

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 380**

21 Número de solicitud: 201730046

51 Int. Cl.:

C02F 1/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

17.01.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.02.2017

71 Solicitantes:

OX-CTA, S.L. (100.0%)

**PARQUE TEC. WALQA CTRA ZARAGOZA KM 566
22197 CUARTE (Huesca) ES**

72 Inventor/es:

**ORÓS MONGE, Javier y
DOMINGUEZ UBIETO, Ignacio**

74 Agente/Representante:

AZAGRA SAEZ, María Pilar

54 Título: **EQUIPO Y PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE PROTOZOOS**

57 Resumen:

Equipo y procedimiento de detección de protozoos que integra en un único conjunto un dispositivo de muestreo y un kit de detección de protozoos, alojados preferentemente en una caja envolvente portátil, admitiendo el dispositivo de muestreo dos variantes, una de ellas, más completa, para toma de muestras durante un tiempo más largo, del orden de días o semanas, mientras que la otra, más sencilla, está indicada para la toma de muestras en poco tiempo, del orden de horas como mucho.

El kit de detección de protozoos incluye unas de tiras reactivas junto con los equipos portátiles y reactivos para poder realizar in-situ los procesos de extracción de ADN (ácido desoxirribonucleico), amplificación mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa), e hibridación/revelado. Estas tiras reactivas presentan el resultado del análisis mediante unos marcajes específicos de los productos amplificados.

ES 2 603 380 A1

DESCRIPCION

Equipo y procedimiento de detección de protozoos

- 5 La presente memoria descriptiva se refiere, como su título indica, a un equipo y procedimiento de detección de protozoos del tipo de los utilizados de forma discontinua y portable para el análisis de agua.

Campo de la invención

- 10 La invención se refiere al campo de los equipamientos y procedimientos de análisis y medida para el aprovechamiento óptimo de los recursos hídricos, especialmente agua de consumo humano/animal, acuicultura, agua de refrigeración, así como en agua de otros usos industriales. El equipo se integra en un procedimiento biocida eficaz, ecológico y económicamente viable que permita garantizar la higienización completa del agua, es decir, eliminación de bacterias, hongos, virus, algas y también protozoos y las bacterias que éstos puedan
15 albergar en su interior.

Estado actual de la técnica

- 20 El agua es esencial para nuestra vida diaria. La calidad del agua, tanto si se utiliza para beber, usos domésticos, la producción de alimentos o fines recreativos tiene un impacto importante en la salud. El agua de mala calidad puede causar brotes de enfermedades en diferentes escalas: el 80% de las enfermedades infecciosas y parasitarias gastrointestinales y un tercio de las muertes causadas por estas infecciones se deben al uso y consumo de agua contaminada.

- 25 En la actualidad, la legislación europea establece límites microbiológicos para el consumo de agua con respecto a algunas bacterias. Sin embargo, el control de las bacterias no es suficiente para asegurar la calidad del agua.

- Los estudios han demostrado que no sólo las bacterias pueden causar enfermedades; en efecto, también se pueden encontrar en el agua amebas de vida libre (protozoos capaces de colonizar las redes de agua que
30 representan un grave riesgo para la salud). La *acanthamoeba* es la ameba más frecuente, (representando más del 90% del total de las amebas presentes en el agua) teniendo una gran capacidad para albergar una importante variedad de microorganismos patógenos, como virus (adenovirus, virus de la polio, enterovirus, etc.), bacterias (*Campylobacter*, *E. coli*, *Legionella*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, etc.) y hongos (*Cryptococcus*, *Blastomyces*, *Sporothrix*, *Histoplasma*, etc.).

- 35 Ello hace que exista una elevada necesidad de equipos para la detección de protozoos, con vista a su posterior eliminación.

- 40 Existen varias patentes y documentos científicos publicados, relacionados con este tipo de problemática. La mayor parte de las soluciones, como las recogidas en las patentes ES2177380 "*Procedimiento para la eliminación de contaminantes biológicos del agua*" y WO2015015027 "*Method for eliminating micro-organisms in water by filtration*", se limitan a un filtrado general, tratando de eliminar micro organismos, pero sin ser capaces de detectar específicamente protozoos.

- 45 Son conocidos algunos procedimientos para detectar organismos como los protozoos en el agua, tal y como encontramos reivindicado en las patentes ES2158854 "*Oligonucleótidos derivados de la familia de genes SOD*" y ES2331645 "*Procedimiento para controlar el crecimiento de plantas acuáticas y de organismos zoológicos*", pero son procesos complicados, que requieren de equipamientos muy específicos y delicados que únicamente pueden realizarse en laboratorio, no siendo susceptibles de realizarse in-situ ni de forma portátil.

- 50 Asimismo se conocen algunos equipos muestreadores, como el descrito en ES2346630 "*Dispositivo de monitorización en continuo de especies en suspensión en el agua*", pero están previstos para una utilización fija en una ubicación y para el muestreo continuo, no discontinuo, no incorporando ningún tipo de elemento de detección específica de protozoos.

- 55 **Descripción de la invención**

- Para solventar la problemática existente en la actualidad en la detección de protozoos en el agua de una manera discontinua y portable se ha ideado el equipo y procedimiento de detección de protozoos objeto de la presente
60 invención, el cual integra en un único conjunto, un dispositivo de muestreo y un kit de detección de protozoos, que va alojado bien en una única caja envolvente portátil, bien en dos cajas envolventes portátiles, una para el dispositivo de muestreo y otra para el kit de detección de protozoos.

El dispositivo de muestreo está previsto en dos variantes, una de ellas, más completa, para toma de muestras durante un tiempo más largo, del orden de días o semanas, mientras que la otra, más sencilla, está indicada para la toma de muestras en poco tiempo, del orden de minutos u horas.

- 5 El kit de detección de protozoos incluye unas tiras reactivas junto con los equipos portátiles y reactivos para poder realizar in-situ los procesos de extracción de ADN (ácido desoxirribonucleico), amplificación mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa), e hibridación/revelado. Estas tiras reactivas presentan el resultado del análisis mediante unos marcajes específicos de los productos amplificados, en forma de bandas de color que reaccionan ante la presencia de los protozoos buscados.

- 10 En ambos casos el equipo dispone de un filtro principal por el que pasa el agua, con una luz de paso elegida para que queden en el mismo los quistes de los protozoos o los propios individuos que se encuentren libres en el agua. Filtrada el agua, queda en el filtro el material de filtrado con los protozoos, si los hubiera. Este material, resultado del filtrado, es el que se utiliza posteriormente para hacer la PCR y estudiar la presencia de la especie o especies a través de su ADN.

Ventajas de la invención

- 20 Este equipo y procedimiento de detección de protozoos que se presenta aporta múltiples ventajas sobre los sistemas disponibles en la actualidad siendo la más importante que permite integrarse en un procedimiento biocida eficaz, ecológico y económicamente viable que permita garantizar la higienización completa del agua, es decir, eliminación de bacterias, hongos, virus, algas y también protozoos y las bacterias que éstos puedan albergar en su interior.

- 25 Otra importante ventaja es que es un sistema portátil, que se puede utilizar en cualquier sitio, incluida la instalación del cliente, y en tiempo muy inferior al requerido por los procesos de laboratorio.

- Es importante destacar que este equipo está específicamente concebido para un uso discontinuo, permitiendo obtener resultados con muestreos de días o semanas en el caso de la realización preferente, o con muestreos de minutos u horas en el caso de la realización alternativa, propiciando que el personal técnico pueda realizar medidas en una gran variedad de sitios con el mismo equipo.

- 30 Otra de las más importantes ventajas a destacar es que se basa en la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de una región determinada del ADN correspondiente a la especie o especies de protozoo objetivo, y su posterior detección por hibridación a una sonda específica y revelado mediante una tira de inmunocromatografía, permitiendo de esta manera la detección e identificación del protozoo con una gran sensibilidad y especificidad, superior a otros sistemas.

- 35 Es importante destacar asimismo que es un sistema de extracción de ADN rápido y fácil, y no hay mucha dependencia de los equipos instrumentales, lo cual propicia un equipo de detección completa de Acanthamoeba en el agua que puede aplicarse fuera del laboratorio, in situ donde lo requiera el cliente final, con una sensibilidad extraordinaria.

Descripción de las figuras

- 45 Para comprender mejor el objeto de la presente invención, en el plano anexo se ha representado una realización práctica preferencial de un equipo de detección de protozoos.

En dicho plano la figura -1- muestra un diagrama general de bloques del equipo.

- 50 La figura -2- muestra un diagrama general de bloques del dispositivo de muestreo en su realización preferente.

La figura -3- muestra un diagrama general de bloques del dispositivo de muestreo en su realización alternativa.

- 55 La figura -4- muestra un diagrama general de bloques del kit de detección de protozoos

La figura -5- muestra una tira reactiva y sus principales zonas.

Realización preferente de la invención

- 60 El equipo de detección de protozoos objeto de la presente invención, comprende básicamente, como puede apreciarse en el plano anexo, un dispositivo de muestreo (1) y un kit de detección de protozoos (2), integrados preferentemente dentro de una única caja envolvente (23) portátil, aunque está previsto que de forma alternativa

pueden ir alojado en dos cajas envoltentes portátiles, una para el dispositivo de muestreo y otra para el kit de detección de protozoos.

En una realización preferente, el dispositivo de muestreo (1a) comprende a su vez una entrada de agua proveniente de la línea de distribución (3), una entrada de agua sin presión (4), asociada con una bomba (5) y una válvula de seguridad (6), un prefiltro (7) seguido de un filtro principal (8), con un filtro de muestra (9) asociado, un contador de caudal (10) asociado a una salida de agua (11), y un programador (12) de control.

El prefiltro (7) limpia el agua de las impurezas más grandes y evita que se colmate el filtro principal (8).

El programador (12) de control controla el periodo de toma de muestra, que puede ser de días a semanas, y regula con la bomba los parámetros de filtrado: caudal y frecuencia, comandando la puesta en marcha y parada del equipo.

Está prevista una realización alternativa de la invención, más simplificada, en la que el dispositivo de muestreo (1b) comprende una entrada de agua proveniente de la línea de distribución (3), una entrada de agua sin presión (4), asociada con una bomba (5) y una válvula de seguridad (6), un filtro principal (8), y un contador de caudal (10) asociado a una salida de agua (11).

En ambos casos el equipo dispone de un filtro principal (8) por el que pasa el agua, con una luz de paso mínima, elegido para que queden en el mismo los quistes de los protozoos o los propios individuos que se encuentren libres en el agua. Filtrada el agua, queda en el filtro el material de filtrado con los protozoos, si los hubiera. Este material, resultado del filtrado, es el que se utiliza posteriormente para hacer la PCR y estudiar la presencia de la especie o especies a través de su ADN.

La entrada de la muestra en el equipo puede ser por conexión directa a la entrada de agua proveniente de la línea de distribución (3) o sin esa conexión, a una entrada de agua sin presión (4). En el primer caso es la misma instalación la que impulsa el agua a través del equipo (incluyéndose para evitar posibles problemas de sobrepresión una válvula reguladora). La bomba (5) es la responsable de impulsar el flujo de agua para permitir procesar la muestra cuando el equipo no se ha podido conectar directamente a la línea de abastecimiento del cliente. Al final del sistema existe un contador de caudal (10) que nos permite comprobar el volumen de muestra procesado.

El kit de detección de protozoos (2) comprende una pluralidad de tiras reactivas (13), unos reactivos de PCR (14), unos reactivos de hibridación/revelado (15), un termobloque portátil (16) alimentado con una batería del termobloque (17) y un termociclador portátil (18) alimentado con una batería del termociclador (19).

Las tiras reactivas (13) son unas tiras de nitrocelulosa, de forma preferentemente rectangular, sobre la que se han dosificado los anticuerpos que detectan los marcajes específicos de los productos amplificados, estando divididas cada una de las tiras en tres áreas que reconocen los diferentes marcajes empleados o la proteína del control de revelado.

Las tiras reactivas (13) comprenden un área de absorción (24), que corresponde a la parte inferior de la tira, y que se introduce en la muestra, un área de test (25) conformada por una membrana cromatográfica protegida con un plástico transparente, y un área de manipulación (26) correspondiente a la parte final de la tira, conformada de un material absorbente protegido por un plástico de color rotulable. El área de test (25) de las tiras reactivas (13) presenta hasta 3 bandas diferentes, indicando la primera línea (22) por la parte inferior la presencia o no de protozoos, la segunda línea (21) actúa como control del proceso de extracción y amplificación, y la tercera línea (20) actuando como control del proceso de revelado.

El equipo de detección de protozoos objeto de la presente invención está dirigido a desarrollar un procedimiento de detección de protozoos en el agua que comprende:

- una primera fase de muestreo,
- y una segunda fase de detección de protozoos en las muestras obtenidas.

La primera fase de muestreo presenta ligeras diferencias dependiendo de si utilizamos el dispositivo de muestreo (1) en su realización preferente (1a) o en su realización alternativa (1b).

En el caso de utilizar la realización preferente del dispositivo de muestreo (1a), la fase de muestreo se realiza mediante dicho dispositivo de muestreo (1a) y comprende en este caso:

- un primera etapa de filtrado, en el que el analito queda retenido en el filtro principal (8),
- una segunda etapa de contralavado, en el que los organismos buscados son movidos del filtro principal (8) al filtro de muestra (9),

- y una tercera etapa final de rearmado en la que se dejan las conexiones como estaban inicialmente, se desinfecta el circuito mediante el paso de un biocida y se vacían las tuberías.

La etapa de filtrado comprende en este caso:

5

- un primer paso de homogeneización, en el que se dejan pasar unos litros de agua para eliminar restos de biocida de la última operación,
- un segundo paso de filtrado, en el que se deja pasar el agua, procedente de la entrada de agua proveniente de la línea de distribución (3) o de la entrada de agua sin presión (4), a través del prefiltro (7) y del filtro principal (8), controlando mediante el contador de caudal (10) que el flujo de agua es el adecuado.

10

La etapa de contralavado se realiza, en este caso, una vez transcurrido el tiempo necesario, controlado por el programador (12) de control, y comprende:

15

- un primer paso de inversión, conectando las conducciones para que el caudal de agua, procedente de la entrada de agua proveniente de la línea de distribución (3) o de la entrada de agua sin presión (4), entre por la salida del filtro principal (8), cambiando el sentido de la circulación del agua y originando que las partículas adheridas al filtro principal (8) se despeguen y queden así atrapadas en el filtro de muestra (9),
- y un segundo paso de retirada de muestras, en el que se desmonta el filtro de muestra (9) para su examen siguiente.

20

En el caso de utilizar la realización alternativa del dispositivo de muestreo (1b), la fase de muestreo se realiza mediante dicho dispositivo de muestreo (1b) y comprende en este caso:

25

- un primer paso de homogeneización, en el que se dejan pasar unos litros de agua para eliminar restos de biocida de la última operación,
- un segundo paso de filtrado, en el que se deja pasar el agua, procedente de la entrada de agua proveniente de la línea de distribución (3) o de la entrada de agua sin presión (4), a través del filtro principal (8), controlando mediante el contador de caudal (10) que el flujo de agua es el adecuado,
- finalizando con un tercer paso de separación del filtro para su examen siguiente.

30

La fase de detección de protozoos en las muestras obtenidas se realiza mediante el kit de detección de protozoos (2), y se basa en la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de una región determinada del ADN correspondiente a la especie o especies de protozoo objetivo, y su posterior detección por hibridación a una sonda específica y revelado mediante una tira de inmunocromatografía. De esta manera, el kit permite la detección e identificación del protozoo con una gran sensibilidad y especificidad.

35

La fase de detección de protozoos en las muestras comprende:

40

- un primer paso de extracción de ADN (ácido desoxirribonucleico),
- un segundo paso de amplificación mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa)
- y un tercer paso de hibridación y revelado,

obteniendo al final de proceso unas bandas de diferentes colores a lo largo de la membrana de las tiras reactivas (13), dependiendo de la presencia o ausencia de protozoos en la muestra el color y número de bandas obtenidas.

45

El paso de extracción de ADN está basado en la unión del ADN a partículas magnéticas recubiertas de sílice, realizando la extracción del ADN directamente de las muestras de filtro.

50

En el paso de amplificación mediante PCR se realiza la amplificación simultánea de un fragmento del gen de la DNA polimerasa de la especie o especies objetivo y de un fragmento de un gen control humano (beta-globina), que se utiliza como indicador de la ausencia de inhibidores de la PCR en la muestra de ADN amplificada.

55

En el paso de hibridación y revelado se produce la unión específica de los fragmentos de ADN amplificados a una serie de sondas ancladas a partículas de látex coloreadas, migrando este complejo de ADN + coloide a lo largo de una membrana sobre la que se han depositado anticuerpos específicos, reconociendo los anticuerpos unas marcas añadidas a los productos de la amplificación durante la PCR, de modo que el complejo PCR+coloide se une a la membrana dando lugar a la aparición de una banda coloreada.

60

Cada uno de los productos generados durante la PCR (amplificado del gen control, amplificado de la especie o especies objetivo) lleva un marcaje específico por lo que, al final del proceso, se visualizarán bandas de diferentes colores a lo largo de la membrana. El color y número de bandas dependerá de la presencia o ausencia de protozoos en la muestra. Así, todas las tiras reactivas incluyen una línea de control de revelado (20)

preferentemente verde, cuya aparición es indicativa de que la inmunocromatografía se ha desarrollado correctamente, una línea de control de proceso (21) (extracción+amplificación), preferentemente azul, que nos informa de que el proceso de extracción y amplificación se ha desarrollado correctamente, y una línea asociada a la presencia de protozoos (22), preferentemente roja.

5

La persona experta en la técnica comprenderá fácilmente que puede combinar características de diferentes realizaciones con características de otras posibles realizaciones, siempre que esa combinación sea técnicamente posible.

10

Toda la información referida a ejemplos o modos de realización forma parte de la descripción de la invención.

REIVINDICACIONES

- 1 – Equipo de detección de protozoos, del tipo de los utilizados de forma discontinua y portable para el análisis de agua, **caracterizado porque** comprende un dispositivo de muestreo (1) y un kit de detección de protozoos (2), dentro de una o dos cajas envolventes (23) portátiles, incluyendo el kit de detección de protozoos (2) una pluralidad de tiras reactivas (13), unos reactivos de PCR (14), unos reactivos de hibridación/revelado (15), un termobloque portátil (16), alimentado con una batería del termobloque (17) y un termociclador portátil (18) alimentado con una batería del termociclador (19).
- 2 – Equipo de detección de protozoos, según la anterior reivindicación, **caracterizado porque** el dispositivo de muestreo (1a) comprende una entrada de agua proveniente de la línea de distribución (3), una entrada de agua sin presión (4), asociada con una bomba (5) y una válvula de seguridad (6), un prefiltro (7) seguido de un filtro principal (8), con un filtro de muestra (9) asociado, un contador de caudal (10) asociado a una salida de agua (11), y un programador (12) de control.
- 3 – Equipo de detección de protozoos, según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el dispositivo de muestreo (1b) comprende una entrada de agua proveniente de la línea de distribución (3), una entrada de agua sin presión (4), asociada con una bomba (5) y una válvula de seguridad (6), un filtro principal (8), y un contador de caudal (10) asociado a una salida de agua (11).
- 4 – Equipo de detección de protozoos, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** las tiras reactivas (13) son unas tiras de nitrocelulosa, de forma preferentemente rectangular, sobre la que se han dosificado los anticuerpos que detectan los marcajes específicos de los productos amplificados, estando divididas cada una de las tiras en tres áreas que reconocen los diferentes marcajes empleados o la proteína del control de revelado.
- 5 – Equipo de detección de protozoos, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** las tiras reactivas (13) comprenden un área de absorción (24), que corresponde a la parte inferior de la tira, y que se introduce en la muestra, un área de test (25) conformada por una membrana cromatográfica protegida con un plástico transparente, y un área de manipulación (26) correspondiente a la parte final de la tira, conformada de un material absorbente protegido por un plástico de color rotulable.
- 6 – Equipo de detección de protozoos, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el área de test (25) de las tiras reactivas (13) presenta hasta 3 bandas diferentes, indicando la primera línea (22) por la parte inferior la presencia o no de protozoos, la segunda línea (21) actúa como control del proceso de extracción y amplificación, y la tercera línea (20) actuando como control del proceso de revelado.
- 7 – Procedimiento de detección de protozoos en el agua utilizando un equipo como el descrito en las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** comprende una primera fase de muestreo del agua mediante el dispositivo de muestreo (1a) ó (1b), y una segunda fase de detección de protozoos en las muestras obtenidas, utilizando el kit de detección de protozoos (2).
- 8 – Procedimiento de detección de protozoos en el agua, según la reivindicación 7, **caracterizado porque**, cuando la fase de muestreo se realiza mediante el dispositivo de muestreo (1a), comprende una primera etapa de filtrado, en el que el analito queda retenido en el filtro principal (8), una segunda etapa de contralavado, en el que los organismos buscados son movidos del filtro principal (8) al filtro de muestra (9), y una tercera etapa final de rearmado en la que se dejan las conexiones como estaban inicialmente, se desinfecta el circuito mediante el paso de un biocida y se vacían las tuberías.
- 9 – Procedimiento de detección de protozoos en el agua, según la reivindicación 8, **caracterizado porque** la etapa de filtrado comprende un primer paso de homogeneización, en el que se dejan pasar unos litros de agua para eliminar restos de biocida de la última operación, seguido de un segundo paso de filtrado, en el que se deja pasar el agua, procedente de la entrada de agua proveniente de la línea de distribución (3) o de la entrada de agua sin presión (4), a través del prefiltro (7) y del filtro principal (8), controlando mediante el contador de caudal (10) que el flujo de agua es el adecuado.
- 10 – Procedimiento de detección de protozoos en el agua, según cualquiera de las reivindicaciones 8 y 9, **caracterizado porque** la etapa de contralavado se realiza una vez transcurrido el tiempo necesario, controlado por el programador (12) de control, y comprende un primer paso de inversión, conectando las conducciones para que el caudal de agua, procedente de la entrada de agua proveniente de la línea de distribución (3) o de la entrada de agua sin presión (4), entre por la salida del filtro principal (8), cambiando el sentido de la circulación del agua y originando que las partículas adheridas al filtro principal (8) se despeguen y queden así atrapadas en

el filtro de muestra (9), y un segundo paso de retirada de muestras, en el que se desmonta el filtro de muestra (9) para su examen siguiente.

5 11 – Procedimiento de detección de protozoos en el agua, según la reivindicación 7, **caracterizado porque**, cuando la fase de muestreo se realiza mediante el dispositivo de muestreo (1b), comprende un primer paso de homogeneización, en el que se dejan pasar unos litros de agua para eliminar restos de biocida de la última operación, seguido de un segundo paso de filtrado, en el que se deja pasar el agua, procedente de la entrada de agua proveniente de la línea de distribución (3) o de la entrada de agua sin presión (4), a través del filtro principal (8), controlando mediante el contador de caudal (10) que el flujo de agua es el adecuado, finalizando con un
10 tercer paso de separación del filtro para su examen siguiente.

12 – Procedimiento de detección de protozoos en el agua, según cualquiera de las reivindicaciones 7 a la 11, **caracterizado porque** la fase de detección de protozoos en las muestras obtenidas comprende un primer paso de extracción de ADN, un segundo paso de amplificación mediante PCR y un tercer paso de hibridación y
15 revelado, obteniendo al final de proceso unas bandas de diferentes colores a lo largo de la membrana de las tiras reactivas (13), dependiendo el color y número de bandas de la presencia o ausencia de protozoos en la muestra.

13 – Procedimiento de detección de protozoos en el agua, según la reivindicación 12, **caracterizado porque** el paso de extracción de ADN está basado en la unión del ADN a partículas magnéticas recubiertas de sílice, realizando la extracción del ADN directamente de las muestras de filtro.
20

14 – Procedimiento de detección de protozoos en el agua, según cualquiera de las reivindicaciones 12 y 13, **caracterizado porque** en el paso de amplificación mediante PCR se realiza la amplificación simultánea de un fragmento del gen de la DNA polimerasa de la especie o especies objetivo y de un fragmento de un gen control humano (beta-globina), que se utiliza como indicador de la ausencia de inhibidores de la PCR en la muestra de ADN amplificada.
25

15 – Procedimiento de detección de protozoos en el agua, según cualquiera de las reivindicaciones 12 a la 14, **caracterizado porque** en el paso de hibridación y revelado se produce la unión específica de los fragmentos de ADN amplificados a una serie de sondas ancladas a partículas de látex coloreadas, migrando este complejo de ADN + coloide a lo largo de una membrana sobre la que se han depositado anticuerpos específicos, reconociendo los anticuerpos unas marcas añadidas a los productos de la amplificación durante la PCR, de modo que el complejo PCR+coloide se une a la membrana dando lugar a la aparición de una banda coloreada.
30

35

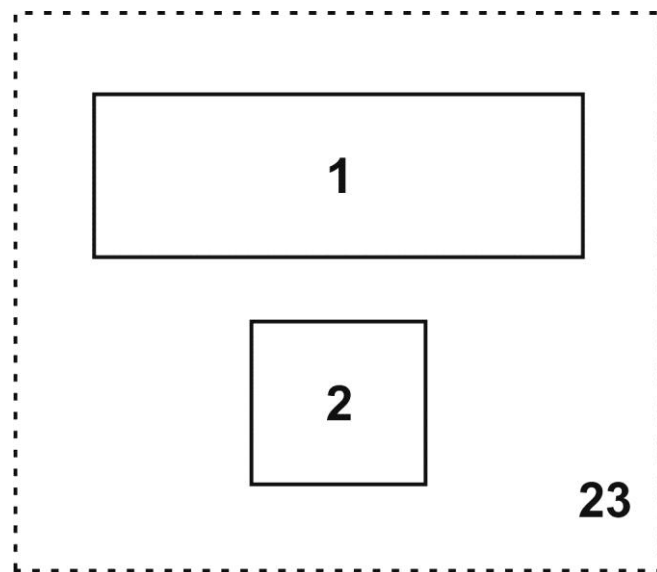


Fig. 1

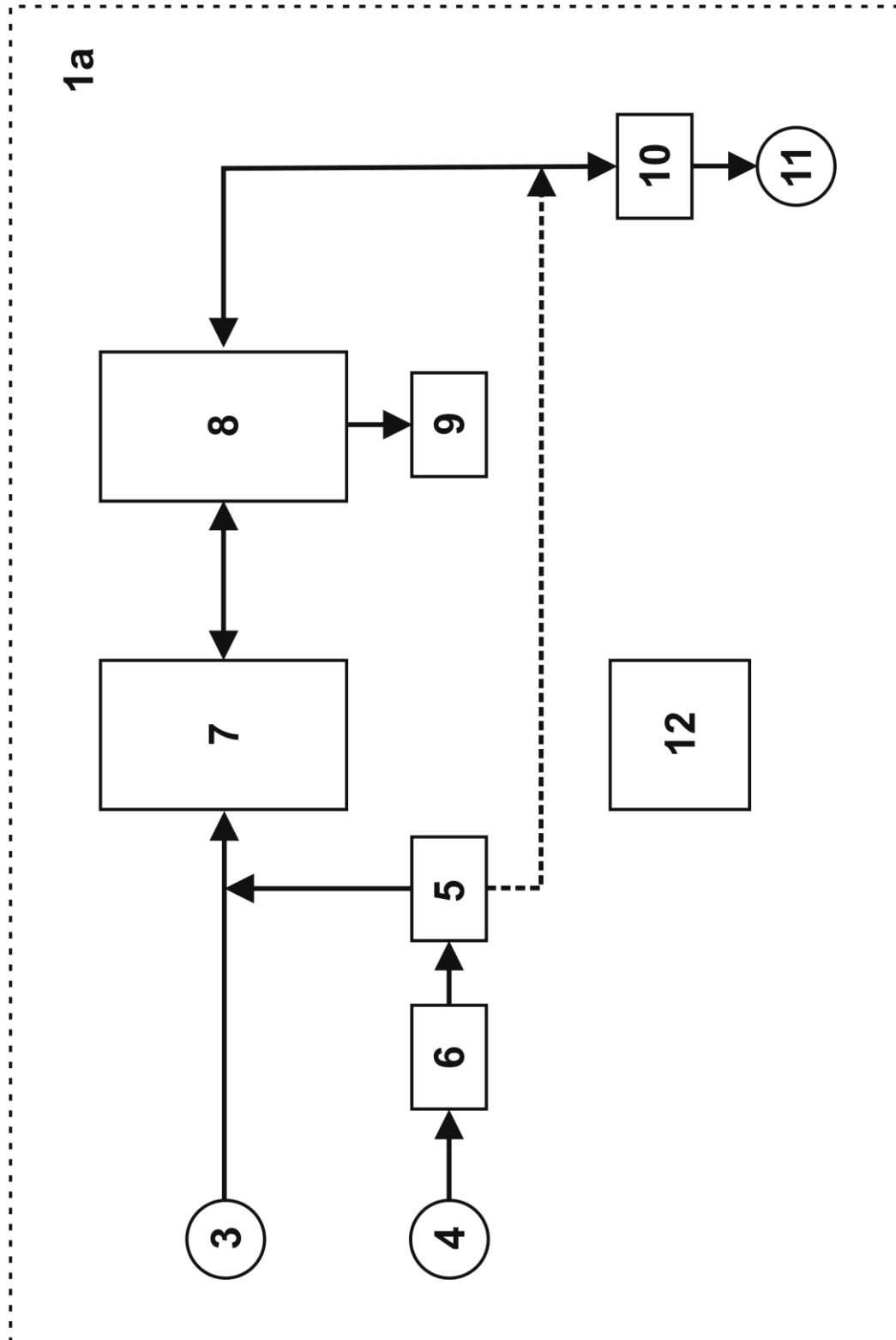


Fig. 2

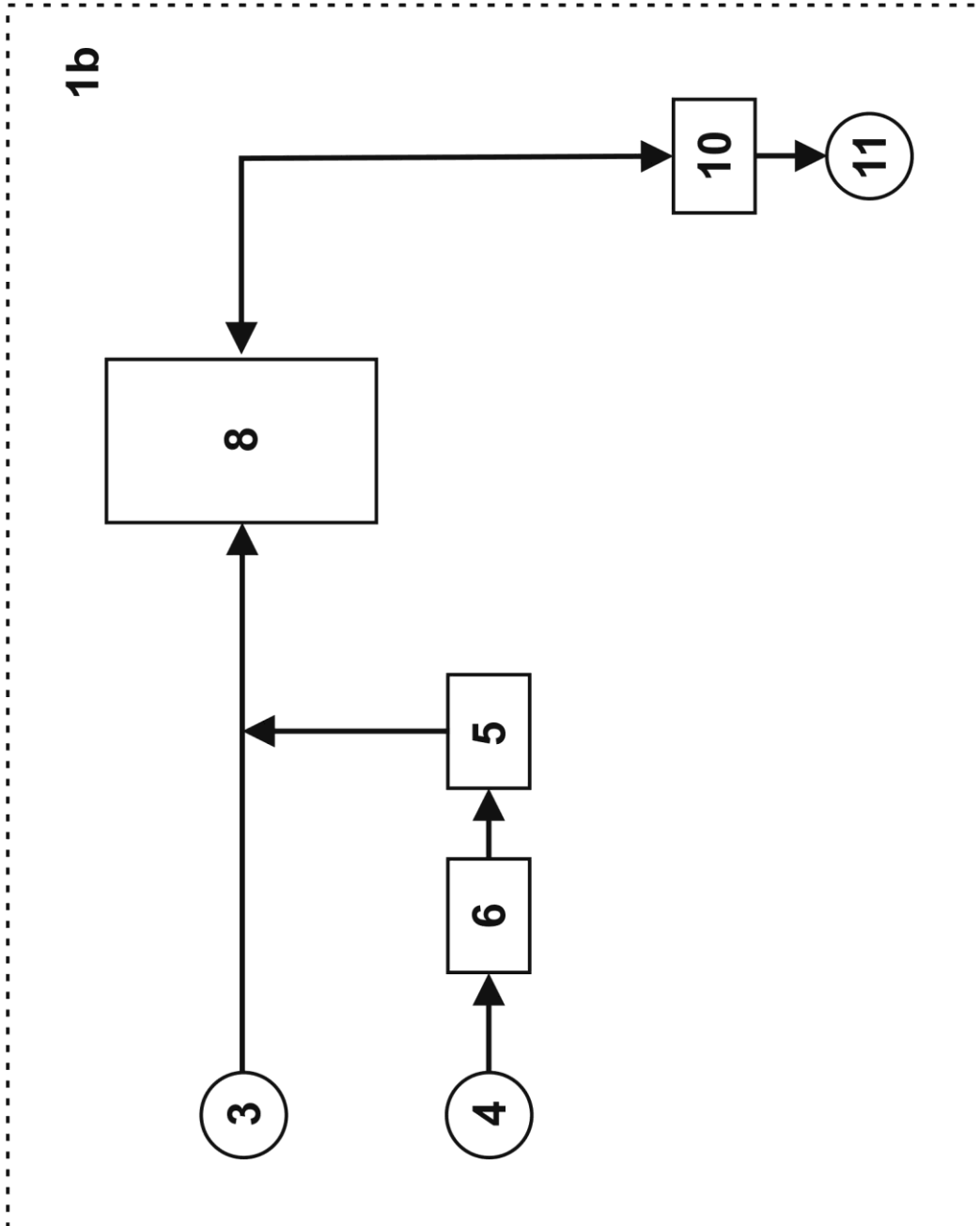


Fig. 3

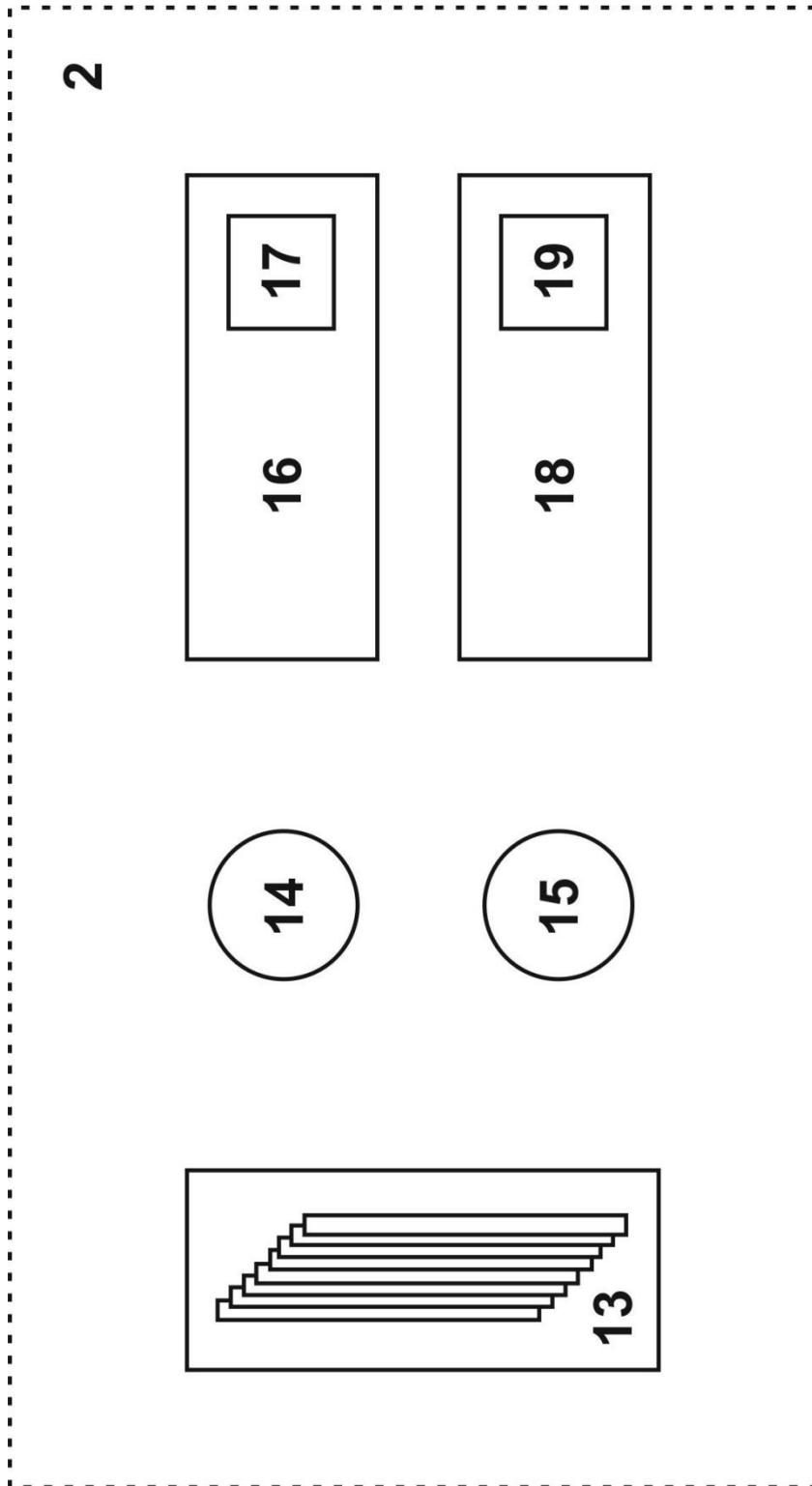


Fig. 4

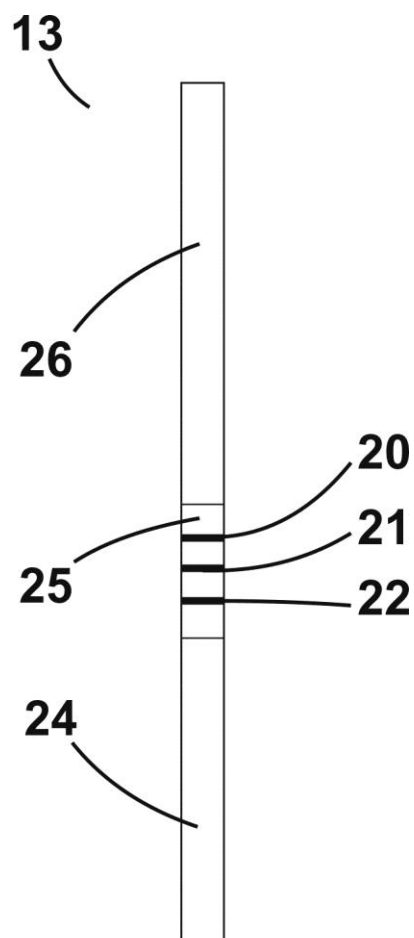


Fig. 5



- ②① N.º solicitud: 201730046
②② Fecha de presentación de la solicitud: 17.01.2017
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	WO 2011157584 A1 (NIEDERRHEIN HOCHSCHULE et al.) 22/12/2011, Figuras 1, 2; reivindicación 9.	1-15
Y	US 2006148068 A1 (NOURY JACQUES) 06/07/2006, figura2; página 2, columna derecha.	1-15
A	US 2010216225 A1 (DYER REX BRYAN et al.) 26/08/2010, Reivindicaciones.	1-15
A	DIETER M TOURLOUSSE et al. A polymer microfluidic chip for quantitative detection of multiple water- and foodborne pathogens using real-time fluorogenic loop-mediated isothermal amplification. Biomedical Microdevices, 20120508 Kluwer Academic Publishers, Bo 08/05/2012 VOL: 14 No: 4 Pags: 769 - 778 ISSN 1572-8781 Doi: doi: 10.1007/s10544-012-9658-3. resumen; figura 1.	1-15

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 nº:

Fecha de realización del informe
16.02.2017

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C02F1/00 (2006.01)**C12Q1/68** (2006.01)**C12M1/00** (2006.01)

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

C12Q, C02F, 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, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.02.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-15	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	WO 2011157584 A1 (NIEDERRHEIN HOCHSCHULE et al.)	22.12.2011
D02	US 2006148068 A1 (NOURY JACQUES)	06.07.2006
D03	US 2010216225 A1 (DYER REX BRYAN et al.)	26.08.2010
D04	DIETER M TOURLOUSSE et al. A polymer microfluidic chip for quantitative detection of multiple water-and foodborne pathogens using real-time fluorogenic loop-mediated isothermal amplification. Biomedical Microdevices, 20120508 Kluwer Academic Publishers, Bo 08/05/2012 VOL: 14 No: 4 Pags: 769 - 778 ISSN 1572-8781 Doi: doi:10.1007/s10544-012-9658-3. resumen; figura 1.	08.05.2012

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 reivindicación independiente 1, y sus dependientes 2-6, referidas a un equipo de detección de protozoos, y el procedimiento de detección de la reivindicación 7 y sus dependientes 8-15 cumplirían con el requisito de novedad, tal y como se menciona en el art.6 de la ley 11/1986, pero no con el de actividad inventiva, a la luz de los documentos del estado de la técnica citados a continuación.

D01 muestra un dispositivo para la detección de Legionella en aguas, que comprende una entrada para introducir un volumen de muestra en una celda de filtración, un dispositivo de filtración, un dispositivo para la separación de la Legionella ligada inmunomagnéticamente, y una zona de detección, para detectar la fluorescencia de Legionella marcada fluorescentemente (figuras 1, 2). Además divulga un método para la determinación cualitativa y / o cuantitativa de Legionelas en agua o soluciones acuosas, mediante la introducción de un volumen de muestra en una celda de filtración; eliminación de los microorganismos contenidos en el volumen de muestra definido por medio de ultrafiltración; transferencia de los microorganismos eliminados a una célula de separación; unión de forma selectiva e inmunomagnética de las Legionelas contenidas en los microorganismos eliminados; separación de las Legionelas ligadas inmunomagnéticamente; marcaje de las Legionelas ligadas con una etiqueta fluorescente; excitación de la fluorescencia de Legionelas marcada fluorescentemente con una fuente de excitación que tiene una longitud de onda de radiación de 340 nm a 520 nm; detección de determinación de la concentración de Legionelas en el volumen de muestra sobre la base de la fluorescencia medida.

D02 se refiere a un equipo autónomo y portátil para la detección de la presencia de un agente biológico, tal como bacterias, virus, protozoos o toxinas, en una muestra. Dicho equipo comprende, en un cuerpo común, un dispositivo de muestreo para recoger una muestra del medio, ya sea sólida, líquida o gaseosa, otros dispositivos para el cultivo biológico o amplificación de dicha muestra, dispositivos de detección que inducen una reacción, por ejemplo sobre una tira de reactivo impregnada, siendo dicha reacción colorimétrica y visible a simple vista a través de un ocular transparente, o detectable por un sistema independiente. El sistema detectaría enzimas, anticuerpos, proteínas, fragmentos celulares o secuencias de ADN / ARN, asociadas a un colorante. El soporte va impregnado con anticuerpos específicos. También puede incluir un sistema para almacenar el cultivo amplificado, para posterior análisis confirmatorio. La figura 1 muestra el detector biológico donde el medio de detección es una tira impregnada, y cuenta con un visor que permite que la reacción que tiene lugar en la tira sea vista. La reacción puede producirse en la tira mediante inmunoreacción. El equipo de detección se puede utilizar in situ, es fácil de usar (incluido el público en general), es seguro (completamente sellado una vez que se ha insertado la muestra) y produce resultados rápidamente.

D03 muestra un dispositivo portátil para detectar microorganismos en una muestra de alimento. El dispositivo comprende: un tubo de extracción de ADN de un eluido de la muestra, que tiene una cámara superior con un disco de picadura para triturar la muestra, y una cámara inferior con un material de unión configurado para unirse al ADN de la muestra. Dichas cámaras superior e inferior están separadas por un filtro para capturar material particulado de la muestra. Además comprende un chip configurado para retener el ADN, comprendiendo dicho chip una cámara de reacción dispuesta para la amplificación de ADN del eluido de la muestra mediante una reacción en cadena de la polimerasa; una unidad de control configurada para presurizar la muestra en dicho tubo de extracción de ADN para facilitar la extracción del eluido. En la cámara inferior se incluyen unas perlas de sílice como material de unión al ADN del eluido filtrado. En el chip se incluye una serie de microcanales en comunicación fluida con unas cámaras de reacción grabadas en el interior del chip. El eluido es canalizado a través de los microcanales a las cámaras de reacción donde tiene lugar una reacción en cadena de polimerasa (PCR). El chip está configurado para ser personalizado para la detección de diversos microorganismos.

D04 se refiere a un dispositivo económico, portátil y fácil de usar para la detección rápida de patógenos microbianos para garantizar la seguridad del agua y los alimentos. En este estudio, se desarrolló un chip microfluídico de polímero desechable para la detección cuantitativa de patógenos múltiples usando amplificación isotérmica de ácido nucleico. El chip contiene un conjunto de 15 pozos de reacción interconectados con cebadores deshidratados para amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), y requiere solamente una etapa de pipeteo única para dispensar la muestra. Para mejorar la robustez de la carga y la amplificación, las aberturas de aire hidrófobas y las microválvulas se integraron de forma monolítica en la estructura multicapa del chip utilizando un trazador de cuchillas de bajo coste. Para la cuantificación, LAMP se realizó con un colorante de unión al ADN altamente fluorescente (SYTO-82) y las reacciones se monitorizaron en tiempo real utilizando un sistema de imágenes de fluorescencia de bajo coste. A partir de mezclas de ADN genómico, el chip fue evaluado con éxito para un análisis rápido de múltiples virulencias y genes marcadores de *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella* y *Vibrio cholerae*, permitiendo la detección y cuantificación de 10-100 genomas por μ l en menos de 20 Min. El chip microfluídico, junto con el sistema de imágenes en tiempo real, se prevé como una tecnología clave para desarrollar sistemas económicos y portátiles para la detección in situ de múltiples patógenos relacionada con la inocuidad de los alimentos y el agua.

Dado que las reivindicaciones 1-6 definen el objeto de la invención como un equipo y un método de detección de microorganismos en agua mediante la combinación de unos elementos de distribución y filtrado del agua con unos elementos de detección inmunomagnética y cuantificación de la bacteria por medio de marcadores fluorescentes, tomando en consideración D01 como el documento del estado de la técnica más cercano al objeto de tales reivindicaciones, la diferencia entre ambos sería la detección de los productos de amplificación de ADN, y no de la bacteria entera, y sus posterior detección en una tira reactiva por medios colorimétricos. El problema técnico planteado sería la provisión de un equipo de detección de microorganismos por amplificación del ADN del mismo, y la solución sería la pluralidad de tiras reactivas sobre las que se dosifican unos anticuerpos de unión al ADN amplificado. Sin embargo, esta solución no puede considerarse inventiva puesto que para el experto en la materia sería obvia la sustitución de los elementos de detección inmunomagnéticos y cuantificación fluorimétrica, por elementos de amplificación del ADN y detección colorimétrica en una tira reactiva, combinando lo divulgado en D01 con la información que aporta el documento D02, consiguiendo el mismo efecto técnico del equipo objeto de la invención.

Así pues, las reivindicaciones 1-6, y el procedimiento desarrollado en las reivindicaciones 7-15 carecerían de actividad inventiva, según lo mencionado en el art. 8 de la ley 11/1986.