

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 583**

21 Número de solicitud: 201331638

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

11.11.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

12.05.2015

71 Solicitantes:

**MONADA AMAYA, Marhlidy (50.0%)
PUERTO DE NAVACERRADA, 32
28210 VALDEMORILLO (Madrid) ES y
RODRIGUEZ AFONSO, Jose Carlos (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MONADA AMAYA, Marhlidy y
RODRIGUEZ AFONSO, Jose Carlos**

74 Agente/Representante:

TORO GORDILLO, Francisco Javier

54 Título: **CONTROL MICROBIOLÓGICO PARA RECUENTO DE MICROORGANISMOS Y AISLAMIENTO DE PATÓGENOS**

57 Resumen:

La invención trata de medios de cultivo en polvo para microbiología, con gelificantes en frío añadidos e impregnados mecánicamente en soportes de fibra para ser posteriormente esterilizados por irradiación, obteniéndose así, a partir de un medio deshidratado, un medio preparado, estéril y listo para su uso, con la ventaja de auto-absorber la muestra sin necesidad de calentar, fundir y enfriar agares, de manera que tras incubar adecuadamente se obtienen colonias de aspecto prácticamente idéntico al obtenido en placas preparadas convencionales de los medios estándar, presentando como dos de las características fundamentales de novedad el hecho de que la impregnación del medio en la fibra se realiza en seco, y que no se necesitan aplicadores para la correcta autodifusión de la muestra.

ES 2 535 583 A1

CONTROL MICROBIOLÓGICO PARA RECuento DE MICROORGANISMOS Y

AISLAMIENTO DE PATÓGENOS

DESCRIPCIÓN

5

OBJETO DE LA INVENCION

10

La presente invención se refiere a un control microbiológico para recuento de microorganismos y aislamiento de patógenos, y más concretamente a un nuevo método y formato en los medios de cultivo utilizados para poder conseguir un medio preparado estéril, listo para su uso.

15

El objeto de la invención es conseguir que el medio, deshidratado pero preparado, estéril y listo para uso, tenga la ventaja de auto-absorber la muestra (siembra en masa) sin necesidad de calentar, fundir ni enfriar agares, ni de emplear aplicadores, permitiendo obtener, tras una incubación adecuada, colonias de aspecto prácticamente idéntico al obtenido en placas preparadas convencionales de los medios estándar.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El control microbiológico para recuento de microorganismos y aislamiento de patógenos, actualmente se realiza básicamente de tres formas o métodos
5 convencionales que corresponden a:

a) Mediante medios deshidratados no estériles que el usuario debe hidratar, esterilizar al autoclave, enfriar, dispensar en placas, tubos o frascos, y posteriormente sembrar, o bien en masa a 45°C, o bien con asas, membranas filtradas o escobillones, una vez sólido.
10

b) Mediante medios preparados en tubos o frascos estériles, que el usuario debe hervir, enfriar, dispensar en placas y sembrar en ellas, o bien en masa a 45°C, o bien con asas, membranas filtradas o escobillones una vez sólido. Estos dos métodos referidos requieren un elevado periodo de tiempo para llevar a cabo el proceso (el primero varias horas y el segundo cerca de 1 hora).
15

c) Mediante medios preparados en placa, que el usuario debe sembrar en superficie con asas, membranas filtradas o escobillones, y que
20

habitualmente solo son capaces de absorber entre 0,1 y 0,33 ml de muestra (la absorción de un 1 ml tarda mucho y no es recomendada en normas ISO).

El avance de la placa preparada es que sólo requiere minutos de trabajo, pero tiene la limitación de no poder sembrar en masa, mezclando el ml de muestra con el medio, como requieren casi todos los métodos de recuento en placa (bacterias aerobias, enterobacterias, coliformes, estafilococos, anaerobios, levaduras...): sólo sirve para sembrar en superficie con escobillones, asas o membranas. Además, el mantenimiento de la esterilidad durante el transporte se ve muy comprometido y la caducidad muy mermada, ya que frente a los 5 años del medio deshidratado, o frente a un año del tubo/frasco preparado, se reduce a solo 1-3 meses.

Por otro lado existen invenciones de las últimas décadas (como por ejemplo Petrifilm-USA, CompactDry-Japón y productos similares de estos mismos países) que permiten la absorción en frío de 1 ml de muestra, de diversas maneras, lo que permite tener un medio preparado similar a la placa preparada, con una caducidad muy superior, aproximadamente de un año, aunque tiene inconvenientes ya que se requieren forzosamente aplicadores para difundir la muestra en el primer caso, y la aparición de colonias deformes en el segundo caso.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5 El medio de cultivo para control microbiológico según la invención, viene a resolver los problemas anteriormente referidos, dando incluso un paso adelante respecto de los métodos referidos en el último párrafo del apartado anterior, de manera que según la invención, es posible conseguir la autodifusión de la muestra a analizar sin necesidad de aplicadores, así como obtener colonias prácticamente idénticas a las obtenidas con el método microbiológico convencional.

10

Más concretamente, según la invención, se parte de un medio deshidratado en polvo fino que incluye gelificantes que permiten la autodifusión tridimensional de la muestra en frío, sin necesidad de calentar y enfriar el medio, estando éste embebido en una lámina absorbente de una matriz fibrosa que reparte la muestra a analizar, de manera que el conjunto de dichos tres componentes, denominado 15 “ **disco nutriente**” , va envasado en, por ejemplo, una bolsa autosellable de aluminio, o cualquier otro medio que protege esos discos nutrientes de la humedad y de la luz, agentes éstos que son los que más estropean todos los medios de cultivo.

Finalmente, el medio de cultivo referido es esterilizado, permitiendo al usuario poder utilizarlo en el soporte que desee, preferentemente en placas Petri estériles de 55-60 mm de diámetro.

5

Los medios de cultivo empleados en la invención, serán a menudo agares cromogénicos para cada parámetro microbiológico: recuento y detección de bacterias aerobias, recuento y detección de hongos (levaduras y mohos), recuento y detección de Enterobacterias, recuento y detección de *E.coli* y demás coliformes, recuento y detección de *Staphylococcus aureus*, recuento y detección de *Pseudomonas aeruginosa*, recuento y detección de *Burkholderia cepacia*, recuento y detección de *Listeria monocytogenes*, recuento y detección de *Bacillus cereus*, detección de *Salmonella spp.*, recuento y detección de *Vibrio spp*, recuento y detección de *Candida albicans...*, que en este caso su agar-agar no interviene en la gelificación del medio, pero si ayuda a estabilizar, tamponar y robustecer la mezcla, pudiéndose utilizar cualquier medio de cultivo deshidratado en polvo, sea cual sea su granulometría, siempre que incluya gelificantes en frío y se incluya en láminas de fibra absorbente.

10

15

20

En cuanto a los gelificantes utilizados, y que permiten la autodifusión

tridimensional de la muestra en frío, podrá utilizarse cualquiera que absorba agua en frío, sea sintético o natural, añadido al medio de cultivo y embebido en seco en la lámina de fibra.

5 Por su parte, la lámina absorbente de matriz fibrosa, que se acaba de comentar en el párrafo anterior, ayuda al medio a absorber la muestra en frío, sin necesidad de calentar y enfriar el medio, todo ello sin necesidad de aplicadores, repartiéndola de forma homogénea y prácticamente instantánea por capilaridad, siendo sus poros lo suficientemente amplios como para absorber y mantener el
10 medio de cultivo en polvo y para absorber la muestra, pero lo suficientemente finos como para que las colonias crezcan con aspectos prácticamente idénticos a las colonias crecidas en medios convencionales.

La polimerización del medio se consigue en las tres dimensiones gracias a la
15 composición del gelificante en la matriz fibrosa, pudiéndose utilizar una lámina de fibra absorbente cualquiera, ya sea sintética o natural, sea cual sea su tamaño en cualquiera de sus tres dimensiones, sea cual sea el diámetro medio de su malla, su forma geométrica (circular, cuadrada, hexagonal, etc.), siempre que embeba mecánicamente el medio de cultivo en polvo con gelificante en frío.

20

La esterilización en un medio cerrado se llevará a cabo preferentemente en bolsas autosellables de aluminio, que protegen de la humedad, de la luz y de la contaminación externa, aunque puede utilizarse cualquier medio para guardar/almacenar el cultivo propiamente dicho.

5

En cuanto a la esterilización, la misma se realizará mediante irradiación, aunque puede utilizarse cualquier sistema o método conocido de esterilización.

10

En cuanto al soporte sobre el que el usuario puede utilizar, podrá ser también cualquiera siempre que dicho soporte sea hidrófugo y preferentemente transparente por ambas caras, para observar mejor las colonias por arriba y/o por abajo, resultando óptima la utilización de una placa Petri por cada disco nutriente, para que el usuario no tenga que buscarse soportes.

15

Añadir que utilizando el disco nutriente estéril sobre un 1 ml de muestra, el peso del mismo atrapa la muestra y sus microorganismos, autodifundiéndose instantáneamente sin necesidad de calentar ni enfriar y, tras la incubación tiempo/temperatura adecuados para el microorganismo buscado, aparecen aproximadamente tantas colonias como unidades formadoras de colonias vivificables había en la muestra. Y que algunos medios requieren la adición de la

20

muestra sobre el disco, en vez de la adición del disco sobre la muestra.

La transparencia de la matriz fibrosa y los componentes cromogénicos del medio, permiten ver las colonias crecidas en todo el grosor del disco nutriente, tanto desde arriba como desde abajo.

A menudo la sinergia de los componentes permite acortar los tiempos de incubación, obteniendo resultados más rápidos que el método convencional; por ejemplo permite recuentos estimativos en sólo 24 h para aerobios, *Pseudomonas...* que en el método tradicional requieren 2-3 días de incubación.

Como consecuencia de ahorrarse el proceso de fusión y enfriamiento de agares, el usuario se ahorra el punto crítico más importante en la microbiología de las siembras por inclusión en masa: el hecho de añadir el medio demasiado caliente en la muestra (para que el agar-agar no solidifique antes de mezclar el medio con la muestra), y por lo tanto el derivado hecho de impedir que crezcan todas las unidades formadoras de colonias, de modo que mediante el sistema de la invención se aumenta la exactitud de los recuentos y el límite de detección de los aislamientos: a menudo el número de colonias obtenido se acerca más al número de ufc presentes en la muestra que el número de colonias obtenido en los

métodos convencionales.

Entre las ventajas más destacables del invento, además de las anteriormente comentadas, pueden citarse las siguientes:

5

- La impregnación del medio se realiza en seco y de forma mecánica.
- No se utiliza alcohol para la impregnación.
- No se utilizan pegamentos.

10

- La fibra es de poro tan fino que las colonias no toman macroscópicamente la forma de la fibra, sino la misma forma típica del medio agarizado clásico.

- Los medios empleados aportan avances sobre los estándar, siguiendo la mayoría de ellos las más modernas normas ISO que les aplican, además están agarizados y son de polvo extremadamente fino.

15

- No se necesitan aplicadores para que la muestra autodifunda, ni superficies lisas y sólidas para trabajar con dichos aplicadores, por lo que la invención se puede emplear en muestras de laboratorio y también en muestras de campo.

20

- La muestra autodifunde por el simple peso de colocar la lámina nutriente sobre ella, sea en el soporte que sea, de manera que algunos

medios difunden la muestra mucho más rápido que otros (desde sólo 1 segundo), en función de su composición más o menos hidrófila, pero que en todos los casos la muestra se autodifunde en menos de un minuto. En algunos medios incluso no se necesita el peso del disco nutriente para la autodifusión, por lo que se puede añadir la muestra sobre el disco en vez de hacerlo al revés.

5

- La muestra o el agua al mezclarse con el cultivo de la invención, permite que éste se quede adherido al soporte (por ejemplo placa Petri), de modo que si se desea sembrar con asa, membrana filtrada o escobillón, el disco nutriente ni se desplaza ni se arruga.

10

- Utilización flexible de soportes, con las ventajas que de ello se derivan, aunque preferentemente se utilizará una placa Petri estéril de 55-60 mm por cada disco nutriente.

15

20

REIVINDICACIONES

1.- Control microbiológico para recuento de microorganismos y aislamiento de patógenos, utilizando medios de cultivo preparados de una u otra forma para conseguir un producto con medio deshidratado y estéril, que se comporta como medio preparado y listo para su uso, caracterizado porque incluye un medio deshidratado en polvo fino, que incluye gelificantes que permiten la autodifusión tridimensional de la muestra en frío; con la particularidad de que dicho medio de cultivo está impregnado en una lámina absorbente de una matriz fibrosa que reparte la muestra a analizar; habiéndose previsto que el producto resultante de la combinación del medio deshidratado en polvo fino, los gelificantes y la lámina absorbente, es esterilizado por irradiación en ambiente cerrado herméticamente, permitiendo su colocación y utilización final sobre un soporte.

15

2.- Control microbiológico para recuento de microorganismos y aislamiento de patógenos, según reivindicación 1, caracterizado porque el medio de cultivo deshidratado en polvo, es susceptible de tener cualquier granulometría.

20

3.- Control microbiológico para recuento de microorganismos y aislamiento de

patógenos, según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el gelificante en frío es susceptible de ser sintético o natural, y siempre añadido al medio de cultivo y embebido en seco en la lámina de fibra.

5 4.- Control microbiológico para recuento de microorganismos y aislamiento de patógenos, según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la lámina absorbente de matriz fibrosa presenta unos poros suficientemente amplios para permitir absorber y mantener el medio de cultivo en polvo y para absorber la muestra y sus microorganismos, y lo suficientemente finos para que las colonias
10 crezcan con aspecto prácticamente idéntico a las colonias crecidas en medios convencionales; habiéndose previsto que dicha lámina absorbente de matriz fibrosa es susceptible de ser sintética o natural, tener cualquier tamaño y diámetro medio de su malla, así como tener cualquier forma geométrica.

15 5.- Control microbiológico para recuento de microorganismos y aislamiento de patógenos, según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el soporte sobre el que el usuario puede emplear el medio de cultivo resultante es hidrófugo y preferentemente transparente por ambas caras.

20 6.- Control microbiológico para recuento de microorganismos y aislamiento de

patógenos, según reivindicación 5, caracterizado porque el soporte estará constituido preferentemente por una placa Petri o material similar.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201331638

②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.11.2013

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 5912115 A (MARESCH MARTIN J ET AL.) 15/06/1999, reivindicaciones 1, 13, 15, 35, 36.	1-6
X	US 4476226 A (HANSEN PAUL E ET AL.) 09/10/1984, reivindicaciones, figuras.	1-6
A	FR 2601032 A1 (ORSTOM INST FS RECH SCIENTIF) 08/01/1988, resumen.	1-6
A	WO 9724432 A1 (CHISSO CORP ET AL.) 10/07/1997, resumen.	1-6
A	EP 0415792 A2 (MINNESOTA MINING & MFG) 06/03/1991, resumen.	1-6
A	US 6331429 B1 (USHIYAMA MASASHI) 18/12/2001, resumen	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
03.12.2014

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/20 (2006.01)

C12Q1/04 (2006.01)

C12M1/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12Q, C12M

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 03.12.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-6	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-6	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 5912115 A (MARESCH MARTIN J et al.)	15.06.1999
D02	US 4476226 A (HANSEN PAUL E et al.)	09.10.1984
D03	FR 2601032 A1 (ORSTOM INST FS RECH SCIENTIF)	08.01.1988
D04	WO 9724432 A1 (CHISSO CORP et al.)	10.07.1997
D05	EP 0415792 A2 (MINNESOTA MINING & MFG)	06.03.1991
D06	US 6331429 B1 (USHIYAMA MASASHI)	18.12.2001

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga un medio de cultivo para aislamiento y recuentos de microorganismos que incluye un medio deshidratado en polvo, que incluye un agente gelificante, y que impregna una lámina absorbente de una matriz fibrosa.

D01 divulga un sensor para detectar microorganismo en muestras de sangre que comprende un recipiente con una lámina de matriz inmovilizada que contiene una sustancia gelificante que puede estar deshidratada y que comprende además ingredientes para facilitar el crecimiento del microorganismo.

D02 divulga un dispositivo seco para el cultivo de microorganismos que comprende un sustrato, una capa adhesiva recubriendo el sustrato, no inhibiendo la capa adhesiva el crecimiento del microorganismo, y un polvo soluble en agua fría adherido de manera uniforme a la superficie del adhesivo; el polvo comprende un agente y / o nutrientes gelificantes para los microorganismos en crecimiento.

D03 divulga un dispositivo para el control de un inóculo bacteriano que consiste en la incubación de los microorganismos en una matriz de un polímero deshidratada que es rehidratada hasta formar un gel antes de su uso. El medio sólido contiene un gelificante y los nutrientes necesarios para el crecimiento del microorganismo.

D04 divulga un dispositivo para la incubación y un medio de cultivo de microorganismos donde el material de cultivo de microorganismos consiste en una capa (capa absorbente de agua) que comprende un material en forma de hoja que es absorbente en forma de lámina o matriz.

D05 divulga un dispositivo para la detección de microorganismos que comprende un medio de cultivo seco y reconstituible en un soporte.

D06 divulga un material para medios de cultivo que comprende una capa de fibras, una capa con un compuesto polimérico; y una capa de otro compuesto polimérico B que contiene un formador de color / o un agente y selección, que se pone en capas en este orden.

En vista de lo divulgado por los documentos D01 y D02 las características técnicas del objeto de la invención contenida en las reivindicaciones 1-6 estarían comprendidas en el estado de la técnica por lo que carecería de novedad tal y como se menciona en el art.6 de la ley 11/1986. Se considera que la invención contenida en las reivindicaciones 1-6 no implican actividad inventiva puesto que resulta del estado de la técnica de una manera evidente para el experto en la materia, según se menciona en el art.8 de la ley 11/1986.