

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 798**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/04 (2006.01)
C12M 1/28 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04742828 .9**
96 Fecha de presentación: **02.04.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1608769**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.12.2005**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo de detección y/o de identificación de bacterias presentes en una muestra**

30 Prioridad:
07.04.2003 FR 0304262

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.05.2012

73 Titular/es:
**BIOMERIEUX
CHEMIN DE L'ORME
69280 MARCY-L'ETOILE, FR**

72 Inventor/es:
**MERCADER BADIA, Josep Vicent;
COLIN, Bruno y
ATRACHE, Vincent**

74 Agente/Representante:
García-Cabrerizo y del Santo, Pedro

ES 2 380 798 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

Procedimiento y dispositivo de detección y/o de identificación de bacterias presentes en una muestra

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de detección y/o de identificación de bacterias presentes en una muestra, líquida o sólida. La invención también se refiere a un dispositivo de detección y/o de identificación de bacterias presentes en dicha muestra.

10 La identificación de bacterias en alimentos, es indispensable para la sanidad pública. Por ejemplo, las bacterias del genero *Salmonella*, que pueden encontrarse en una gran cantidad de alimentos, son la causa de numerosas patologías en el ser humano (fiebre tifoidea, intoxicación alimentaria). De hecho, el aislamiento y la identificación de la bacteria *Listeria* es un requisito principal de la supervisión de la higiene agroalimentaria y la bacteriología médica. Así, entre las bacterias del genero *Listeria*, la especie *Listeria monocytogenes*, conocida por ser un patógeno para el hombre puede producir listeriosis, a veces mortal (del 25 al 30 % de los casos) en personas inmunosuprimidas y en niños pequeños. Es por tanto muy importante disponer de un ensayo fiable y rápido que permita detectar la contaminación por estas bacterias, ensayo que debe ser, al mismo tiempo, sensible y específico. Por último, la identificación de las bacterias del género *Staphylococcus* es también primordial. La mayoría de estas especies son patógenos oportunistas en el hombre y presentan un riesgo elevado en caso de lesión cutánea por un traumatismo o por un implante directo de un producto médico. Por otra parte, la especie *Staphylococcus aureus* es una bacteria que se encuentra a menudo en pacientes que deben recibir cuidados hospitalarios en los que intervienen aparatos tales como jeringas o catéteres. Existe por tanto un gran interés para detectar la presencia de esta bacteria patógena, cada vez más implicada en enfermedades nosocomiales.

25 Actualmente existen numerosos ensayos de detección de bacterias. De manera general, estos ensayos de detección requieren un pre-enriquecimiento que comprende:

- o una etapa de resurrección, que permite a las bacterias recuperar el estrés inducido por el cultivo y
- o una etapa de crecimiento exponencial bacteriano, que es indispensable cuando pocas especies están inicialmente presentes en la muestra y
- 30 o una etapa de detección de bacterias, que debe realizarse preferencialmente en el valor máximo de crecimiento bacteriano, y antes de la aparición de la fase de muerte bacteriana, que se observa durante cualquier cultivo bacteriano.

35 A título indicativo del método de detección de bacterias, puede citarse el procedimiento de detección de *Salmonella* descrito en la Patente US-A- 4.563.418, basado en inmunoprecipitación. La detección de estas bacterias se efectúa, después de la etapa de pre-enriquecimiento y de crecimiento bacteriano, después de la migración en un medio de cultivo pre-enriquecido en *Salmonella* y una reacción con anticuerpos dirigidos contra la *Salmonella*. También puede citarse un método comparable, también basado en inmunoprecipitación, que se presenta en la Patente US-A- 5.432.229. Sin embargo, en estos métodos, el usuario debe realizar manualmente una etapa de transferencia del medio de cultivo, pre-enriquecido en bacterias, hacia el gel de migración, lo que puede inducir a problemas, particularmente de contaminación, pero también riesgos para la sanidad del manipulador.

45 También pueden citarse métodos más recientes, basados principalmente en la migración de bacterias a través de un medio selectivo de la especie de bacterias que se desea detectar específicamente. De esta manera, la solicitud de Patente EP-A- 0259116 presenta un procedimiento para detectar la presencia de *Salmonella* en una muestra, comprendiendo el procedimiento la migración de las *Salmonellas* presentes en un medio de cultivo pre-enriquecido hacia un medio selectivo, específico de *salmonellas*. Las *salmonellas* migran entonces hacia el sistema de detección, permitiendo su identificación, mientras que el medio selectivo detiene al resto de bacterias que pueden estar presentes en la muestra. Sin embargo, en este procedimiento, el medio de cultivo permanece en contacto con el medio selectivo y el sistema de detección, lo que constituye el problema principal de este tipo de procedimiento. De esta manera, si la muestra está muy contaminada, las bacterias, distintas de las *salmonellas* presentes en el medio de cultivo, pueden entonces saturar al medio selectivo, no realizando más su función de barrera selectiva. La presencia de bacterias, distintas de las *salmonellas*, en el sistema de detección puede entonces constituir un positivo falso: se detecta un sistema de detección positivo mientras que la muestra no está contaminada por *salmonellas*.
55 Además, el procedimiento tal y como se describe en esta solicitud, solo puede aplicarse para las bacterias móviles.

La presente invención se propone resolver el conjunto de inconvenientes del estado de la técnica presentando particularmente un procedimiento para la detección y/o identificación de bacterias, que apenas requiere manipulación, por parte del manipulador, del medio de cultivo que comprende las bacterias, permitiendo un diagnóstico rápido, directamente desde el medio de cultivo, que puede realizarse fácilmente durante la fase de crecimiento exponencial bacteriano.

Antes de continuar, las siguientes definiciones permitirán comprender mejor la siguiente exposición de la invención.

65 Por muestra, se entiende una muestra alimentaria, obtenida de cualquier tipo de alimento, pero también una muestra clínica, obtenida de una extracción de fluido biológico. Esta muestra puede ser líquida o sólida y puede citarse, de

manera no limitativa, una muestra alimentaria de agua, de bebidas tales como leche, zumo de frutas; una muestra clínica de sangre, plasma, orina, heces, una muestra alimentaria de yogur, carne, huevos, legumbres, mayonesa, queso; pescado..., una muestra alimentaria obtenida de una alimentación destinada a animales, tal como particularmente una muestra obtenida de harinas animales.

5 Por primer recipiente, se entiende cualquier tipo de contenedor que pueda recibir un medio de cultivo, tal como particularmente un matraz, un frasco, una bolsa Stomacher®... Puede ser ventajoso que este primer recipiente tolere una variación de presión, en particular una variación de temperatura. De esta manera, si el primer recipiente está fabricado de un material sólido (tal como un frasco de vidrio), es ventajoso que este primer recipiente esté
10 abierto, o esté provisto de una válvula que permita una variación de presión. Cuando el primer recipiente está fabricado de un material flexible, tal como particularmente, una bolsa Stomacher®, puede estar abierto o cerrado, ya que, debido a la flexibilidad del material, se permite la variación de presión.

15 Por medio de cultivo, se entiende un medio que comprende todos los elementos necesarios para la viabilidad y el crecimiento de las células. El experto en la materia conoce bien dicho medio de cultivo y podrá seleccionar fácilmente el medio de cultivo más adecuado en cuanto a las bacterias que desea detectar.

20 Por medio selectivo, se entiende un medio que permite seleccionar las bacterias que deben reaccionar con el sistema de detección de bacterias. Cuando se desea seleccionar, por ejemplo, una bacteria determinada, el medio selectivo comprende un antibiótico dirigido contra las otras especies bacterianas, que pueden estar presentes en la muestra y que no se quieren detectar. Otro ejemplo consistiría en que ese medio de cultivo selectivo comprenda un compuesto tóxico contra determinadas bacterias particulares. Puede utilizarse también un medio nutricionalmente restrictivo para determinadas bacterias. El experto en la materia conoce bien dichos medios selectivos y seleccionará un medio selectivo apropiado en función de la muestra y de las bacterias que desee analizar. Este
25 medio selectivo puede estar mezclado con el medio de cultivo o aislado en un segundo recipiente que comprende el sistema de detección.

30 Por segundo recipiente, se entiende cualquier tipo de contenedor que pueda recibir al menos un sistema de detección tal como se define más adelante. Este segundo recipiente es preferentemente un material suficientemente rígido, de tal forma que su volumen permanece constante cuando en su interior se aplica una disminución de temperatura. Este segundo recipiente puede estar incluido en el primer recipiente para que el usuario solo disponga de un dispositivo que comprenda el conjunto de los medios necesarios para la detección y/o identificación de las bacterias.

35 Por sistema de detección, se entiende un sistema que permita demostrar la presencia de una bacteria determinada. Dicho sistema es bien conocido por el experto en la materia y puede citarse, a modo indicativo, un sistema de detección que comprende un sustrato cromogénico, fluorogénico, basado en la detección de una inmunoprecipitación, una inmunocromatografía, un indicador de pH, un producto precipitante... Esta detección puede ser directa, es decir por detección de la bacteria, o indirecta, en particular por detección de un metabolito liberado por dicha bacteria.
40

45 Por medio de transferencia, se entiende cualquier medio que permita la transferencia de un medio líquido, comprendido en un primer recipiente, hacia un segundo recipiente. Este medio de transferencia y el segundo recipiente pueden ser independientes o constituir una sola pieza.

De esta manera, la invención presenta un procedimiento de detección y/o de identificación de bacterias presentes en una muestra, líquida o sólida, caracterizado porque:

- 50 a. en un primer recipiente se coloca la muestra que puede contener dichas bacterias en un medio de cultivo líquido,
- b. se proporciona un segundo recipiente que comprende al menos un sistema de detección de dichas bacterias,
- 55 c. se proporciona un medio de transferencia entre el primer recipiente y el segundo recipiente, comprendiendo dicho medio de transferencia al menos una primera abertura a nivel del primer recipiente y al menos una segunda abertura a nivel del segundo recipiente, de tal manera que el segundo recipiente circunscribe un primer volumen de aire entre la abertura del medio de transferencia y el sistema de detección de dichas bacterias,
- d. se aplica una temperatura T1 en el interior del segundo recipiente y después,
- 60 e. se aplica una temperatura T2 en el interior del segundo recipiente,
- f. la temperatura T1 es superior a la temperatura T2 de tal manera que se transfiere un volumen definido del medio de cultivo del primer recipiente al segundo recipiente,
- g. se determina la presencia o ausencia de bacterias y/o se identifican las bacterias a nivel del sistema de detección.

65 Particularmente, las bacterias pueden ser, de manera no limitativa, bacterias del genero *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Niesseria*, *Legionella*, *Mycobacteria*, *Campylobacter*, *Listeria*...

Se sabe bien que la transferencia entre el primer recipiente y el segundo recipiente no se efectúa espontáneamente. Es preciso, por ejemplo, que la primera abertura a nivel del primer recipiente esté situada por debajo de la segunda abertura a nivel del segundo recipiente, para evitar cualquier transferencia espontánea por gravedad.

5 Esa transferencia espontánea también puede evitarse cuando el medio de transferencia es un conducto no capilar, que impide cualquier transferencia espontánea entre el primer recipiente y el segundo recipiente por simple capilaridad. El diámetro interno de este conducto puede estar comprendido particularmente entre 0,1 y 5 mm, preferentemente entre 0,5 y 2 mm.

10 Preferentemente, el medio de transferencia circunscribe un segundo volumen de aire entre la primera abertura y la segunda abertura. Si el segundo recipiente comprende adicionalmente, entre la segunda abertura del medio de transferencia y el sistema de detección, un medio selectivo, el volumen de aire se circunscribe preferentemente entre la segunda abertura del medio de transferencia y del medio selectivo.

15 De acuerdo con un modo de realización preferido de la invención, el segundo recipiente y el medio de transferencia son materiales suficientemente rígidos para mantenerse a un volumen constante durante una variación de temperatura. De esta manera, cuando se pasa de una temperatura T1 a T2, el primer volumen de aire, y/o el segundo volumen de aire actúan como un pulmón de aspiración experimentando una disminución de presión.

20 De acuerdo con un modo de realización preferido de la invención, T1 está comprendida entre 20 y 45 °C, y más preferentemente entre 30 y 42 °C; T2 está comprendida entre 4 y 30 °C, preferentemente entre 13 y 18 °C.

25 Durante la etapa f) el volumen definido que se transfiere depende particularmente de la diferencia de temperatura que se aplica, así como del segundo volumen de aire. El volumen definido que se transfiere puede estar particularmente comprendido entre 100 y 1000 µl, y preferentemente entre 400 y 600 µl. De esta manera, a modo indicativo, cuando la diferencia de temperatura (T2 – T1) es de 22 °C, y T1 = 15 °C y T2 = 37 °C, se transfiere un volumen de 350 µl desde el primer recipiente hacia el segundo recipiente. También es posible realizar las etapas d) a f) más veces, para transferir, en varias veces, el volumen definido que permita la detección de las bacterias.

30 Durante la etapa g), la determinación de la presencia o ausencia de bacterias y/o la identificación de bacterias depende del sistema de detección que se utilice.

35 De acuerdo con una variante de realización de la invención, entre la etapa a) y la etapa b) se efectúa una etapa de pre-enriquecimiento que consiste en aumentar la cantidad de bacterias que se desean detectar. Una etapa de pre-enriquecimiento de este tipo es bien conocida por el experto en la materia, quien la adaptará fácilmente de acuerdo con las bacterias que desee detectar.

De acuerdo con un modo de realización particular de la invención, el segundo recipiente está comprendido en el primer recipiente.

40 La invención también se refiere a un procedimiento de detección y/o de identificación de bacterias presentes en una muestra, líquida o sólida, caracterizada porque:

- a. en un primer recipiente, se coloca la muestra que puede contener dichas bacterias en un medio de cultivo líquido, tal y como se ha definido anteriormente,
- 45 b. se proporciona un segundo recipiente que comprende al menos un sistema de detección de dichas bacterias, tal y como se ha definido anteriormente,
- c. se proporciona un medio de transferencia entre el primer recipiente y el segundo recipiente, tal y como se ha definido anteriormente,
- 50 d. se aplica una temperatura T1 en el interior del segundo recipiente y después,
- e. se aplica una temperatura T2 en el interior del segundo recipiente,
- f. la temperatura T1 es inferior a la temperatura T2 de tal manera que se transfiere un volumen definido del medio de cultivo del primer recipiente al segundo recipiente,
- g. se determina la presencia o ausencia de bacterias y/o se identifican las bacterias a nivel del sistema de detección.

55 De acuerdo con un modo de realización preferido de la invención, el segundo recipiente y el medio de transferencia son materiales suficientemente rígidos para permanecer a un volumen constante durante una variación de temperatura.

60 La invención también se refiere a un dispositivo de detección y/o de identificación de bacterias en una muestra que comprende:

- un primer recipiente
- un segundo recipiente que comprende al menos un sistema de detección, y
- 65 • al menos un medio de transferencia entre un primer recipiente y el segundo recipiente, comprendiendo dicho

medio de transferencia al menos una primera abertura a nivel del primer recipiente y al menos una segunda abertura a nivel del segundo recipiente; circunscribiendo dicho segundo recipiente un primer volumen de aire entre dicho sistema de detección y la segunda abertura del medio de transferencia.

5 De acuerdo con un modo de realización preferido de la invención, el medio de transferencia circunscribe un segundo volumen de aire entre la primera abertura y la segunda abertura, actuando dichos primer y segundo volúmenes de
 10 aire como un pulmón de aspiración cuando se aplica una disminución de temperatura particularmente dentro del segundo recipiente. De acuerdo con un modo de realización preferido de la invención, el primer recipiente y el medio de transferencia son materiales suficientemente rígidos para permanecer a un volumen constante durante una
 15 variación de temperatura.

De acuerdo con un modo de realización particular de la invención, la primera abertura a nivel del primer recipiente está en posición inferior con respecto a la segunda abertura a nivel del segundo recipiente, para evitar particularmente cualquier transferencia por gravedad entre el primer recipiente y el segundo recipiente.

15 De acuerdo con otro modo de realización de la invención, la primera abertura a nivel del primer recipiente y la segunda abertura a nivel del segundo recipiente constituyen la misma abertura. En este modo de realización, el medio de transferencia se limita entonces a esta misma abertura.

20 De acuerdo con un modo particular de realización de la invención, el medio de transferencia es un conducto no capilar, para evitar particularmente cualquier transferencia por simple capilaridad entre el primer recipiente y el segundo recipiente.

De acuerdo con un modo de realización particular de la invención, el dispositivo tal y como se ha definido anteriormente comprende, adicionalmente, un primer recipiente que comprende un medio de cultivo. De acuerdo con un modo particular, el segundo recipiente está incluido en el primer recipiente. Preferentemente, el primer recipiente es una bolsa Stomacher®. Para evitar que fragmentos de la muestra alimentaria taponen la primera abertura e impidan la transferencia del medio de cultivo del primer recipiente al segundo recipiente, la bolsa Stomacher® puede comprender un filtro, entre el medio de cultivo, donde se coloca la muestra alimentaria, y el medio de transferencia.

30 Por último la invención se refiere a un kit de detección y/o de identificación de bacterias que comprende un dispositivo tal y como se ha definido anteriormente.

35 Las figuras adjuntas se proporcionan a modo de ejemplo explicativo y no tienen ningún carácter limitativo. Permitirán comprender mejor la invención.

De este modo, la figura 1 presenta un primer modo de realización de la invención, tal y como se presenta en el ejemplo 1. El primer recipiente (1) es una bolsa Stomacher® que comprende un medio de cultivo (2) en el que se coloca la muestra, que puede contener las bacterias que se desean detectar y/o identificar. El segundo recipiente (4) comprende un sistema de detección (6) que un medio líquido selectivo que comprende un indicador que forma un precipitado cuando está en presencia de la bacteria que se desea detectar y/o identificar. Este segundo recipiente está unido a un medio de transferencia (3), que se introduce en el medio de cultivo (2) que comprende la muestra. Este medio de transferencia comprende una primera abertura (7) a nivel del primer recipiente (1) y una segunda abertura (8) a nivel del segundo recipiente (4). Un primer volumen de aire (4) está circunscrito entre la segunda
 45 abertura (8) y el sistema de detección (6). Un segundo volumen de aire (16) también está circunscrito en el interior del medio de transferencia (3) entre la segunda abertura (8) y la primera abertura (7).

La figura 2 presenta otro modo de realización de la invención, tal y como se presenta en el ejemplo 2. El primer recipiente (1) es un contenedor abierto que comprende un medio de cultivo (2) en el que se coloca la muestra que se desea analizar. El medio de transferencia (3) es comparable al de la figura 1. El segundo recipiente (4) comprende un primer volumen de aire (9), tal y como se define en la figura 1, y una columna de celulosa (10) en la que se embebe un medio selectivo (5). En el vértice de la columna de celulosa (10) se coloca el sistema de detección (6) que es un sustrato cromogénico inmovilizado pasivamente sobre un disco de papel estéril.

55 La figura 3 presenta otro modo de realización de la invención, tal y como se presenta en el ejemplo 3, que encuentra una aplicación preferencial durante la detección de bacterias móviles. El primer recipiente (1) es un contenedor abierto que comprende un medio de cultivo (2) en el que se coloca la muestra que se desea analizar. El medio de transferencia (3) es comparable al de la figura 1. El segundo recipiente (4) comprende un primer volumen de aire (9) tal y como se define en la figura 1, un medio selectivo (5) semisólido y un sistema de detección (6) que es un sustrato cromogénico movilizado pasivamente sobre un disco papel estéril. Antes alcanzar el sistema de detección, un cilindro (11) obliga, después de la etapa de transferencia, a las bacterias móviles a migrar a través del medio selectivo.

65 La figura 4 presenta otro modo de realización de la invención, tal y como se presenta en el ejemplo 4. El primer recipiente (1) es un contenedor abierto que comprende un medio de cultivo (2) en el que coloca la muestra que se desea analizar. El medio de transferencia (3) es comparable al de la figura 1. El segundo recipiente (4) comprende

un primer volumen de aire (9) tal y como se define en la figura 1, y un sistema de detección (6) que es una banda inmunocromatográfica, bien conocida por el experto en la materia, que comprende una primera parte (12) que contiene un anticuerpo contra las bacterias marcado, conjugado, una segunda parte (13) que es una membrana cromatográfica, en la que puede detectarse una primera señal (14) característica de la presencia de anticuerpos contra las bacterias que se desean detectar y una segunda señal (15), característica de la presencia de un control positivo. El papel absorbente (17) permite la migración de las bacterias incluso si estas no son móviles.

La figura 5 presenta otro modo de realización de la invención. El primer recipiente (1) es un tubo de análisis biológico que comprende un medio de cultivo (2) en el que se coloca la muestra que se desea analizar. El segundo recipiente (4) comprende un primer volumen de aire (9) tal y como se define en la figura 1, un sistema de detección (6) y un medio selectivo (5). En este modo de realización, la primera abertura a nivel del primer recipiente (1) y la segunda abertura a nivel del segundo recipiente (4) constituye la misma abertura: el medio de transferencia (3) se limita entonces a esta misma abertura. Esta abertura no debe permitir la transferencia espontánea del medio de cultivo entre el primer y el segundo recipiente.

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no tienen carácter limitativo. Permitirán comprender mejor la invención.

Ejemplo 1- Detección de *Staphylococcus aureus* en el medio selectivo líquido que comprende un indicador.

En este ejemplo, para la detección de bacterias *Staphylococcus aureus*, se utiliza un dispositivo de detección y/o de identificación de bacterias presentes en una muestra, tal y como se presenta en la figura 1.

Para realizar esto, en el primer recipiente (1), que es una bolsa Stomacher®, se introducen 225 ml de medio de cultivo 2 (agua peptonada, bioMérieux ref. 420439), y 25 ml de leche y la mezcla se inoculan con 3×10^4 células de *Staphylococcus aureus*, según un protocolo clásico conocido por el experto en la materia. Utilizando el medio de cultivo y la leche, se obtiene un ensayo de control, tal y como se ha indicado anteriormente, pero no inoculado por *Staphylococcus aureus*. Como segundo recipiente (4) se utiliza la parte superior de una jeringa de 25 ml que comprende un primer volumen de aire (9) de 13 ml. Se utiliza un medio selectivo (5) (Qi-Staph® bioMérieux), y 3 ml de este medio selectivo se introducen en el interior del segundo recipiente (4). En este ejemplo, el sistema de detección (6) es un compuesto indicador (telurita de potasio) que permite la aparición de un precipitado negro en presencia de bacterias *Staphylococcus aureus*. El medio de transferencia (3) utilizado en este ejemplo es un conducto, de un diámetro interno de 1 mm y una longitud de 12 cm, de los cuales, 4 cm se introducen en el interior del segundo recipiente (4), tal y como se presenta en la figura 1. Este medio de transferencia (3) comprende una primera abertura (7) que está sumergida en el medio de cultivo (2) y una segunda abertura (8) que entra en el interior del segundo recipiente (4). En este ejemplo, el segundo recipiente solo comprende una abertura, que corresponde a dicha segunda abertura (8) del medio de transferencia (3), y por lo tanto constituye un recinto cerrado a excepción de la abertura (8). Como se presenta en la figura 1, el segundo recipiente (4) y el medio de transferencia (3) se colocan en la bolsa Stomacher®. Esto permite aislar el medio de cultivo contaminado.

La transferencia del medio de cultivo (2), que comprende las bacterias, entre el primer recipiente (1) y el segundo recipiente (4) se obtiene colocando todo el dispositivo en una incubadora a 37 °C durante una hora. Esta incubación permite el pre-enriquecimiento del medio de cultivo. En función de la contaminación de la muestra, puede realizarse una incubación más o menos larga. El interior del segundo recipiente (4) tiene por tanto una temperatura $T = 37$ °C. A continuación, todo el dispositivo se pone a una temperatura de 15 °C durante una hora, para que el interior del segundo recipiente (4) esté a una temperatura $T_2 = 15$ °C. Esta disminución de temperatura induce una disminución de presión dentro del segundo recipiente (4), lo que permite la transferencia de un volumen definido del medio de cultivo (600 μ l) del primer recipiente (1) al segundo recipiente (4). A continuación, todo el dispositivo se mantiene durante 18 horas a 37 °C, para permitir a las bacterias metabolizar el sustrato, induciendo la aparición de un precipitado a nivel de sistema de detección (6). Se observa que, en el segundo recipiente (4), el nivel del medio selectivo (5) no alcanza la segunda abertura (8), entre el medio de transferencia (3) y el segundo recipiente (5): durante la aspiración, el medio de cultivo (2) comprende las bacterias *Staphylococcus aureus* aspiradas y atrapadas en el interior del segundo recipiente (4), y no puede regresar al segundo recipiente (1), cuando se aumenta de nuevo la temperatura en el interior del segundo recipiente (4). Al final de esta incubación, a nivel del sistema de detección, aparece un precipitado que confirma la presencia de *Staphylococcus aureus* cuando el medio de cultivo y la leche se han inoculado con estas bacterias. En el ensayo de control no se observa ningún precipitado.

Ejemplo 2- Detección de bacterias *Salmonella thyphimurium* en una columna de celulosa.

El primer recipiente (1) es idéntico al descrito en el ejemplo 1, pero podría ser cualquier tipo de primer recipiente. En este ejemplo, 225 ml de medio de cultivo (2) BPW (agua peptonada) en el que se disuelven 25 g de leche en polvo (obtenida en el comercio) se inoculan con 3×10^2 células de *Salmonella thyphimurium*. En la figura 2 se muestra el segundo recipiente (4) y el medio de transferencia (3) utilizados en este ejemplo. Se realiza un ensayo de control tal y como se describe en el ejemplo 1.

Para el medio selectivo (5), 0,5 ml de medio de cultivo BPW, que contiene 20 µg de novobiocina, se embeben en una columna de celulosa (10) de 2 cm de longitud y 0,7 cm de diámetro. Esta columna de celulosa (10) se coloca en el interior del segundo recipiente (4), sin estar en contacto con la segunda abertura (8) del medio de transferencia (3). En este ejemplo, el segundo recipiente (4) solo comprende una abertura, que corresponde a dicha segunda
 5 abertura (8) del medio de transferencia (3), y por lo tanto constituye un recinto cerrado a excepción de la abertura (8). En la parte superior de esta columna de celulosa (10) se deposita el sistema de detección (6) que es un sustrato cromogénico, 5-bromo-6-cloro-3-indoxil octanoato (magenta C8) combinado con nitroazul de tetrazolio (Sigma, N6639), inmovilizado pasivamente sobre un disco de papel estéril de un diámetro de 5 mm (Wathman 3 Chr, ref. 3030917). La transferencia del medio de cultivo (2), que comprende las bacterias entre el primer recipiente (1) y el
 10 segundo recipiente, se realiza como se describe en el ejemplo 1, calentando todo el dispositivo 37 °C durante 1 hora, y después a 15 °C durante 1 hora. Al final de la transferencia, las bacterias que están en contacto con la columna de celulosa se difunden hasta la parte superior de la columna, hacia el sistema de detección donde metabolizan el sustrato, para formar un precipitado negro. Los resultados positivos se observan a las 15 horas. Los resultados fueron negativos en los ensayos de control.

15 **Ejemplo 3- Detección de bacterias móviles de *Salmonella thyphimurium* en un medio selectivo semisólido.**

El primer recipiente (1) es como el descrito en el ejemplo 1, pero puede ser cualquier tipo de primer recipiente. En este ejemplo, 225 ml de medio de cultivo (2) BPW (agua peptonada), en el que se disuelven 25 g de leche en polvo (obtenida en el comercio) se inoculan con 3×10^4 células de *Salmonella thyphimurium*. En la figura 3 se muestra el
 20 segundo recipiente (4) y el medio de transferencia (3) utilizados en este ejemplo. Se realiza un ensayo de control tal y como se describe en el ejemplo 1.

En el interior del segundo recipiente (4) se depositan 3 ml de medio semisólido (API M-medium®, bioMérieux, ref 50120) y se utiliza como medio selectivo (5) que comprende 40 µg/ml de novobiocina, sin que el nivel del medio selectivo (5) alcance la segunda abertura (8), entre el medio de transferencia (3) y el segundo recipiente (5). La segunda abertura (8) y el sistema de detección (6) se separan mediante un cilindro (11), tal como se presenta en la figura 3, que obliga a las bacterias a migrar a través del medio selectivo (5), lo que hace que solo las bacterias resistentes y móviles lleguen al sistema de detección (6). El sistema de detección (6) es un sustrato cromogénico tal
 25 y como se describe en el ejemplo 2.

La transferencia de salmonellas del primer recipiente al segundo recipiente se realiza, de una manera comparable a la del ejemplo 1, calentando todo el dispositivo a 37 °C durante 1 hora, y después a 15 °C durante 1 hora.

35 Al final de la etapa de transferencia, y manteniendo todo el dispositivo durante 16 horas a 37 °C, un volumen definido de medio de cultivo (150 µl) que comprende las bacterias móviles está en contacto con el medio selectivo (5), y las bacterias migran a través del mismo, hasta el sistema de detección (6). Al final de esta incubación, la coloración del disco negro confirma la presencia de salmonellas, inicialmente presentes en el medio de cultivo. En el ensayo de control no se observa ninguna coloración.

40 **Ejemplo 4- Detección de bacterias *Listeria monocytogenes* por inmunocromatografía.**

El primer recipiente (1) es como el descrito en el ejemplo 1, pero puede ser cualquier tipo de primer recipiente. En este ejemplo, 250 ml de medio de cultivo (2) (caldo de tripcasa-soja, bioMérieux, ref 44011; 6 % de levadura), se inoculan con 3×10^7 ufc/ml de *Listeria monocytogenes* 4b. . En la figura 4 se muestra el segundo recipiente (4) y el
 45 medio de transferencia (3) utilizados en este ejemplo. Se realiza un ensayo de control de una manera comparable pero sin inoculación de bacterias.

En el interior del segundo recipiente (4) se coloca el sistema de detección (4) que es una banda inmunocromatográfica bien conocida por el experto en la materia. Se realiza un ensayo de control tal y como se describe en el ejemplo 1.

La transferencia de *Listeria monocytogenes* del primer recipiente (1) al segundo recipiente (4) se realiza incubando todo el dispositivo a una temperatura T1 = 30 °C durante 1 hora, y después a una temperatura T2= 15 °C durante 45
 55 minutos. Al final de la transferencia, puede detectarse una primera señal (14) característica de la presencia de una proteína presente en el flagelo de *L. monocytogenes* por reacción con anticuerpos específicos y una segunda señal (15), característica de la presencia de un patrón positivo y obtenida utilizando anticuerpos anti IgG de ratón. Durante el control de ensayo, solo podía observarse la segunda señal.

60 **Referencias**

1. primer recipiente
2. medio de cultivo que comprende la muestra
3. medio de transferencia

- 4. segundo recipiente
- 5. medio selectivo
- 5 6. sistema de detección
- 7. primera abertura
- 8. segunda abertura
- 10 9. primer volumen de aire
- 10. columna de celulosa
- 15 11. cilindro
- 12. primera parte
- 13. segunda parte
- 20 14. primera señal
- 15. segunda señal
- 25 16. segundo volumen de aire
- 17. papel absorbente
- 30

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección y/o de identificación de bacterias presentes en una muestra, líquida o sólida, **caracterizado por que:**

- 5
- a. en un primer recipiente (1), la muestra, que puede contener dichas bacterias, se pone en un medio de cultivo líquido (2)
 - b. se proporciona un segundo recipiente (4) que comprende al menos un sistema de detección (6) de dichas bacterias,
 - 10 c. se proporciona un medio de transferencia (3) entre el primer recipiente (1) y el segundo recipiente (4), comprendiendo dicho medio de transferencia (3) al menos una primera abertura (7) a nivel del primer recipiente (1) y al menos una segunda abertura (8) a nivel del segundo recipiente (4), de tal manera que el segundo recipiente (4) circunscribe un primer volumen de aire (9) entre la abertura (8) del medio de transferencia (3) y el sistema de detección (6) de dichas bacterias,
 - 15 d. se aplica una temperatura T1 en el interior del segundo recipiente (4) y después,
 - e. se aplica una temperatura T2 en el interior del segundo recipiente (4)
 - f. la temperatura T1 es superior a la temperatura T2 de tal manera que se transfiere un volumen definido del medio de cultivo (2) del primer recipiente (1) al segundo recipiente (4),
 - 20 g. se determina la presencia o ausencia de bacterias y/o se identifican las bacterias a nivel del sistema de detección (6).

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizado por que** el medio de transferencia (3) circunscribe un segundo volumen de aire (16) entre la primera abertura (7) y la segunda abertura (8).

25 3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2 **caracterizado por que** T1 está comprendida entre 25 y 45 °C, preferentemente entre 30 y 42 °C.

30 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado por que** T2 está comprendida entre 4 y 24 °C, preferentemente entre 13 y 18 °C.

5. Procedimiento de detección y/o de identificación de bacterias presentes en una muestra, líquida o sólida, **caracterizado por que:**

- 35
- a. en un primer recipiente (1), se coloca la muestra que puede contener dichas bacterias en un medio de cultivo (2) líquido,
 - b. se proporciona un segundo recipiente (4) que comprende al menos un sistema de detección (6) de dichas bacterias
 - 40 c. se proporciona un medio de transferencia (3) entre el primer recipiente (1) y el segundo recipiente (4), comprendiendo dicho medio de transferencia (3) al menos una primera abertura (7) a nivel del primer recipiente (1) y al menos una segunda abertura (8) a nivel del segundo recipiente (4), de tal manera que el segundo recipiente (4) circunscribe un primer volumen de aire (9) entre la segunda abertura (8) y el sistema de detección (6) de dichas bacterias y/o el medio de transferencia (3) circunscribe un segundo volumen de aire (16) entre la primera abertura (7) y la segunda abertura (8),
 - 45 d. se aplica una temperatura T1 en el interior del primer recipiente (1) y después,
 - e. se aplica una temperatura T2 en el interior del primer recipiente (1)
 - f. la temperatura T1 es inferior a la temperatura T2 de tal manera que se transfiere un volumen definido del medio de cultivo (2) del primer recipiente (1) al segundo recipiente (4),
 - 50 g. se determina la presencia o ausencia de bacterias y/o se identifican las bacterias a nivel del sistema de detección (6).

6. Dispositivo de detección y/o de identificación de bacterias en una muestra que comprende

- 55
- un primer recipiente (1),
 - un segundo recipiente (4), que comprende al menos un sistema de detección (6),
 - al menos un medio de transferencia (3) entre el primer recipiente (1) y el segundo recipiente (4), comprendiendo dicho medio de transferencia al menos una primera abertura (7) a nivel del primer recipiente (1) y al menos una segunda abertura (8) a nivel del segundo recipiente (4)

60 circunscribiendo dicho segundo recipiente un primer volumen de aire (9) entre dicho sistema de detección (6) y la segunda abertura (8) del medio de transferencia (3).

7. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 6 **caracterizado por que** adicionalmente comprende un segundo volumen de aire (16) circunscrito, a nivel del medio de transferencia (3), entre la primera abertura (7) y la segunda abertura (8).

65

8. Dispositivo, de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, **caracterizado por que** el medio de transferencia (3) es un conducto no capilar.

5 9. Disposición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 **caracterizado por que** el segundo recipiente (4) está incluido en el primer recipiente (1).

10. Kit de detección y/o de identificación de bacterias que comprende un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9.

10

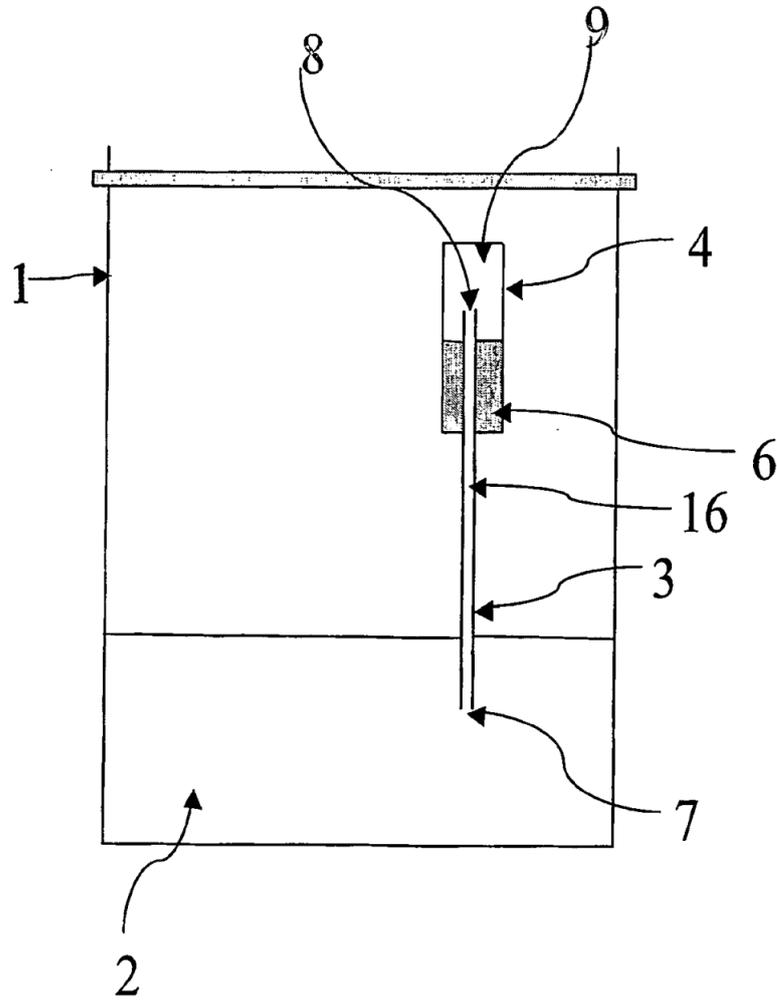


Figura 1

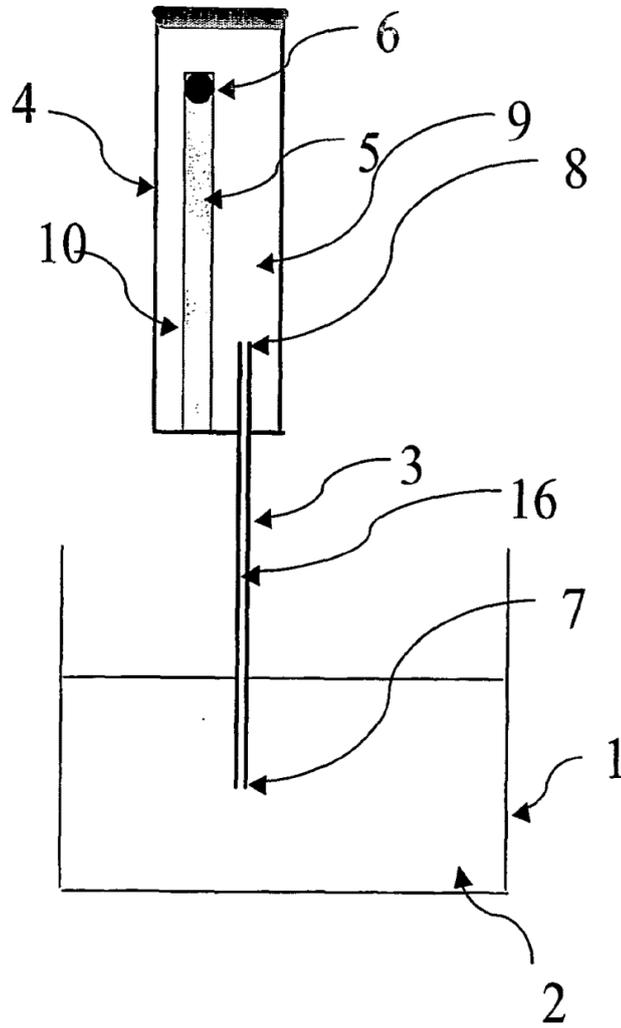


Figura 2

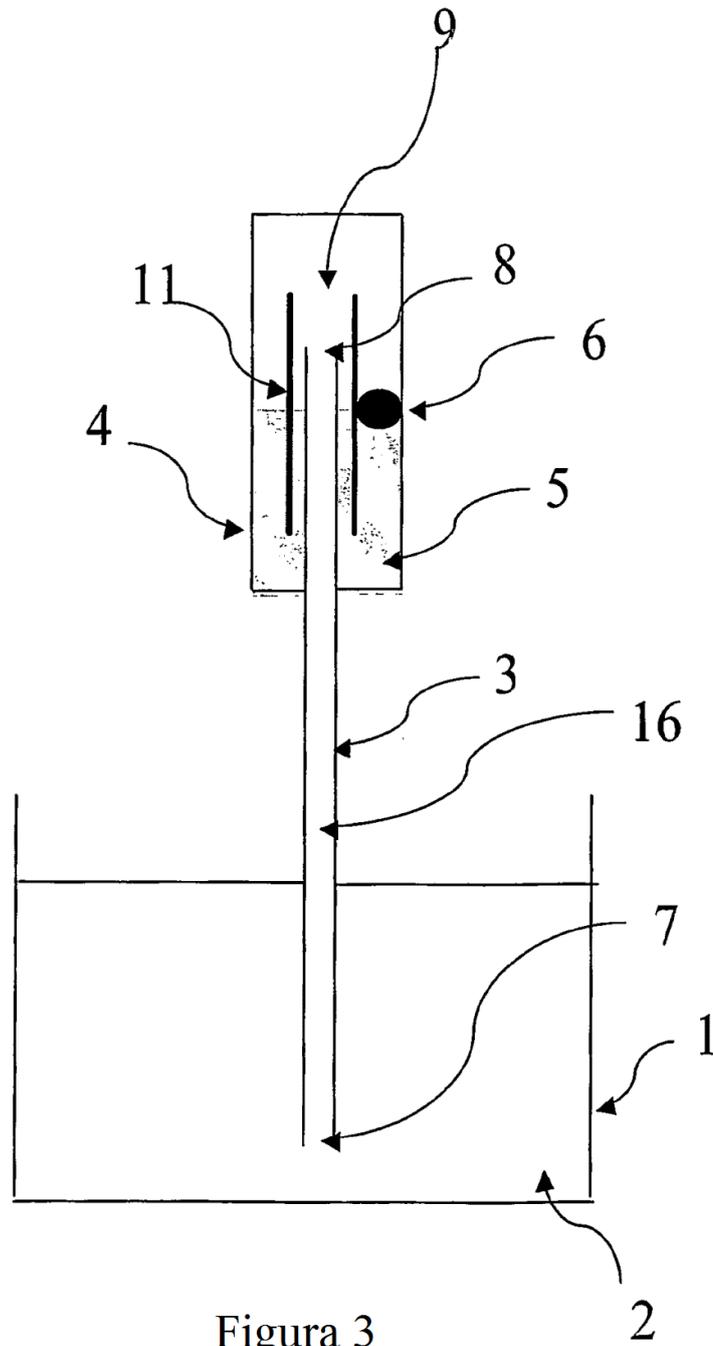


Figura 3

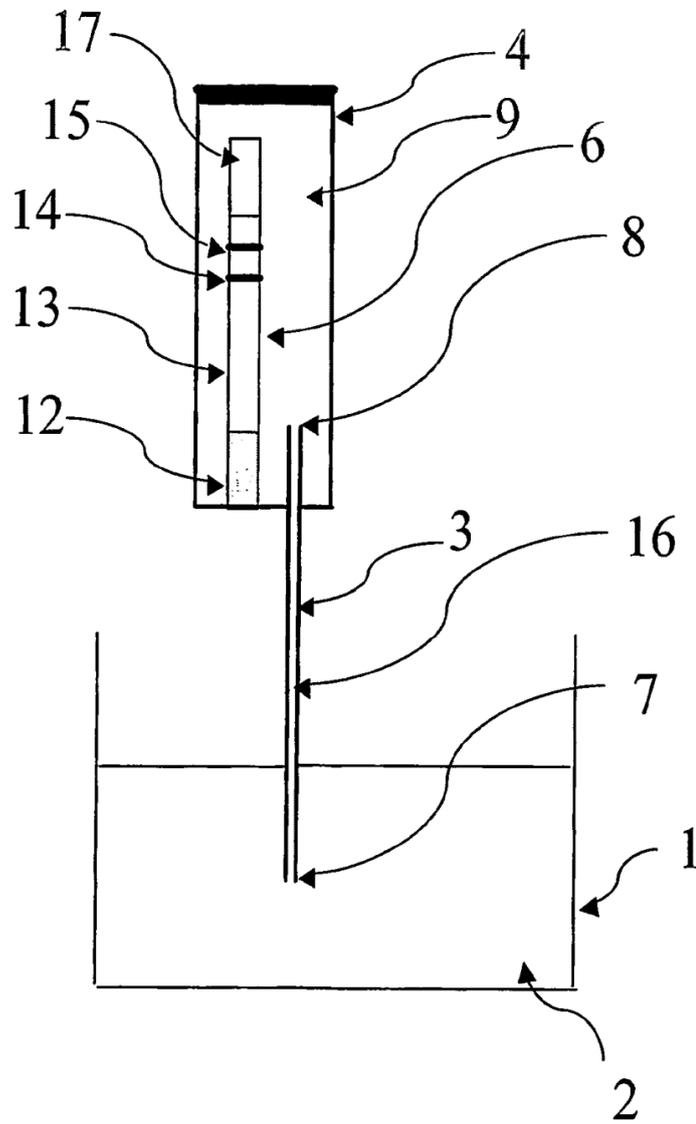


Figura 4

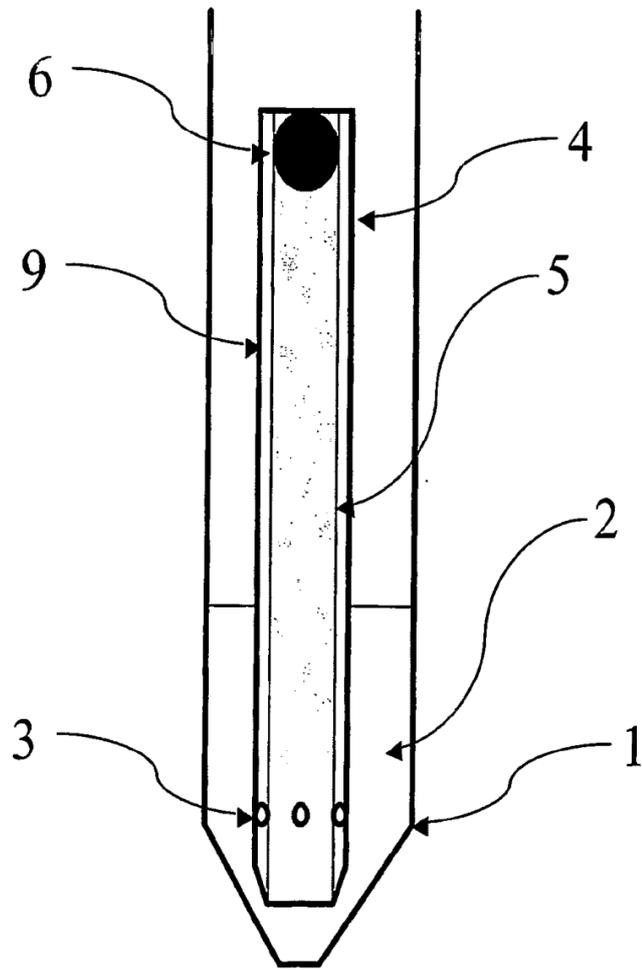


Figura 5