso de siembra en estrías manual requiere aproximadamente 30 segundos por placa de agar de tiempo del técnico experto. La calidad de la siembra en estrías y, por tanto, los grados de aislamiento del microorganismo depende de la formación recibida por el técnico y del cuidado que se tiene al realizar el proceso.

Por tanto, el proceso de inoculación y siembra en estrías manual requiere mucha mano de obra y mucho tiempo. Además, en muchos escenarios de diagnóstico, tal como un laboratorio microbiológico hospitalario, a menudo se reciben picos de carga de muestras para ensayar. No resulta extraño que el procesamiento de hasta 1000 muestras clínicas individuales de diversos tipos deba realizarse en una ventana de tiempo de sólo unas pocas horas, en general al final de una jornada laboral normal, por ejemplo entre 3 y 5 p.m. Esto ejerce una enorme presión de tiempo sobre los empleados, el equipo y el espacio en el laboratorio implicados. Sin embargo, la inoculación y la siembra en estrías sólo es el principio del ensayo microbiológico real, y también se producen picos de carga para los procedimientos corriente abajo, incluyendo la incubación de las placas, el procesamiento (por ejemplo, la tinción) y la evaluación final de la placa.

Por tanto, en el campo se ha intentado automatizar el proceso de inoculación y/o siembra en estrías de placas.

Por ejemplo, el ISOPLATER 180 (Vista Technology Inc., Edmonton, Alberta, Canadá) es un sembrador en estrías de placas Petri automático. La máquina hace rotar automáticamente el carrusel de carga para introducir un apilamiento de placas, descargar una placa, retirar la tapa, orientar la placa, transferir la placa con su tapa, sembrar en estrías en cuatro cuadrantes sucesivos para el aislamiento, volver a poner la tapa, y cargar la placa finalizada sobre el carrusel de descarga. La distribución sobre la superficie completa de una placa de agar la realizan cuatro asas de siembra de nicocromo individuales que son esterilizadas mediante un calentamiento eléctrico entre las placas.

El documento WO 2005/071055 describe un dispositivo y aparato de siembra en estrías para sembrar en estrías un inóculo microbiano para obtener colonias individuales sobre la superficie de un medio de crecimiento sólido. El dispositivo se caracteriza por una estructura "de tipo peine" que consiste en una fila de superficies de contacto espaciadas entre sí que están soportadas de forma elástica por un miembro de soporte común. El dispositivo de siembra en estrías se aplica sobre la superficie de una placa de agar y se hace rotar en diversos grados. La técnica anterior, remontándose hasta principios de los años ochenta, describe sistemas de siembra en estrías que comprenden el uso de una partícula de metal magnético esférica, en particular bolas de acero. Por ejemplo, el documento US 3.830.701 describe un método y un aparato para la siembra en estrías de una muestra microbiana que comprende poner en contacto una bola de acero inoxidable con un inóculo y generar un movimiento controlado de la bola utilizando un imán móvil para transferir la muestra microbiana a la superficie de un cultivo. Los documentos US 3.660.243 y US 3.623.958 describen métodos y dispositivos que comprenden características

similares.

Los sistemas conocidos en la técnica sustituyen y realizan automáticamente muchas de las tareas manuales implicadas tradicionalmente en la inoculación y la siembra en estrías de placas de agar convencionales. Sin embargo, no se adaptan a todas las preferencias del usuario. Éstas incluyen: a) la producción de colonias individuales cuando se utilizan placas miniaturizadas o divididas; b) que no se produzca contaminación cruzada; c) que sea fácil de usar; d) que tenga gran capacidad (preferiblemente al menos 500 placas/hora); e) que tenga un coste bajo; y f) que tenga compatibilidad con diferentes tipos de especímenes, por ejemplo muestras líquidas, hisopos, etc., y con placas no convencionales, tales como placas divididas.

Los presentes inventores se propusieron abordar al menos algunas de las preferencias anteriores para intentar proporcionar otros métodos y aparatos mejorados para la manipulación (semi)automática de una muestra microbiana. Observaron que las partículas de acero empleadas en los métodos de siembra en estrías controlados de forma magnética conocidos en la técnica no son adecuados para la siembra en estrías automática de alta velocidad fiable que se busca en la actualidad. En particular, se descubrió que las bolas de acero conocidas en la técnica muestran un rodamiento insuficiente para lograr una buena dispersión del inóculo sobre una superficie (de cultivo). Con las altas velocidades de siembra en estrías que se desean en la actualidad (al menos 500 placas/hora), las partículas de acero no fueron eficaces para producir colonias individuales, en especial cuando se requieren patrones de siembra en estrías más complejos para obtener una longitud de recorrido de siembra en estrías suficiente sobre una superficie específica limitada, por ejemplo el patrón de zigzag con curvas agudas para sembrar en estrías muestras sobre placas divididas. Sin querer limitarse por la teoría, se cree que una partícula de acero fabricada sin materiales compuestos y homogénea forma un dipolo y, por tanto, actúa como un imán en sí misma. Como resultado, la partícula de acero "resbala" sobre la superficie de la placa durante el movimiento controlado de forma magnética, y la partícula no puede realizar movimientos de rodamiento óptimos.

Se descubrió, de modo sorprendente, que pueden obtenerse unos resultados de siembra en estrías mucho mejores cuando se emplea una partícula magnética fabricada con un material compuesto y no homogénea, en lugar de las partículas de acero inoxidable homogéneas conocidas en la técnica. Además, otras características de la partícula, tales como el diámetro, la densidad y/o la rugosidad de la superficie, se identificaron como importantes para la actuación de distribución de la partícula. Tal como se ejemplifica a continuación en la presente, se descubrió que cuando se pone en contacto una muestra con una partícula magnética de un material compuesto, tal como una esfera magnética que comprende un material magnético y un material no magnético, se puede realizar una transferencia muy eficaz y fácil de diversos tipos de muestras desde un vehículo a otro, por ejemplo, desde un tubo de recolección de orina o un hisopo a un caldo de cultivo, una placa Petri o un portaobjetos de vidrio para microscopio. Además se observó, de modo sorprendente, que una muestra microbiana puede distribuirse sobre una superficie sólida u homogeneizarse en un medio líquido mediante el movimiento de una partícula de un material compuesto controlado de forma magnética. La distribución sobre un medio de crecimiento sólido colocando un campo magnético bajo él produce más colonias microbianas individuales aisladas cuando se compara con la siembra en estrías manual, incluso a alta velocidad. Puede obtenerse un patrón de siembra en estrías predeterminado con la utilización óptima de la superficie específica de una placa. La longitud de recorrido total de una siembra en estrías entonces puede aumentar dentro de los confines de la placa. Esto obvia la necesidad de cambiar a una placa de cultivo más grande y más cara. Por supuesto, cuanto mayor sea la longitud de recorrido de la siembra en estrías, más alta será la probabilidad de que un inóculo se diluya lo suficiente como para obtener colonias aisladas. Una utilización óptima de la superficie específica de la placa resulta especialmente ventajosa cuando se emplean placas miniaturizadas o las denominadas placas divididas que tienen dos medios diferentes contenidos en compartimentos separados de una única placa.

Otra ventaja de la siembra en estrías controlada de modo magnético proporcionada en la presente es que puede adaptarse al máximo a las variaciones de la superficie. En contraste con los dispositivos de siembra en estrías mecánicos conocidos en la técnica, la partícula magnética utilizada para la transferencia o la siembra en estrías de muestras no está mecánicamente restringida de ninguna manera. Por tanto, puede deslizarse suavemente sobre cualquier superficie sin riesgo de dañar la superficie, por ejemplo, la superficie de un medio de crecimiento sólido.

Un método para la transferencia de una muestra microbiana, preferiblemente una muestra líquida, desde un primer vehículo a un segundo vehículo, comprendiendo dicho "método de transferencia" las etapas de:

- a) poner en contacto al menos parte de dicha muestra asociada a dicho primer vehículo con al menos una partícula ferromagnética, siendo la partícula una esfera de un material compuesto de forma esférica que tiene una rugosidad superficial (Ra) en el intervalo de 0,1 a 25 μm , un diámetro de entre 2 y 8 mm, y una densidad menor que 7 g/cm^3 , y
- b) aplicar un gradiente de campo magnético externo para permitir un movimiento controlado de modo magnético de dicha esfera, de forma que al menos parte de la muestra se transfiere a dicho segundo vehículo.

La invención proporciona un método para la siembra en estrías de una muestra microbiana sobre un vehículo sólido, comprendiendo dicho "método de siembra en estrías" las etapas de:

- a) poner en contacto al menos una partícula ferromagnética con la superficie de un vehículo sólido, siendo la

partícula preferiblemente una esfera de un material compuesto de forma esférica con una superficie, un diámetro, y una densidad como se mencionó anteriormente, seguido o precedido de proporcionar la partícula con al menos parte de dicha muestra, y

- 5 b) aplicar un gradiente de campo magnético externo para permitir un movimiento controlado de modo magnético de dicha partícula sobre dicha superficie, de forma que al menos parte de la muestra se siembra en estrías sobre el vehículo sólido.

Muestra microbiana

10 Tal como se emplea en la presente, la expresión “muestra microbiana” se refiere a cualquier muestra o espécimen del cual se sabe que contiene, o se sospecha que contiene, un microorganismo o una mezcla de microorganismos. Preferiblemente, la muestra microbiana es una muestra líquida.

15 En una realización, es un cultivo de microorganismos utilizado como referencia y para la investigación. Para mantener cepas de microorganismos individuales, los cultivos habitualmente se siembran en estrías sobre placas que contienen un medio solidificado. El inóculo del cultivo procede generalmente de una única colonia de una placa previamente inoculada, y el objetivo del procedimiento de siembra en estrías es obtener colonias individuales de la cepa sobre la nueva placa. Unas colonias individuales de forma idéntica indican al trabajador que se ha transferido un único tipo celular; además, una única colonia sirve como inóculo para posteriores transferencias y experimentación de cepas.

20 En otra realización, una muestra microbiana es una muestra para un análisis microbiológico de diagnóstico. La microbiología de diagnóstico se realiza en laboratorios de ensayos médicos, medioambientales y alimentarios, y tradicionalmente ha utilizado una mínima automatización del proceso. La microbiología de diagnóstico de laboratorio convencional implica la recolección de especímenes, el registro, la inoculación, el aislamiento, la identificación y el ensayo de microbios patógenos procedentes de especímenes clínicos. El objetivo es obtener colonias aisladas de microbios para su posterior análisis.

25 En una realización específica, una muestra microbiana es un espécimen microbiano clínico. El aislamiento y la identificación de microorganismos para objetivos de diagnóstico médico o veterinario desempeña un papel importante para determinar qué tratamientos son necesarios para sujetos humanos o animales con diversas enfermedades. Los ejemplos de especímenes clínicos que se emplean de modo ventajoso en un método de la invención incluyen orina, hisopos del tracto respiratorio superior, secreciones genitales, esputo, heces, pus, fluidos corporales estériles, y cultivos de sangre.

30 *Partícula magnética*

35 La presente invención proporciona el uso de al menos una partícula ferromagnética (también denominada en la presente “magnética”, a menos que se indique lo contrario) para la transferencia, la inoculación y/o la siembra en estrías de una muestra microbiana. El término “ferromagnético”, tal como se emplea en la presente, es un término amplio y se emplea en su sentido habitual e incluye, sin limitación, cualquier material que se magnetice con facilidad, tal como un material que tenga átomos que orientan el giro de sus electrones para adaptarse a un campo magnético externo. También se denomina “material que reacciona magnéticamente”. Los materiales ferromagnéticos incluyen materiales, tales como metales, que son atraídos por imanes permanentes. Los materiales ferromagnéticos también incluyen materiales electromagnéticos que son capaces de ser activados por un transmisor electromagnético. En una realización, la partícula o las partículas magnéticas comprenden hierro, níquel, cobalto o sus aleaciones.

40 La partícula puede ser sólida o semisólida, por ejemplo con un núcleo hueco. Por ejemplo, comprende un material de núcleo cubierto por un material de revestimiento. Los factores que pueden tomarse en consideración cuando se elige un material de partícula incluyen que sea inerte frente a una muestra microbiana, que sea resistente a la esterilización (térmica), los costes, etc. Para facilitar un revestimiento eficaz de la partícula con una muestra biológica acuosa, se prefiere que la superficie sea hidrófila o al menos no hidrófoba. La partícula puede reutilizarse o puede desecharse tras su uso.

45 La partícula es una esfera. Para objetivos de siembra en estrías, se emplea una esfera de un material compuesto. Una esfera es una partícula fundamentalmente esférica. La expresión “material compuesto” pretende indicar que la esfera está formada por dos o más materiales, siendo al menos uno magnético. Preferiblemente, una esfera de un material compuesto de la invención comprende un material magnético y un material no magnético. En una realización, la esfera de un material compuesto comprende al menos un material no magnético, preferiblemente un polímero, y al menos un material magnético. Por ejemplo, la esfera comprende un núcleo magnético (sólido, de alambre) al que se le proporciona un revestimiento polimérico. El núcleo puede tener cualquier estructura tridimensional adecuada. Por ejemplo, es un núcleo sólido y esférico compuesto por un material magnético. Como alternativa, el núcleo magnético puede tener una estructura más aleatoria, tal como un alambre enredado. En una realización específica, la esfera de un material compuesto es una esfera de acero cubierta por un material hidrófilo, tal como un polímero hidrófilo.

En otra realización, la esfera comprende un núcleo polimérico cubierto con un revestimiento magnético. De nuevo, se incluye cualquier forma que adopte el núcleo. El revestimiento magnético puede comprender partículas de uno o más materiales magnéticos, tales como polvo de hierro.

5 En otra realización, la esfera comprende o consiste en una mezcla homogénea de al menos un material no magnético, preferiblemente un polímero hidrófilo, y al menos un material magnético en forma de partículas, preferiblemente un polvo. Se obtuvieron resultados muy buenos cuando la proporción en peso relativa de material magnético a material no magnético es entre 10:90 y 30:70, preferiblemente entre 20:80 y 25:75. Cualquier material magnético en partículas adecuado puede utilizarse. Por ejemplo, es magnetita, ferrita o sus mezclas.

10 La magnetita es un mineral ferrimagnético con la fórmula química Fe_3O_4 , uno de varios óxidos de hierro y un miembro del grupo de la espinela. El nombre químico de la IUPAC es óxido de hierro(II,III) y el nombre químico común es óxido ferroso-férrico. La fórmula para la magnetita también puede escribirse como $\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$, que es una parte de wustita (FeO) y una parte de hematita (Fe_2O_3). Esto se refiere a los diferentes estados de oxidación del hierro en una estructura, no es una disolución de sólidos.

15 Las ferritas son una clase de compuestos químicos con la fórmula AB_2O_4 , en la que A y B representan diversos cationes metálicos, que normalmente incluyen hierro. Estos materiales cerámicos se utilizan en aplicaciones que varían desde componentes magnéticos en microelectrónica. Las ferritas son una clase de espinelas, materiales que adoptan un motivo cristalino que consiste en óxidos cúbicos en disposición muy compacta (FCC) con cationes A que ocupan una octava parte de los huecos octahédricos y cationes B que ocupan la mitad de los huecos octahédricos. El material magnético conocido como "ZnFe" tiene la fórmula ZnFe_2O_4 , ocupando Fe^{3+} los sitios octahédricos y la mitad de los sitios tetrahédricos. El resto de los sitios tetrahédricos en esta espinela están ocupados por Zn^{2+} .

20 Para la esterilización térmica de una partícula magnética, se prefiere que los materiales utilizados sean mecánicamente resistentes hasta aproximadamente la temperatura del autoclave de 120 °C. Otras propiedades beneficiosas incluyen una alta resistencia química, hidrofiliidad, que puedan mezclarse con el material magnético en partículas, que sean químicamente inertes, baratos, y fáciles de producir. Los polímeros adecuados para su uso en una esfera de un material compuesto de la invención incluyen una resina epoxídica, una poliamida, un polipropileno y similares.

25 Para una simple transferencia de muestras, puede utilizarse cualquier forma tridimensional capaz de transferir al menos parte de la muestra. Por ejemplo, es una esfera de forma esférica, una varilla, una partícula con forma ovoide, una partícula cúbica o una partícula con una forma tridimensional no definida. Para un proceso de siembra en estrías óptimo, resulta importante que la partícula pueda "rodar" (en lugar de deslizarse o resbalar) sobre la superficie sólida a lo largo de al menos un eje de simetría. Por consiguiente, para la siembra en estrías se emplea una partícula esférica (esfera). La siembra en estrías o la distribución de una muestra, por ejemplo sobre un portaobjetos de vidrio, puede lograrse mediante diversos medios, por ejemplo utilizando una varilla o una esfera. En especial cuando se realiza una siembra en estrías para obtener colonias individuales, resulta deseable una superficie de contacto óptima entre la partícula y el medio de crecimiento sólido.

30 El diámetro de la esfera puede elegirse según las circunstancias específicas. Puede depender del volumen de la muestra que se desea sembrar en estrías y/o de las características de la muestra, tales como la concentración (sospechada) del microorganismo. Las esferas adecuadas tienen un diámetro de 2 a 8 mm. Se obtienen unos resultados de distribución muy buenos con unas esferas que tienen un diámetro de 4-6 mm. La densidad de la esfera también influye en las propiedades de distribución. Por ejemplo, si la densidad es demasiado baja, la fricción con la superficie (por ejemplo, un medio de cultivo de agar) no es suficiente para asegurar un buen rodamiento de la esfera. Por otra parte, una densidad muy alta dañará la superficie del agar o incluso hará que la esfera se hunda en el agar cuando se deje en una posición fija durante cierto tiempo. La densidad de la esfera permite que la esfera permanezca quieta sobre el medio de agar durante al menos 15 segundos, más preferiblemente al menos 20 segundos. En una realización, la densidad de la esfera es menor que aproximadamente 7 g/cm^3 , preferiblemente menor que 5 g/cm^3 . En un aspecto específico, la densidad de la esfera es menor que 4 g/cm^3 .

35 La superficie de la partícula magnética es rugosa. Dicha al menos una partícula magnética tiene una superficie rugosa o al menos una cavidad para recibir la muestra. Debido a su mayor superficie específica, una partícula rugosa puede alojar un volumen mayor de muestra. Puede ser una esfera magnética con depresiones distribuidas de forma aleatoria o regular sobre su superficie, por ejemplo como una pelota de golf.

La rugosidad superficial media de un material puede expresarse mediante los parámetros de rugosidad Ra y/o Rz.

Ra = media aritmética del valor de rugosidad

40 Ra, siendo un parámetro de rugosidad, es un valor que es reconocido y se emplea a nivel internacional. Indica el valor de la media aritmética de los valores absolutos de las desviaciones del perfil dentro del área de muestra. El valor numérico de Ra siempre es menor que la lectura de Rz derivada de la misma muestra.

Rz = profundidad de rugosidad media (de pico a valle)

Rz indica la profundidad de rugosidad media, es decir, la media aritmética de las mediciones individuales más altas de varias secciones de seguimiento adyacentes individuales.

5 Una partícula magnética para su uso en la presente invención tiene una rugosidad superficial media en el intervalo de $R_a = 0,1 \mu\text{m}$ a $R_a = 25 \mu\text{m}$. Puede utilizarse un valor de R_a de aproximadamente $0,1$ a aproximadamente $0,5 \mu\text{m}$ para sólo distribuir una muestra sobre una superficie. Un valor de R_a de aproximadamente $10 \mu\text{m}$ a aproximadamente $25 \mu\text{m}$ se emplea de forma adecuada para la inoculación y la distribución, puesto que una superficie rugosa recoge un volumen mayor de inóculo. Se prefiere un valor de R_a de entre 2 y $15 \mu\text{m}$, tal como 5 - $10 \mu\text{m}$. Los valores de R_z adecuados varían entre aproximadamente 10 a aproximadamente $40 \mu\text{m}$, tales como 12 - $30 \mu\text{m}$.

10 En una realización específica, una esfera de un material compuesto tiene un valor de R_a de aproximadamente $6 \mu\text{m}$, y un valor de R_z de aproximadamente $25 \mu\text{m}$.

15 La invención también proporciona una esfera magnética de un material compuesto adecuada para su uso en un método de la invención. La esfera de un material compuesto, que comprende al menos un material magnético y al menos un material no magnético, tal como un polímero hidrófilo, puede tener una o más de las anteriores propiedades preferidas. Por ejemplo, la invención proporciona una esfera magnética que tiene un núcleo magnético, una superficie hidrófila, un diámetro de 4 - 6 mm y/o una densidad menor que 6 g/cm^3 .

Método de transferencia

20 En un método de transferencia controlada de modo magnético de la invención, se emplea al menos una partícula magnética como vehículo de transporte para transferir al menos parte de la muestra, por ejemplo para transferir una muestra líquida desde un vial a otro, o desde un vial a un medio sólido. Preferiblemente, se emplean múltiples partículas. La partícula o partículas actúan como vehículo, y la cantidad de muestra transferida dependerá de las propiedades de la partícula o partículas y de la muestra. En particular, el tamaño, la forma y la superficie de la partícula determinan la superficie de contacto y el grado de cohesión con la muestra.

25 El movimiento de la partícula desde un primer vehículo a un segundo vehículo es controlado por un campo magnético móvil. Como primera etapa, al menos parte de dicha muestra asociada con un primer vehículo se pone en contacto con al menos una partícula ferromagnética. La expresión "asociada con" pretende incluir cualquier tipo de interacción entre la muestra y el vehículo. Por ejemplo, una o más partículas magnéticas se añaden a una muestra líquida alojada en un recipiente para que absorban la muestra o se revistan con ésta. Como otro ejemplo, una partícula se deja caer sobre un cultivo bacteriano confluyente en una placa de cultivo. Opcionalmente, el contacto de la muestra con la partícula incluye mover la partícula en la muestra o sobre ésta. Por ejemplo, una o más esferas magnéticas añadidas a una muestra líquida se agitan brevemente para homogeneizar la muestra y asegurarse de que una porción representativa de la muestra se asocie con la partícula. La agitación puede lograrse aplicando un campo magnético que cambia con rapidez y/o agitando en vórtice. En el caso en que la muestra esté asociada con un primer vehículo sólido, la partícula puede moverse en una o más direcciones, por ejemplo mediante un campo magnético externo, para aumentar la superficie específica de contacto entre la partícula y la muestra.

35 Después de poner en contacto dicha al menos una partícula con la muestra, se emplea un campo magnético externo para sacar o alejar la partícula revestida con la muestra del primer vehículo, y se transfiere la partícula a un segundo vehículo. Por tanto, la segunda etapa implica aplicar un campo magnético externo para permitir un movimiento controlado de modo magnético de dicha partícula, de forma que al menos parte de la muestra se transfiere a dicho segundo vehículo. El segundo vehículo puede ser de cualquier tipo. Por ejemplo, es un medio de cultivo líquido contenido en un tubo o un matraz, un medio de crecimiento sólido, o cualquier superficie sólida de interés. De nuevo, la partícula magnética puede moverse o agitarse para maximizar la liberación de la muestra desde la partícula hacia el segundo vehículo. Tras la liberación de la muestra sobre el segundo vehículo, la partícula puede retirarse o sacarse del segundo vehículo, y después puede desecharse o puede esterilizarse y volverse a utilizar.

45 Se entenderá que un método de transferencia según la invención tiene infinitas aplicaciones. Las aplicaciones específicas incluyen la preparación de una dilución en serie de una cepa o una muestra microbiana concentrada. Por ejemplo, se proporciona una esfera magnética a un inóculo bacteriano alojado en un primer tubo. La esfera revestida con el inóculo es transferida mediante un campo magnético móvil a un segundo tubo provisto de un caldo de cultivo líquido. Después de una agitación vigorosa, la esfera de nuevo se retira del tubo y se transfiere a un tercer tubo que contiene un caldo de cultivo líquido. Por supuesto, también es posible dejar cada esfera en el tubo y utilizar esferas nuevas para cada transferencia. Después, las muestras pueden tomarse de cada tubo para su posterior transferencia y análisis, por ejemplo para hacer una siembra en estrías sobre una placa Petri utilizando un método de siembra en estrías controlado de modo magnético según la invención. En una realización, la invención proporciona un método para transferir una muestra microbiana desde un primer vehículo a un segundo vehículo, siendo el segundo vehículo un vehículo sólido, que comprende las etapas de:

a) poner en contacto al menos parte de dicha muestra asociada con dicho primer vehículo con al menos una partícula ferromagnética;

b) aplicar un gradiente de campo magnético para permitir un movimiento controlado de modo magnético de dicha partícula hacia dicho segundo vehículo, de forma que al menos parte de la muestra se transfiere a la superficie de dicho segundo vehículo; y

5 c) aplicar un gradiente de campo magnético para permitir un movimiento controlado de modo magnético de dicha partícula sobre dicha superficie, de forma que al menos parte de la muestra se siembra en estrías sobre el vehículo sólido. Para permitir una actuación de siembra en estrías óptima (véase anteriormente en la presente), se prefiere que dicha al menos una partícula ferromagnética sea una esfera de un material compuesto.

10 Un método de la invención no está limitado a la transferencia de una muestra, seguido de su distribución sobre una superficie, sino que también puede utilizarse de modo adecuado para sólo transferir una muestra a una superficie sólida. Para los análisis realizados generalmente en laboratorios microbiológicos (médicos), el inóculo habitualmente se distribuye sobre la superficie de un medio de crecimiento sólido. En otros sectores, tales como los laboratorios para el análisis de agua, es habitual inocular una placa Petri vacía sin agar. Después de la inoculación con una muestra acuosa, el agar líquido se dispensa sobre la placa Petri. El agar líquido se mezcla con la muestra y se cosolidifica.

15 *Método de siembra en estrías*

Un método para la siembra en estrías de una muestra microbiana sobre un vehículo sólido incluye cualquier tipo de distribución de una muestra o de siembra en estrías de una muestra sobre cualquier tipo de superficie sólida. Por ejemplo, una muestra se siembra en estrías con facilidad sobre un portaobjetos de vidrio para posteriores análisis, tales como una tinción Gram o un reconocimiento visual. En una realización preferida, se proporciona un método para la siembra en estrías de una muestra microbiana, preferiblemente un espécimen clínico, para obtener colonias individuales.

20 Al menos una esfera de un material compuesto ferromagnética (véase anteriormente en la presente) se pone en contacto con una superficie sólida, y antes o después del contacto se proporciona la partícula con al menos parte de una muestra microbiana. La siembra en estrías de al menos parte de la muestra sobre el vehículo sólido se realiza mediante la aplicación de un campo magnético externo móvil para permitir el movimiento controlado de modo magnético de dicha esfera sobre dicha superficie. En una realización, se proporciona a la muestra al menos una esfera magnética antes de ponerse en contacto con la superficie sólida. Por ejemplo, una esfera magnética se deja caer al interior o a la superficie de una muestra para cubrir su superficie con al menos parte de la muestra, seguido de la transferencia o el movimiento de la esfera a la superficie sólida. De hecho, esta etapa puede considerarse como un "método de transferencia" descrito anteriormente.

25 En otro aspecto, al menos una partícula magnética se pone en contacto con la superficie sólida antes de proporcionarse a la muestra. En un ejemplo de realización, una muestra y una partícula se depositan en etapas separadas sobre una superficie sólida, tras lo cual la partícula o partículas son movidas por un campo magnético para distribuir la muestra. La muestra puede depositarse sobre la partícula o cercana a ésta, por ejemplo de modo manual o automático. Después de completar la siembra en estrías, dicha al menos una partícula puede retirarse de la superficie sólida, de nuevo utilizando un campo magnético externo.

30 El vehículo sólido preferiblemente es un medio de cultivo sólido contenido en una placa poco profunda (desechable), tal como una placa Petri. Las placas de agar se utilizan con mucha frecuencia en microbiología. En un aspecto específico, la invención proporciona un método para sembrar en estrías una muestra microbiana sobre un medio de crecimiento sólido mantenido en una placa Petri dividida.

35 Un medio de crecimiento sólido mantiene el crecimiento de uno o más microorganismos presentes o sospechosos de estar presentes en la muestra. En la técnica de la microbiología se conocen diversos medios de crecimiento. Estos incluyen los denominados medios selectivos, los medios diferenciales y los medios enriquecidos.

40 Los medios selectivos se emplean para el crecimiento solamente de microorganismos seleccionados. Por ejemplo, si un microorganismo es resistente a cierto antibiótico, tal como ampicilina o tetraciclina, entonces este antibiótico puede añadirse al medio para evitar que crezcan otras células que no posean la resistencia. Los medios de crecimiento selectivos también se emplean en cultivos celulares para asegurar la supervivencia o la proliferación de células con ciertas propiedades, tales como la resistencia a antibióticos o la capacidad para sintetizar un metabolito concreto. Normalmente, la presencia de un gen específico o de un alelo de un gen confiere a la célula la capacidad de crecer en el medio selectivo. En estos casos, el gen se denomina marcador. A menudo se emplean placas de agar-sangre para diagnosticar una infección.

45 Los medios diferenciales o medios indicadores distinguen un tipo de microorganismo de otro que crece sobre el mismo medio. Este tipo de medios utiliza las características bioquímicas de un microorganismo que crece en presencia de nutrientes específicos o indicadores (tales como rojo neutro, rojo de fenol, eosina y, o azul de metileno) añadidos al medio para indicar de modo visible las características definitorias de un microorganismo. Este tipo de medios se emplea para la detección de microorganismos y por los biólogos moleculares para detectar cepas recombinantes de bacterias.

El medio enriquecido contiene los nutrientes requeridos para mantener el crecimiento de una amplia variedad de organismos, incluyendo algunos de los más exigentes. Se emplean habitualmente para recolectar el mayor número de tipos diferentes de microbios presentes en un espécimen. El agar-sangre es un medio enriquecido en el que la sangre completa nutricionalmente rica suplementa a los nutrientes básicos.

5 *Gradiente de campo magnético*

Un gradiente de campo magnético es una variación en el campo magnético con respecto a la posición. Las partículas magnéticas se mueven en presencia de un gradiente de campo magnético. Por tanto, se puede hacer que se muevan a lo largo de la dirección y de la magnitud del campo. Las partículas pueden ser conducidas o guiadas, por ejemplo arrastrándolas utilizando uno o más imanes permanentes de barrido externos. Un gradiente de campo magnético unidimensional es una variación con respecto a una dirección, mientras que un gradiente bidimensional es una variación con respecto a dos, etc. El campo magnético puede variar en intensidad y/o dirección, y puede lograrse variando mecánicamente las posiciones de uno o más imanes con respecto a la partícula. Los imanes adecuados incluyen imanes permanentes y electroimanes. Los imanes permanentes disponibles en el mercado incluyen elementos metálicos magnéticos, composiciones tales como cerámicas y ferritas, e imanes de tierras raras. Los electroimanes también están disponibles en el mercado.

En una realización preferida, la aplicación de un gradiente de campo magnético comprende el uso de un campo electromagnético. El núcleo del electroimán preferiblemente tiene una alta permitividad para lograr una intensidad de campo alta utilizando una potencia eléctrica baja.

Un aspecto específico se relaciona con el uso de una cuadrícula o matriz de múltiples electroimanes pequeños para aplicar un gradiente de campo magnético, generalmente en un patrón predeterminado. La intensidad y dirección del gradiente del campo magnético controlan la dirección y/o la magnitud que determina el recorrido, las longitudes, la intensidad y/o el patrón del movimiento de la partícula. Por ejemplo, una esfera magnética revestida con una muestra puede sacarse de un tubo mediante un electroimán colocado junto al tubo para sacar la esfera, seguido de un movimiento hacia arriba del imán que es seguido del movimiento de la esfera. La esfera entonces puede transferirse a cualquier destino deseado mientras está unida al imán. Tras llegar al destino deseado, la esfera puede liberarse con facilidad del imán desconectando el campo magnético.

Los expertos en la técnica serán capaces de determinar la intensidad de campo magnético óptima para una situación específica. Cuando se inocula y/o se siembra en estrías un medio de crecimiento sólido, la intensidad de campo debe ser lo más alta posible con la condición de que la partícula magnética no dañe al medio. En una realización en la que se emplean una o más esferas para la distribución de la muestra sobre el agar, el campo magnético sólo produce una fuerza horizontal sobre la esfera o esferas y ninguna fuerza vertical, dando como resultado el rodamiento de la esfera o esferas sin dañar al agar.

El movimiento de la esfera puede lograrse, por ejemplo, utilizando un imán de neodimio permanente (NdFeB) con una intensidad de campo superficial de 0,7 T (tesla) y un diámetro de 6 mm por 3 mm de altura. La intensidad de campo disminuye con rapidez más allá del imán. La distancia entre la partícula magnética y el imán puede minimizarse en vista de la intensidad de campo y/o la precisión del movimiento controlado de modo magnético. El imán o imanes se colocan, por ejemplo, en lo fundamental directamente (por ejemplo, con un espaciado de sólo 0,5 a 5 mm) por debajo de la placa Petri. En un método de siembra en estrías proporcionado en la presente, el gradiente de campo magnético externo puede hacer que al menos una partícula magnética siga un patrón de zigzag, un patrón concéntrico, un patrón de cuatro cuadrantes, o un patrón aleatorio sobre la superficie de un vehículo sólido (véase la figura 2).

Recipiente

Para detectar microorganismos, por ejemplo bacterias, en muestras clínicas, un espécimen puede recogerse del sitio infectado utilizando un hisopo, que después se inserta en un recipiente de transporte. Las muestras de orina y otros fluidos se recogen en viales apropiados. Un recipiente adecuado o diseñado para recibir o recoger una muestra microbiana comprende al menos una partícula magnética. En una realización, el recipiente es un recipiente desechable, preferiblemente un vial o tubo de ensayo desechable. Preferiblemente, el recipiente puede alojar una muestra líquida, por ejemplo una muestra microbiana líquida, un medio de transporte líquido y/o un medio de crecimiento líquido. Puede proporcionarse con una tapa móvil. Los ejemplos de recipientes incluyen dispositivos para recoger, transportar y/o conservar especímenes biológicos. Dicha al menos una partícula magnética presente en el recipiente se emplea de forma ventajosa para homogeneizar y/o transferir la muestra microbiana mantenida en el recipiente.

En una realización, el recipiente comprende, además de una o más partículas magnéticas, un medio de transporte líquido o un medio de cultivo líquido. Este recipiente se emplea de forma ventajosa como dispositivo de recolección en un sistema de cultivo de hisopo. Como alternativa, o además, puede contener un hisopo para recoger una muestra microbiana (véase, por ejemplo, el documento WO 2004/086979). Un sistema de cultivo de hisopo ideal debe tener la capacidad de absorber organismos desde el sitio de infección, de mantener la viabilidad de los organismos durante el transporte y antes del cultivo en placa y, por último, de permitir la liberación de los

organismos desde el hisopo hacia el medio apropiado. Estos son todos aspectos críticos que deben considerarse cuando se elija el dispositivo de recolección más apropiado. Las partículas magnéticas en un recipiente de la invención pueden ayudar a la liberación de la muestra desde el hisopo antes del análisis. El recipiente que comprende una muestra microbiana se somete, de forma ventajosa, a un método de transferencia o de siembra en estrías según se proporciona en la presente.

La invención también se refiere a un aparato adecuado para su uso en un método según la invención, comprendiendo dicho aparato una estación de carga de placas de cultivo, una unidad de muestreo para aplicar o inocular la muestra sobre una placa de cultivo, un mecanismo de siembra en estrías, y un sistema de control informático, que se caracteriza porque la unidad de muestreo y/o dicho mecanismo de siembra en estrías se proporcionan con al menos un imán para generar un gradiente de campo magnético, y en el que el sistema de control está conectado a dicho al menos un imán.

En un aspecto específico, la invención proporciona un aparato para la siembra en estrías de alta capacidad de procesamiento automática o semiautomática de una muestra microbiana utilizando un gradiente de campo magnético. El aparato contiene preferiblemente múltiples posiciones de inoculación y distribución para el procesamiento paralelo de múltiples muestras. Los sistemas de siembra en estrías automáticos son conocidos *per se* en la técnica. Generalmente, comprenden una estación de carga de placas de cultivo, una unidad de muestreo para aplicar o inocular una muestra sobre una placa de cultivo, un mecanismo de siembra en estrías, y un sistema de control informático para controlar los elementos del aparato. En una realización, un aparato según la presente invención se caracteriza porque la unidad de muestreo, y preferiblemente también el mecanismo de siembra en estrías, comprende al menos un imán para genera un gradiente de campo magnético, y un sistema de control conectado a dicho al menos un imán, para controlar la inoculación de modo magnético, y preferiblemente también la siembra en estrías de la placa de cultivo. Por consiguiente, la invención proporciona un aparato adecuado para realizar un método según la reivindicación 1 y las que dependan de ella, de una manera automática o semiautomática, comprendiendo dicho aparato una estación de carga de placas de cultivo, una unidad de muestreo para aplicar o inocular la muestra sobre una placa de cultivo, un mecanismo de siembra en estrías, y un sistema de control informático, que se caracteriza porque dicha unidad de muestreo, y opcionalmente también dicho mecanismo de siembra en estrías, se proporcionan con al menos un imán capaz de generar un gradiente de campo magnético, y en el que el sistema de control está conectado a dicho al menos un imán.

Un aparato de siembra en estrías para realizar un método de siembra en estrías según la reivindicación 2 de una manera automática o semiautomática, comprendiendo dicho aparato una estación de carga de placas de cultivo, una unidad de muestreo para aplicar o inocular la muestra sobre una placa de cultivo, un mecanismo de siembra en estrías, y un sistema de control informático, en el que dicho mecanismo de siembra en estrías se proporciona con al menos un imán capaz de generar un gradiente de campo magnético, y en el que el sistema de control está conectado a dicho al menos un imán, comprendiendo dicho aparato además una unidad dispensadora de partículas magnéticas que comprende una pluralidad de esferas magnéticas de un material compuesto.

Dicho aparato proporciona un sistema versátil para variar el procedimiento de siembra en estrías, por ejemplo, según la muestra que se va a sembrar en estrías. Estos patrones pueden proporcionar una mayor dilución de la muestra y se realizan mediante una herramienta de siembra en estrías controlada de modo magnético. Una vez se ha realizado la siembra en estrías, las placas preparadas entonces pueden incubarse para estimular el crecimiento de uno o más microorganismos. El crecimiento entonces puede estudiarse o someterse a otros ensayos para el aislamiento y/o la identificación del tipo o tipos de microorganismos presentes en el espécimen.

Un aparato proporcionado en la presente tiene varias ventajas frente a los sistemas de siembra en estrías conocidos en la técnica. Es más flexible con respecto al tipo de espécimen y al tipo de vehículo al cual se transfiere o se distribuye la muestra (por ejemplo, una placa Petri normal, una placa Petri en miniatura, una placa Petri de tipo dividido, un portaobjetos de vidrio, un tubo de cultivo). Pueden utilizarse diferentes tamaños de partículas para diferentes aplicaciones. Dentro de un aparato, las partículas magnéticas son fáciles de aplicar y de retirar desde un vehículo a otro, debido al control magnético. Por razones explicadas en la presente anteriormente, se prefieren las esferas magnéticas de un material compuesto. Las partículas pueden reutilizarse después de una esterilización. Mediante la utilización de gradientes de campo magnético puede programarse un número infinito de diferentes patrones de siembra en estrías, y éstos pueden cambiarse con facilidad entre medio de las muestras. El uso de varios imanes capaces de inducir un gradiente de campo magnético permite el procesamiento de muchas muestras de modo simultáneo. La capacidad global de un aparato de siembra en estrías controlado de modo magnético puede ser muy alto, hasta 3 o incluso 4 veces mayor comparado con el aparato de mejor rendimiento que está disponible en el mercado en la actualidad.

Un aparato de la invención preferiblemente comprende un sistema transportador para transportar y manipular los recipientes con los especímenes (por ejemplo, un tubo con orina o un hisopo) hacia el aparato. Los recipientes pueden asirse de modo manual o mediante un dispositivo de manipulación automático, y trasladarse a una posición deseada, por ejemplo cerca de la placa de cultivo en la que se va a realizar la siembra en estrías. El dispositivo de manipulación puede diseñarse para que retire una tapa del recipiente. Según la invención, la inoculación de la muestra sobre múltiples vehículos, por ejemplo una placa Petri, un tubo que contenga un caldo de cultivo de

crecimiento líquido, y un portaobjetos de vidrio, puede realizarse en una única etapa del proceso, por ejemplo utilizando pipeteado proporcional.

5 En la unidad de muestreo, la muestra puede transferirse desde el recipiente a un vehículo, tal como una placa de cultivo, de una manera automática. En una realización, el recipiente con el espécimen es un recipiente según la presente invención, que comprende al menos una partícula magnética, tal como una o más esferas magnéticas (de un material compuesto). Mediante la adición de las partículas magnéticas a una muestra en fase líquida, por ejemplo orina, o a un tubo con un hisopo insertado en un medio de transporte líquido, las placas de cultivo pueden inocularse y distribuirse utilizando el mismo principio subyacente, es decir, a través del movimiento controlado de modo magnético de una o más partículas magnéticas. Esto omite el uso de hisopos y asas de inoculación,

10 El sistema de control del aparato puede programarse para producir un gradiente de campo magnético que permita la transferencia controlada de modo magnético de una muestra según un "método de transferencia" proporcionado en la presente. Por tanto, la unidad de muestreo puede comprender uno o más imanes para 1) permitir la retirada de al menos una partícula magnética que porta una muestra procedente de un recipiente para especímenes, y 2) transferir dicha partícula y la muestra asociada a un emplazamiento de depósito sobre una placa de cultivo. El recipiente para especímenes entonces puede proporcionarse de nuevo con una tapa. Sin embargo, mientras el recipiente no esté tapado puede resultar conveniente transferir la muestra no sólo a una placa de cultivo, sino también a otros tipos de vehículos, tales como un portaobjetos de vidrio o un caldo de cultivo líquido. El aparato por tanto también puede proporcionar una unidad dispensadora de portaobjetos y/o una unidad dispensadora de tubos.

20 Cuando la muestra se ha transferido a la placa de cultivo, por ejemplo mediante el movimiento controlado de modo magnético de una partícula provista de una muestra, se realiza la siembra en estrías en la unidad de siembra en estrías del aparato. Dicha unidad de siembra en estrías está controlada por el sistema de control informático. Si el mecanismo de siembra en estrías está provisto de al menos un imán, entonces proporciona la siembra en estrías controlada de modo magnético de muestras bacterianas en patrones programables para producir colonias bacterianas aisladas.

25 El aparato también puede proporcionar otros medios conocidos en la técnica por poderse utilizar en la manipulación y/o siembra en estrías de muestras automática, por ejemplo uno o más de los elementos descritos en el documento WO 2005/071055, distintos del dispositivo de siembra en estrías "de tipo peine" específico mencionado en ello. Éstos incluyen un medio para la retirada de la tapa de la placa de cultivo para retirar y volver a colocar la tapa de las placas de cultivo en las que se va a realizar una siembra en estrías. Otros elementos útiles de un aparato incluyen una unidad de identificación de muestras, preferiblemente capaz de leer códigos de barras sobre un recipiente para especímenes.

30 Un aparato de la invención puede utilizarse como sigue:

1. Una muestra con código de barras se explora de forma que el aparato sabe cuál placa Petri/tubo/portaobjetos debe inocularse. Se necesitan las placas Petri requeridas.
- 35 2. Las placas Petri llegan a la unidad de muestreo en el orden correcto.
3. El medio de retirada de la tapa automático retira la tapa de las placas.
4. Una unidad dispensadora de portaobjetos y una unidad dispensadora de tubos presentan los portaobjetos y los tubos requeridos a la unidad de muestreo.
- 40 5. Un trabajador del laboratorio toma la muestra y la inocula de modo manual en las placas Petri, portaobjetos y tubos.
6. Una unidad dispensadora de partículas magnéticas coloca al menos una esfera magnética de un material compuesto en un emplazamiento predeterminado sobre la placa Petri.
7. La tapa se vuelve a poner sobre la placa, y la placa se traslada hasta el mecanismo de siembra en estrías.
- 45 8. Se aplica un gradiente de campo magnético para distribuir la muestra sobre el medio de crecimiento sólido en la placa Petri con un patrón deseado según la muestra.
9. Después de retirar la esfera, las placas se retiran del mecanismo de siembra en estrías y se transportan a los incubadores para estimular el crecimiento de los microorganismos.

Descripción de las figuras

50 La figura 1 muestra vistas en perspectiva esquemáticas de un vehículo sólido provisto de una partícula magnética. La muestra no se incluye en los dibujos. Se ilustran diversas realizaciones en las que puede utilizarse un gradiente de campo magnético bidimensional para controlar el movimiento de una partícula magnética, en este caso una esfera magnética, sobre la superficie de un vehículo sólido, por ejemplo un medio de crecimiento contenido en una

placa Petri. En los paneles B y C se ha cortado y retirado una sección de la placa Petri para ilustrar mejor la posición del imán o imanes externos.

5 En el panel A, el movimiento de una partícula magnética 1 sobre la superficie de la placa 3 se controla a través de un gradiente de campo magnético generado mediante un imán permanente 2 unido a un mecanismo de movimiento 4, capaz de mover el imán en la dirección x y/o y. El mecanismo de movimiento puede ser controlado por un programa informático para generar un gradiente de campo magnético para crear el patrón de siembra en estrías deseado.

10 En el panel B, la esfera magnética 1 se traslada a través de la superficie del agar mediante el uso de un electroimán controlable 102. El electroimán 102 se coloca justo debajo de la placa Petri 3. El imán puede moverse utilizando el mecanismo mostrado en el panel A.

15 En el panel C, el movimiento de la esfera magnética 1 se controla a través de una cuadrícula de múltiples electroimanes adyacentes 202. La cuadrícula de electroimanes mueve la esfera conectando y desconectando los imanes con un patrón y un orden controlados, generando con ello un gradiente de campo magnético. En este caso, la esfera puede moverse sobre la superficie de la placa 3 sin la necesidad de un mecanismo de movimiento que tenga partes móviles.

La [figura 2](#) muestra dibujos esquemáticos de ejemplos de patrones de siembra en estrías que pueden obtenerse utilizando un método de la invención.

Panel A: patrón de siembra en estrías en zigzag sobre placas completas extensivo

20 Panel B: patrón de siembra en estrías en zigzag sobre placas completas intensivo durante la primera mitad de la placa, y después extensivo sobre la segunda mitad de la placa

Panel C: patrón de siembra en estrías en zigzag sobre una placa dividida

Panel D: patrón de siembra en estrías de cuatro cuadrantes sobre una placa completa

Panel E: movimiento aleatorio

Panel F: siembra en estrías sobre un portaobjetos de vidrio

25 La [figura 3](#) muestra unos dibujos esquemáticos de la sección transversal de diversas esferas utilizadas en el ejemplo 2. La esfera nº 1 es una esfera de acero sin materiales compuestos conocida en la técnica. Las esferas 2-5 representan esferas de un material compuesto según la invención. Para más detalles, véase el ejemplo 2.

Ejemplos

Ejemplo 1

30 Se realizaron experimentos para evaluar la actuación de la técnica de distribución controlada de modo magnético según la invención, comparado con la técnica de distribución convencional que emplea un asa de inoculación de plástico.

35 Se aplicaron 10 µl de una suspensión bacteriana que contenía *E. coli* en medio de una placa Petri que contenía medio de crecimiento de agar-sangre sólido. En una placa se realizó una siembra en estrías con un asa de inoculación con el típico patrón de siembra en estrías en zigzag. En la segunda placa se aplicó una esfera magnética sobre la muestra inoculada. Se colocó un imán permanente bajo la placa Petri, y el imán se movió de modo manual de forma que la esfera se traslada sobre la superficie sólida del medio de crecimiento con un patrón de siembra en estrías en zigzag similar al de la primera placa. Tras la siembra en estrías, la esfera se retiró mediante la aplicación de una fuerza magnética. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C para permitir el crecimiento de las colonias de *E. coli*.

40 La inspección visual de las placas después del periodo de incubación reveló que los resultados de la segunda placa fueron superiores en el sentido de que la siembra en estrías final produce más colonias aisladas individuales. Posiblemente esto es debido al hecho de que las esferas están rodando mientras distribuyen las bacterias sobre el medio sólido, proporcionando una mejor dilución de la muestra que la que puede obtenerse utilizando asas convencionales. Se observaron ventajas similares de la distribución mediada por esferas para una cepa bacteriana diferente (*S. saprophyticus*) y con un patrón de siembra en estrías diferente.

Ejemplo 2. Propiedades de la esfera magnética

1. Materiales de la esfera

50 El principio de la distribución con una esfera se basa en una esfera/partícula magnética. Es evidente que al menos un material de la esfera debe ser magnético o ser capaz de ser influido por un imán. Se descubrió que la esfera

ES 2 370 958 T3

5 debe rodar para lograr un resultado de distribución bueno. Por tanto, no puede utilizarse una esfera que sea un imán en sí misma. Además tampoco puede utilizarse una esfera ferromagnética que forme un dipolo. Se determinó la actuación de distribución de diversas esferas de materiales compuestos (nº 2-5; véase la figura 3) y se comparó con una esfera de acero inoxidable fabricada sin materiales compuestos (nº 1) utilizada en los métodos y los dispositivos de siembra en estrías de la técnica anterior.

1. Materiales no compuestos: una esfera de acero inoxidable maciza (ejemplo comparativo).

2. Material compuesto (núcleo macizo revestido con un polímero): una pequeña esfera de acero inoxidable se cubre con epoxi para que ruede mejor.

10 3. Material compuesto (núcleo de alambre revestido con un polímero): se pliega alambre de acero para producir una forma globular, y se crea la superficie con epoxi.

4. Material compuesto (núcleo de polímero revestido con un material magnético): una esfera de epoxi se cubre con una capa de partículas de hierro.

5. Material compuesto (mezcla homogénea de un material magnético y un material no magnético): el epoxi se mezcla con partículas de hierro.

15 Resultados del ensayo

En la tabla a continuación se resumen los resultados del ensayo. Las esferas se juzgan por medio de los siguientes puntos.

nº de esfera: construcción y materiales de la esfera, véase anteriormente

Rodamiento: calidad del rodamiento

20 Recogida de la muestra: el volumen de muestra inoculada total que puede ser recogido por la esfera

Colonias individuales: cantidad de colonias individuales sobre una placa de agar, un indicador de la calidad de la distribución bacteriana sobre la placa

Velocidad: la velocidad de distribución que puede alcanzarse

25 Los puntos varían en un intervalo entre - y ++. Para determinar la cantidad total se cuentan todos los "+". Un "-" resta un punto y "+/-" significa sin puntos.

Tabla 1: Resultados del ensayo obtenidos con esferas fabricadas sin materiales compuestos frente a diversos tipos de esferas de materiales compuestos

nº de esfera	Rodamiento	Recogida de la muestra	Colonias individuales	Velocidad	Total
1	-	+	-	+	0
2	+/-	++	+	+/-	3
3	+	++	++	+	6
4	+/-	+	+	-	1
5	++	++	++	+	7

30 La superficie de las esferas determina, entre otros, la calidad de la distribución, porque la superficie es responsable de la recogida y la liberación de las bacterias. Las esferas con un revestimiento de polímeros sobre el exterior producen el mejor resultado de distribución, mientras que las esferas con hierro sobre el exterior proporcionan una distribución peor. La superficie de polímero tiene mayor rugosidad, por tanto recogerá más muestra.

35 Hay dos puntos principales que determinan el rodamiento de la esfera: a) la rugosidad de la superficie provoca resistencia con el agar; a través de la resistencia, la esfera se encuentra con una fuerza que le permite rodar; b) las propiedades del material magnético. Las propiedades magnéticas son responsables de dos fuerzas:

1. La formación de un dipolo; el dipolo intentará mantenerse alineado con el imán bajo la placa.

2. El campo magnético introduce corrientes en remolino en el metal que conducen a un momento opuesto a la dirección del movimiento. Esta fuerza sólo está presente si la esfera rueda, frenará a la esfera pero no evita su

rodamiento.

5 Siempre que la fuerza de la resistencia sea mayor que las 2 fuerzas magnéticas combinadas, la esfera rodará. Un núcleo magnético preferido para la esfera está fabricado de un material que no tenga dipolos magnéticos ni corrientes en remolino. Este es un material con fuerzas desmagnetizantes muy bajas, dividido en partículas pequeñas (cuanto más pequeñas sean las partículas, menor serán las corrientes en remolino). Un material magnético en polvo se emplea de forma adecuada para este fin.

La esfera de acero inoxidable maciza conocida en la técnica tiene unas fuerzas magnéticas demasiado altas y rodará mal o no rodará. La esfera de alambre (nº 4) y la esfera mezclada con polvos (nº 5) producen los mejores resultados. Sin embargo, la esfera de polvos mezclados es más fácil de producir.

10 Material de relleno

Para determinar la cantidad adecuada de partículas de hierro en la esfera, se fabricaron las siguientes esferas.

0,1 gramos de hierro	80% en masa	21% en volumen
0,2 gramos de hierro	80% en masa	43% en volumen
0,3 gramos de hierro	90% en masa	63% en volumen

15 Las esferas con 0,3 gramos de hierro son difíciles de producir. La cantidad de material de relleno tiene una ligera influencia sobre la calidad de la distribución y una ligera influencia sobre la velocidad de la distribución. Con cantidades mayores de hierro, la velocidad de distribución que se puede alcanzar es mayor. La cantidad más óptima de hierro es de 0,2 gramos. Por tanto, se utilizó una esfera con 0,2 gramos de polvo de hierro para posteriores ensayos.

2. Densidad de la esfera

20 Además de las propiedades de rodamiento, el peso de la esfera también es importante. El peso determina el tiempo que la esfera puede permanecer sobre el agar sin hundirse. Durante la distribución automática, es posible que la esfera permanezca sobre el mismo punto durante 20 segundos o incluso más. Los resultados del ensayo obtenidos con diversos tipos de esferas se ofrecen en la tabla 2.

Tabla 2: Efecto del diámetro de la esfera y del tipo de esfera sobre el hundimiento en agar sólido

Diámetro de la esfera (mm)	Tipo de esfera (véase la tabla 1)	Tiempo sin hundirse (seg)
5	1	10
5	3	17
5	5	25
7	1	15
7	3	27
7	5	40

25 La esfera de acero maciza se hunde en el agar demasiado deprisa. La esfera de alambre cubierto con polímero (nº 3), más grande, puede alcanzar los 20 segundos sin hundirse. La esfera fabricada con polímero mezclado con polvo de hierro puede permanecer sobre el agar durante más de 20 segundos, independientemente de su tamaño.

Las densidades de los materiales utilizados fueron:

Tipo 1: 7,2 g/cm³

30 Tipo 3: 4,3 g/cm³

Tipo 5: 3,9 g/cm³

Estos datos, combinados con los resultados de hundimiento de la tabla 2, indican que un material de esfera tiene, lo más preferiblemente, una densidad menor que 4,0 g/cm³.

3. Tamaño de la esfera

5 El tamaño de la esfera tiene una gran importancia sobre la distribución en sí misma; tiene una menor influencia sobre el crecimiento bacteriano como resultado de la distribución. Con la mayoría de los tamaños de las esferas, por ejemplo entre 4 y 7 mm, se logran unos buenos resultados de crecimiento bacteriano. La calidad del crecimiento bacteriano se determina por la cantidad de colonias individuales; cuanto más colonias individuales aparecen sobre la placa, mejor.

Tabla 3: Efecto del diámetro de la esfera sobre la actuación de distribución

Tamaño de la esfera	Velocidad	Recogida de la muestra	Colonias individuales	Sensibilidad	Total
3	+	+/-	+/-	-	0
4	++	+	+	+/-	4
5	++	++	++	+	7
6	+	++	++	+	6
7	+	+	++	++	6
8	+/-	+	+	++	4

Leyendas:
 Tamaño de la esfera: el diámetro de las esferas en mm.
 Velocidad: la velocidad de la distribución que se puede alcanzar.
 Recogida de la muestra: la cantidad de muestra inoculada total que puede ser recogida por la esfera.
 Colonias individuales: cantidad de colonias individuales sobre una placa de agar.
 Sensibilidad: la dificultad para impedir que la esfera se deslice sobre imperfecciones sobre la superficie del agar (por ejemplo, abolladuras, agujeros, muestra viscosa)

4. Superficie de la esfera

10 La superficie de la esfera es responsable del rodamiento y la distribución de la muestra. La influencia sobre el rodamiento se analizó en el capítulo previo.

Distribución de la muestra

15 La rugosidad de la superficie influye en la cantidad de muestra que puede recoger la esfera. La muestra forma una película alrededor de la esfera. Cuanto mayor sea la superficie específica, más muestra puede proporcionarse sobre la esfera.

Rugosidad

Las esferas muy adecuadas tienen la siguiente rugosidad:

VDI 36: Ra 6,30 µm

Rz 24,0 µm

20 (VDI es un indicador de la rugosidad utilizado en la industria de fabricación de moldes, en especial en Alemania. Los valores de Ra y Rz son unidades reconocidas a nivel internacional para la rugosidad de superficies).

Hidrofilia/hidrofobia

La superficie de la esfera debe ser capaz de atraer o adsorber la muestra. Casi todas las muestras biológicas tienen como componente principal el agua. Por tanto, se prefiere que la superficie de la esfera tenga un carácter hidrófilo.

25 5. Producción de la esfera

30 Para el ensayo de las esferas de materiales compuestos de tipo 5, se empleó una mezcla homogénea de epoxi y polvo de hierro de fabricación casera. Estos materiales no son muy adecuados para la producción en masa. Los materiales de relleno magnéticos disponibles en el mercado pueden combinarse con varios polímeros, que incluyen la magnetita y la ferrita. Las partículas magnéticas + polímero fundidas deben fluir hacia una cavidad de moldeado para formar la esfera. El tamaño de partícula del material magnético en forma de partículas tiene un impacto significativo sobre el caudal y sobre la calidad de la esfera producida. Preferiblemente, debe ser lo más pequeño

ES 2 370 958 T3

posible. Se prefieren los materiales magnéticos en polvo.

Magnetita. Es un material cerámico y, por tanto, es resistente a todas las formas de corrosión. Propiedades:

Material: Fe_3O_4

Densidad: 5,17 g/cm³

5 Resistencia química: muy alta

Ferrita. Propiedades:

Material: Fe, máximo del 0,05% de otros materiales

Densidad: 5,17 g/cm³

10 El polímero utilizado para unir el polvo/partículas magnéticas puede seleccionarse basándose en las siguientes propiedades:

- Alta resistencia química

- Que pueda mezclarse con la magnetita y la ferrita

- Resistencia mecánica hasta 120 °C (temperatura de un autoclave)

- Que no contenga partes minerales químicas que puedan desprenderse del material hacia la muestra

15 - Que sea barato y fácil de producir

El material utilizado para el ensayo es:

Material: PA, poliamida (nailon)

Densidad: 1,39-1,58 g/cm³

Resistencia a la tracción: 70-120 MPa

20 Intervalo de temperatura útil: -50 °C-120 °C

Temperatura de fusión (intervalo): 216

Dureza: 92 Rockwell (escala E)

Reactividad química: baja

Resistencia química: alta

25 Otra posibilidades son materiales termoplásticos habituales que cumplen los requerimientos indicados anteriormente. Por ejemplo:

Material: PP, polipropileno

Densidad: 0,90 g/cm³

Rendimiento de tracción: 23 MPa

30 Temperatura de ablandamiento: 143 °C

Temperatura de fusión (intervalo): 160 °C-166 °C

Dureza: 66 Rockwell (escala R)

Reactividad química: baja

Resistencia química: alta

35 La cantidad de polímero en comparación con la cantidad de material magnético es:

20-25% de polímero (unión)-75-80% de material magnético (intensidad magnética)

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para realizar una siembra en estrías de una muestra microbiana sobre un vehículo sólido, que comprende las etapas de:
- 5 a) poner en contacto al menos una partícula ferromagnética con la superficie de dicho vehículo sólido, siendo la partícula una esfera de un material compuesto que tiene una rugosidad superficial (Ra) en el intervalo de 0,1 a 25 μm , un diámetro entre 2 y 8 mm, y una densidad menor que 7 g/cm^3 , seguido o precedido de proporcionar la partícula con al menos parte de dicha muestra, y
- 10 b) aplicar un gradiente de campo magnético para permitir un movimiento controlado de modo magnético de dicha esfera sobre dicha superficie, de forma que al menos parte de la muestra se siembra en estrías sobre el vehículo sólido.
- 2.- El método según la reivindicación 1, en el que dicho vehículo es un portaobjetos de vidrio o un medio de cultivo sólido contenido en una placa de cultivo.
- 3.- El método según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha muestra microbiana es una espécimen clínico, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en orina, hisopos del tracto respiratorio superior, secreciones genitales, esputo, heces, pus, fluidos corporales estériles, y cultivos de sangre.
- 15 4.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la partícula tiene una rugosidad superficial de entre 2 y 15 μm , preferiblemente de 5 a 10 μm .
- 5.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha al menos una esfera de un material compuesto comprende al menos un polímero y al menos un material magnético, preferiblemente en el que la esfera comprende un núcleo magnético provisto de un revestimiento polimérico, o en el que la esfera comprende un núcleo polimérico cubierto por un revestimiento magnético.
- 20 6.- El método según la reivindicación 5, en el que la proporción en peso relativa del material magnético al polímero es entre 10:90 y 30:70, preferiblemente entre 20:80 y 25:75.
- 7.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la esfera de un material compuesto comprende magnetita o ferrita.
- 25 8.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el diámetro de la esfera es de 3-8 mm, preferiblemente 4-6 mm.
- 9.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la densidad de la esfera es menor que 5 g/cm^3 , preferiblemente menor que 4 g/cm^3 .
- 30 10.- Una esfera magnética de un material compuesto adecuada para su uso en un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, teniendo la esfera una rugosidad superficial (Ra) en el intervalo de 0,1 a 25 μm , un diámetro entre 2 y 8 mm, y una densidad menor que 7 g/cm^3 .
- 11.- La esfera magnética de un material compuesto según la reivindicación 10, comprendida en un recipiente para especímenes para recibir una muestra microbiana.
- 35 12.- La esfera magnética de un material compuesto según la reivindicación 11, comprendida en un recipiente que tiene la forma de un tubo, estando provisto dicho tubo de una tapa movable, y comprendiendo además un medio de cultivo o de transporte.
- 13.- La esfera magnética de un material compuesto según las reivindicaciones 11 ó 12, comprendida en un recipiente que comprende además un hisopo para recoger una muestra microbiana.
- 40 14.- Un aparato adecuado para realizar un método según la reivindicación 1 y las que dependen de ella, de una manera automática o semiautomática, comprendiendo dicho aparato una estación de carga de placas de cultivo, una unidad de muestreo para aplicar o inocular la muestra sobre una placa de cultivo, un mecanismo de siembra en estrías, y un sistema de control informático, en el que dicho mecanismo de siembra en estrías se proporciona con al menos un imán para generar un gradiente de campo magnético, y en el que el sistema de control está conectado a dicho al menos un imán, comprendiendo dicho aparato además una unidad dispensadora de partículas magnéticas que comprende una pluralidad de esferas magnéticas de un material compuesto que tienen una rugosidad superficial (Ra) en el intervalo de 0,1 a 25 μm , un diámetro entre 2 y 8 mm, y una densidad menor que 7 g/cm^3 .
- 45 15.- El aparato según la reivindicación 14, que comprende además, conectado al sistema de control, una unidad de identificación de muestras, una unidad de muestreo automática y/o un dispositivo de manipulación de tapas automático.
- 50

Figura 1A

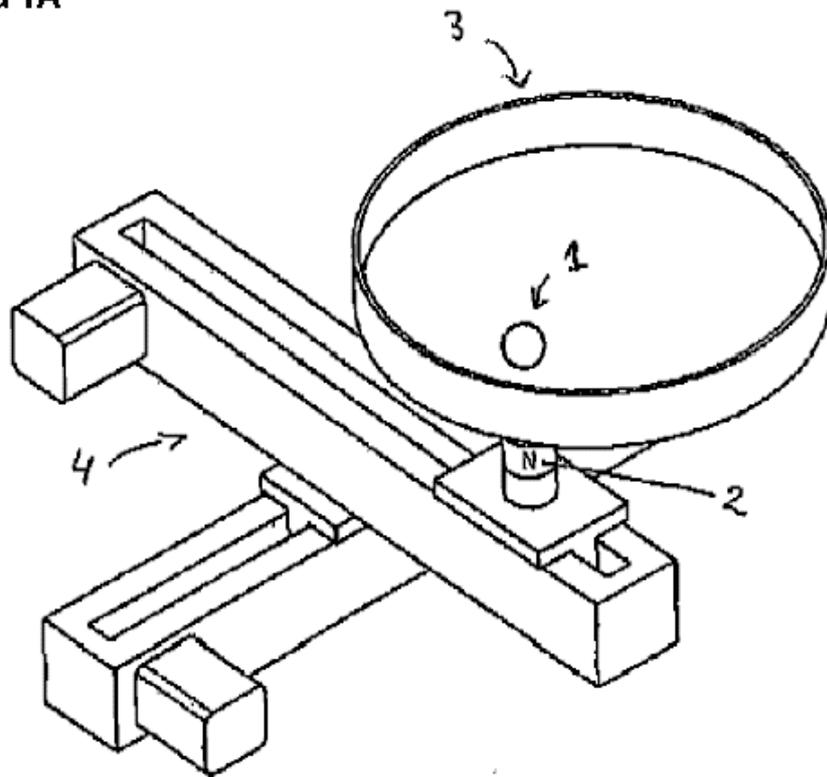


Figura 1B

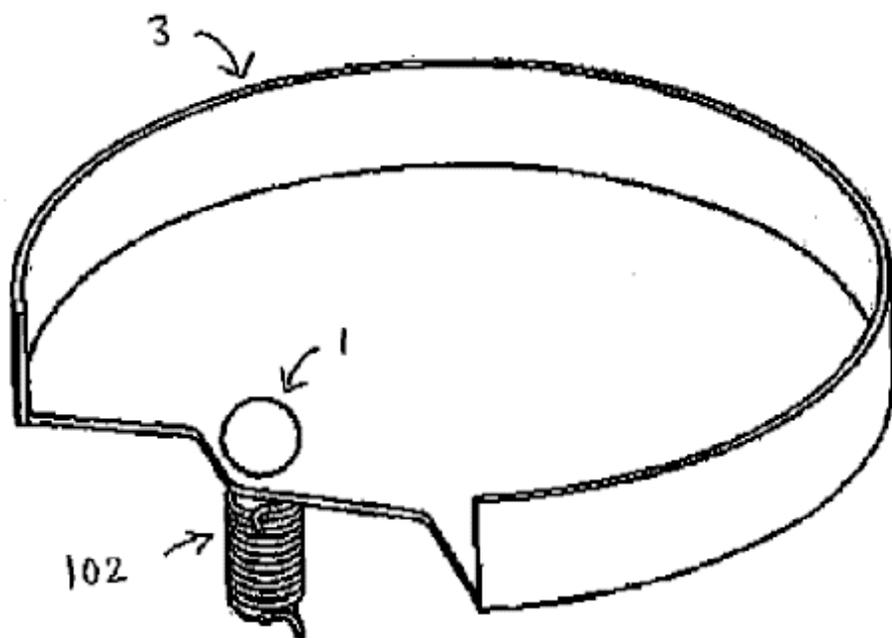
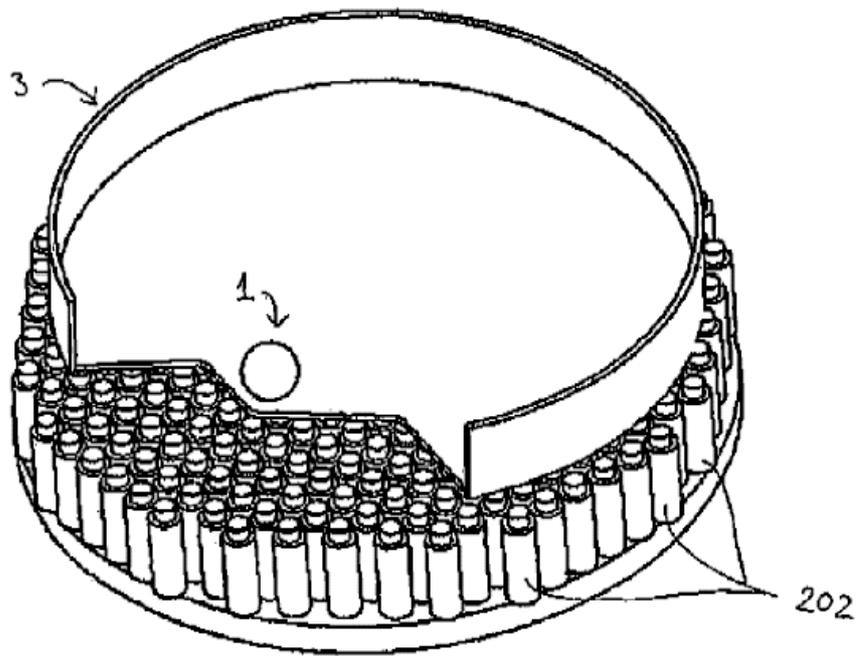


Figura 1C



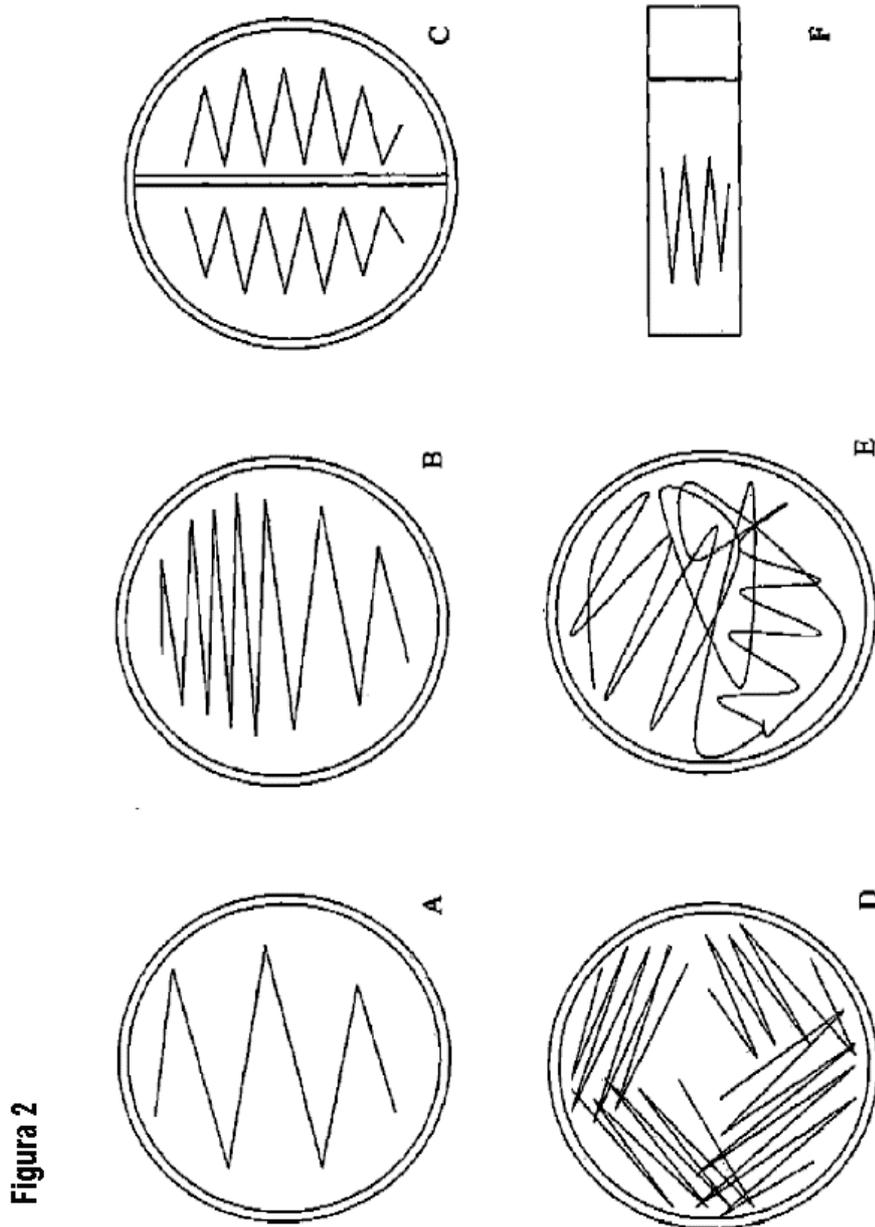


Figura 2

Figura 3

