

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 439**

51 Int. Cl.:

**C12M 1/26** (2006.01)

**C12Q 1/24** (2006.01)

**C12M 1/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2013 PCT/EP2013/065451**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2014 WO14013089**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2013 E 13740270 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2875117**

54 Título: **Procedimiento de aislamiento de microorganismos en un medio de cultivo y dispositivo asociado**

30 Prioridad:

**20.07.2012 FR 1257047**

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

**19.07.2018**

73 Titular/es:

**BIOMERIEUX (100.0%)  
Chemin de l'Orme  
69280 Marcy-l'Étoile, FR**

72 Inventor/es:

**FLANDROIS, JEAN-PIERRE;  
LIMON, BERNARD;  
ROZAND, CHRISTINE y  
MONTET, MARIE-PIERRE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 676 439 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 de aislamiento de microorganismos en un medio de cultivo y dispositivo asociado.

5 La presente invención se refiere, de manera general, al campo del análisis microbiológico. Más particularmente, se refiere a un procedimiento de aislamiento de al menos un microorganismo procedente de una muestra contaminada.

10 El aislamiento de microorganismos sobre medio de cultivo gelificado, a partir de una muestra a analizar o de una suspensión de microorganismos, es una etapa frecuentemente indispensable para numerosos procedimientos de análisis microbiológico. Esta etapa se utiliza en particular para realizar identificaciones, verificar la pureza microbiana de una muestra o también efectuar un recuento bacteriano por conteo de las colonias aisladas así obtenidas.

15 Las técnicas de aislamiento tienen por objetivo obtener en la superficie de un medio nutritivo gelificado unas colonias directamente utilizables (CDU) para identificar y determinar la sensibilidad a los antibióticos. Son bien conocidas por el experto en la materia, siendo la técnica de las estrías la técnica de referencia. Esta última consiste en depositar el inóculo por fricción sobre una superficie con una probabilidad igual por unidad de superficie recorrida. La densidad local distribuida disminuye aproximadamente de manera exponencial durante el recorrido del instrumento. Así, se realizan varias zonas de dispersión a partir de un único inóculo, con o sin superposición de las zonas, a fin de obtener el efecto adecuado de distribución y un empobrecimiento en bacterias durante el segmento de dispersión subsiguiente. Al final de la dispersión, las células se aíslan suficientemente las unas de las otras para que los desarrollos microbianos en forma de CDU (colonias visibles o microcolonias) no se superpongan, ni siquiera parcialmente. Esta técnica puede también realizarse mediante una única inoculación continua en espiral mediante una placa giratoria o mediante una bola magnética impulsada por un dispositivo que produce una inoculación continua que no se superpone, o eventualmente que se superpone parcialmente.

25 Otra técnica ampliamente extendida consiste en el aislamiento en caja de medio gelificado por dispersión en la superficie. En este caso, una mezcla de células a una baja concentración que permite cultivar de 30 a 300 células se dispersa en la superficie del gel de una caja de Petri de 9 cm de diámetro, desarrollándose cada célula en una colonia aislada. Cuando se ponen en contacto menos de 30 células con el gel nutritivo, los problemas de estadísticas falsean la exactitud del recuento.

30 Cuando el recuento efectivo es superior a 300 células, aparecen unos errores de recuento debido a la superposición de las superficies de las colonias. La dispersión se realiza habitualmente por un instrumento que comprende, por ejemplo, una parte lineal que está en contacto con el gel o mediante uso de bolas de algunos milímetros de diámetro, que ruedan aleatoriamente sobre la superficie en un movimiento desordenado. Esta técnica es adecuada sólo para una muestra débilmente contaminada o diluida, ya que un número elevado de células aumenta la probabilidad de confluencia de las colonias resultantes del crecimiento.

35 Es asimismo posible efectuar un aislamiento sobre caja por inoculación en profundidad. La muestra inicial se diluye varias veces a fin de reducir suficientemente la población microbiana y obtener colonias separadas. Se mezclan entonces pequeños volúmenes de cada una de las muestras diluidas con un gel líquido, habitualmente gelosa mantenida en sobrefusión aproximadamente a 45°C. Las mezclas se vierten inmediatamente en cajas de cultivo estériles y, después de la gelificación y de la incubación, cada célula se inmoviliza y forma una colonia.

40 Algunos métodos manuales se han visto automatizados gracias al desarrollo de dispositivo. Es el caso, por ejemplo, del documento EP-0 242 114, que describe un aparato y un método de inoculación de un medio de cultivo con una muestra. El método consiste en realizar varios segmentos de dispersión a partir de un inóculo. Estos segmentos están en forma de arco de círculo y se realizan mediante cuatro cabezales de dispersión diferentes. Se obtiene un efecto de dilución de la muestra mediante superposición parcial de los segmentos subsiguientes. El método descrito en el documento es en realidad muy parecido al método de aislamiento manual de referencia.

45 Más recientemente, han aparecido nuevos métodos de aislamiento, permitiendo la mejora del agotamiento bacteriano mediante el uso de un aplicador optimizado, tal como se describe en el documento WO-A-2005071055. Es el caso en particular del método de inoculación utilizado en el mecanismo comercializado por la solicitante bajo la referencia PREVI<sup>TM</sup> Isola.

50 Sin embargo, estas técnicas de aislamiento son eficaces sólo en medios de cultivo gelificados.

55 En los campos del diagnóstico clínico y del control microbiológico industrial agroalimenticio, farmacéutico o cosmético, los medios de cultivo gelificados en caja de Petri, generalmente con agar, constituyen desde finales del siglo XIX una herramienta indispensable para la detección y para la identificación de los microorganismos patógenos.

60 No obstante, se ha desarrollado un gran número de productos para sustituir la caja de Petri. Para estos productos, la rehidratación se realiza *in situ*, es decir directamente en el espacio que sirve para la inoculación y a la incubación. Uno de ellos, el sistema petrifilm<sup>TM</sup>, que comprende unos nutrientes rehidratables, se utiliza muy ampliamente.

Otro sistema desarrollado por la compañía Nissui Pharmaceutical, el Compact Dry, consiste también en un medio deshidratado. El documento FR 2 182 073 describe un dispositivo que comprende una capa absorbente a la que se asocia una membrana microporosa por medio de una interfaz compuesta de la capa y de la membrana. Este dispositivo incorpora un medio nutritivo líquido que se deseca después. Estos medios de cultivo tienen la ventaja de conservarse más tiempo que un medio de cultivo de agar listo para el uso. Pueden también, como el petrifilm™, presentar un volumen reducido y así utilizar un pequeño espacio de incubación. La superficie disponible para el cultivo es limitada y los nutrientes disponibles por célula son de concentración adaptada para dar colonias de diámetro más pequeño que sobre el medio gelificado clásico, la forma de las colonias puede también modificarse debido a la baja solidez del gel utilizado o a los coeficientes elevados de difusión de las bacterias.

Sin embargo, el aislamiento de colonias sobre estos medios es posible sólo por inclusión en el gel formado durante la rehidratación, y por lo tanto a partir de una muestra inicial débilmente contaminada o que ha sufrido una serie de diluciones. La concentración final, a depositar sobre el medio, debe ser inferior a 300 cfu/ml (Unidad que Forma Colonia), estos datos clásicos dependen del tamaño de la colonia.

Además, estos medios no pueden sufrir la tensión mecánica de un medio de aislamiento por agotamiento sin deteriorarse. Así, una de las problemáticas principales de estos medios de cultivo rehidratables *in situ*, es decir directamente en el espacio que sirve para la inoculación y para la incubación, es que no son compatibles con el aislamiento mecánico manual o automatizado de microorganismos. Necesitan, cuando la muestra inicial está muy contaminada (más allá de 300 Unidades formadoras de Colonia/ml), la realización de una serie de diluciones, que implica una porción de prueba más grande, una pérdida de tiempo y el consumo de un número importante de reactivos (medio de cultivo, tubos de diluyentes, etc.), generador de un volumen elevado de desechos (autoclave, coste de tratamiento). Además, si se lleva a cabo un gran número de diluciones, existe un riesgo de pérdida, por el efecto de la dilución, el microorganismo patógeno diana, si éste está presente en pequeña cantidad con respecto a la microflora total.

Destaca del estado de la técnica considerado que no existe un método de aislamiento simple a utilizar de partir de una muestra a analizar o de una suspensión bacteriana, en un medio de cultivo rehidratable *in situ*, que permita obtener colonias aisladas.

Un primer objetivo de la presente invención es, por lo tanto, proporcionar un procedimiento de aislamiento de microorganismos y un dispositivo asociado más eficaces y más simples de realizar que los procedimientos y dispositivos de la técnica anterior.

Un segundo objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo y un procedimiento de aislamiento de microorganismos explotable en un medio de cultivo rehidratable, o rehidratado poco antes o simultáneamente al aislamiento microbiano, directamente en el espacio que sirve para la inoculación y para la incubación.

Un tercer objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento de aislamiento de microorganismos a partir de una muestra que tiene una concentración microbiana inicial elevada.

Un cuarto objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento de aislamiento compatible también con el recuento de los microorganismos.

Un quinto objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo y procedimiento de aislamiento compatible con la utilización de medios cromogénicos.

Estos objetivos, entre otros, se alcanzan por la presente invención, que propone un procedimiento de aislamiento de al menos un microorganismo procedente de una muestra susceptible de contaminarse por dicho microorganismo, que comprende las etapas siguientes:

(a) proporcionar un dispositivo para el aislamiento de microorganismos que comprende

\* una capa inferior impermeable al agua

\* una capa nutritiva, dispuesta sobre la capa inferior, que comprende un soporte que contiene un medio de cultivo deshidratado, obteniéndose dicha capa nutritiva por impregnación, preferentemente en seco, de dicho soporte por el medio de cultivo deshidratado, y después calandrado

\* una capa de aislamiento permeable a los elementos comprendida en la capa nutritiva, apta para retener las bacterias en su superficie y que recubre todo o parte de la capa nutritiva

\* una capa superior protectora

(b) depositar un volumen determinado de la muestra sobre la capa de aislamiento

(c) aislar los microorganismos por agotamiento o por cobertura de la muestra con la ayuda de un medio de aislamiento,

5 (d) incubar el dispositivo durante un tiempo y a una temperatura predeterminados que permita el crecimiento de los microorganismos

comprendiendo dicho procedimiento también al menos una etapa de rehidratación del medio de cultivo con un volumen de líquido predeterminado antes o simultáneamente a la etapa b) y/o c) y/o d), preferentemente antes o simultáneamente a la etapa b) y/o c).

10 Según un modo de realización preferido, el dispositivo mencionado en la etapa a) se obtiene mediante el procedimiento que comprende las etapas siguientes:

15 - verter dicho volumen de líquido predeterminado sobre la capa impermeable al agua,

- disponer la capa de aislamiento sobre la capa nutritiva, colocándose el conjunto sobre la capa impermeable al agua que ha recibido previamente dicho volumen de líquido predeterminado a fin de permitir la rehidratación instantánea y homogénea de dicho medio de cultivo deshidratado, y

20 - superponer después la capa superior protectora.

En otros términos, dicho dispositivo se obtiene ventajosamente por superposición sucesiva de las capas siguientes: 1) capa impermeable al agua (que ha recibido preferentemente dicho volumen de líquido predeterminado), 2) capa nutritiva, 3) capa de aislamiento y 4) capa superior protectora, siendo al menos las capas nutritivas 2) y de aislamiento 3) mecánicamente independientes la una de la otra, a fin de poder separarse fácilmente. Esto ofrece, en particular, la ventaja de poder comercializar y/o almacenar separadamente cada una de las dos capas antes mencionadas. Estas últimas se superpondrán después fácilmente por el usuario. Preferentemente, todas las capas son mecánicamente independientes las unas de las otras, a fin de poder separarse fácilmente las unas de las otras.

30 Por "capas mecánicamente independientes la una de la otra" (o "las unas de las otras"), se entienden unas capas no unidas entre sí por al menos un medio de unión, pudiendo dicho medio de unión ser en particular de naturaleza:

- física, como por ejemplo una o varias grapas, y

35 - química, tal como el pegamento, la fusión de todo o parte de las dos capas bajo la acción de un disolvente, para dar lugar a una capa compuesta/híbrida (también denominada "capa aglutinante"), o también un gel o un agente gelificante que se interpone al menos parcialmente entre dichas capas (es decir, al menos parcialmente en la interfaz entre dichas capas).

40 Además de la ventaja antes mencionada (comercialización y/o almacenamiento separado de las capas nutritiva y de aislamiento), la solicitante ha descubierto, de manera inesperada, que el hecho de prescindir de un medio de unión que forma la interfaz entre la capa nutritiva y la capa de aislamiento permite, reduciendo la distancia entre estas dos capas, obtener un mejor crecimiento y/o supervivencia de los de los microorganismos depositados sobre la capa de aislamiento. En efecto, tal medio de unión es de naturaleza tal que ralentiza el paso de los elementos nutritivos de la capa nutritiva rehidratada hacia los microorganismos presentes en la capa de aislamiento, reduciendo así el crecimiento y/o las posibilidades de supervivencia de estos microorganismos.

Se entiende por muestra, una pequeña parte o pequeña cantidad separada de una entidad por un activo sustractivo denominado habitualmente extracción, con fines de análisis.

50 La muestra puede ser de origen biológico, humano, animal, vegetal o medioambiental. Puede referirse a un producto en curso de proceso industrial o un producto final, por ejemplo alimenticio. Puede, por lo tanto, corresponder a una extracción de fluido biológico (sangre total, suero, plasma, orina, líquido céfalo-raquídeo, secreción orgánica), una extracción tisular o células aisladas. Puede ser de origen industrial, o bien según una lista no exhaustiva una extracción de aire, una extracción de agua, una extracción efectuada sobre una superficie, una pieza o un producto en curso de tratamiento o manufacturado, un producto de origen alimenticio. Entre las muestras de origen alimenticio, se pueden citar de manera no exhaustiva una muestra de productos lácteos (yogures, quesos, etc.), de carne, de pescado, de huevos, de frutas, de verduras, de agua, de bebida (leche, zumo de frutas, soda, etc.) y los productos constitutivos o anexos del producto terminado. Una muestra alimenticia puede finalmente proceder de una alimentación destinada a los animales, tal como en particular harinas animales. Esta extracción puede sufrir previamente a su análisis una preparación de tipo enriquecimiento, extracción, concentración, purificación, según unos métodos conocidos por el experto en la materia.

60 Según un modo de realización preferido, el volumen de muestra depositado sobre el medio de cultivo está comprendido entre 10 y 1000 µl.

65

En el sentido de la presente invención, el término microorganismo recubre las bacterias Gram positivas o Gram negativas, las levaduras, los mohos, las amebas y, más generalmente, los organismos unicelulares, invisibles a simple vista, que pueden manipularse y multiplicarse en laboratorio.

5 Según un modo preferido de realización de la invención, el microorganismo es una bacteria, gram negativa o positiva, o una levadura.

10 Como bacterias gram positivas, se pueden citar las bacterias de los géneros siguientes: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Clostridium*, *Mycobacteria*, *Nocardia*, *Corynebacteria*, *Micrococcus* y *Deinococcus*.

Como levaduras, se pueden citar las levaduras de los géneros siguientes: *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces* y *Trichosporon*.

15 Como mohos, se pueden citar los mohos de los géneros siguientes: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*.

La presente invención se refiere también a un dispositivo para el cultivo de microorganismos que comprenden:

20 \* una capa inferior impermeable al agua

\* una capa nutritiva, dispuesta sobre la capa inferior, que comprende un soporte que contiene un medio de cultivo deshidratado, obteniéndose dicha capa nutritiva por impregnación, preferentemente en seco, de dicho soporte por el medio de cultivo deshidratado, y después calandrado

25 \* una capa de aislamiento permeable a los elementos comprendidos en la capa nutritiva, apta para retener las bacterias en su superficie y que recubre todo o parte de la capa nutritiva

\* una capa superior protectora.

30 Preferentemente, la capa nutritiva y la capa de aislamiento son mecánicamente independientes la una de la otra, tal como se ha indicado anteriormente.

35 En el sentido de la presente invención, la capa nutritiva comprende un soporte que contiene un medio de cultivo deshidratado. El soporte puede ser a base de diversos compuestos absorbentes de poder de retención de agua muy fuerte tales como el rayón, el algodón, las fibras celulósicas naturales o modificadas químicamente como la carboxi-metilcelulosa, los polímeros químicos absorbentes o superabsorbentes tales como sales de poliacrilato, copolímero acrilato/acrilamida. Este soporte puede impregnarse de un medio de cultivo en forma líquida y después deshidratarse, es decir que tiene una Aw (Activity of wáter, actividad en agua) incompatible con el desarrollo microbiano. Alternativamente, se ha recubierto o impregnado en seco un medio de cultivo o sus constituyentes en forma de polvo. Alternativamente, la impregnación líquida puede, después de la deshidratación, complementarse por adición de polvo según los medios descritos anteriormente.

45 Se entiende por medio de cultivo, un medio que comprende todos los elementos necesarios para la supervivencia, y/o para el crecimiento de microorganismos. En la práctica, el experto en la materia seleccionará el medio de cultivo en función de los microorganismos diana, según unos criterios perfectamente conocidos y al alcance de este experto en la técnica.

50 La capa nutritiva según la invención puede contener eventuales aditivos como por ejemplo: peptonas, uno o varios factores de crecimiento, hidratos de carbono, uno o varios agentes selectivos, tampones, colorantes, uno o varios gelificantes, hidrogeles, agentes viscosos, etc.

55 Preferiblemente, el medio no contiene, o contiene pocos, agentes gelificantes en frío, tales como, por ejemplo, agar, agarosa, poloxámeros, goma guar, xantana, etc. De manera general, la capa nutritiva puede además contener un sustrato que permite la detección de una actividad enzimática o metabólica de los microorganismos diana gracias a una señal detectable directa o indirectamente. Para una detección directa, este sustrato puede unirse a una parte que actúa como marcador, fluorescente o cromógeno. Para una detección indirecta, la capa nutritiva según la invención puede comprender además un indicador de pH, sensible a la variación de pH inducida por el consumo del sustrato y que revela el crecimiento de los microorganismos dianas. Dicho indicador de pH puede ser un cromóforo o un fluoróforo. Se citarán como ejemplos de cromóforos el rojo neutro, el azul de anilina, el azul de bromocresol. Los fluoróforos comprenden por ejemplo la 4-metilumbelliferona, los derivados de hidroxycoumarino o los derivados de la resorufina. Así, el sustrato fluorescente de PC-PLC preferiblemente utilizado para la realización del procedimiento según la invención, corresponde al 4-metil-umbelliferil-colina fosfato (4 MU-CP).

65 Según la invención, después de la impregnación en seco de la capa nutritiva por el medio de cultivo deshidratado, ésta es objeto de una operación de calandrado. El calandrado, mediante la presión y la temperatura de calentamiento generadas, permite la retención y el mantenimiento estable en el tiempo del medio de cultivo

deshidratado en la capa nutritiva, asegurando la retención de los elementos nutritivos en la capa nutritiva. Permite también la obtención de una superficie rigurosamente lisa y plana de la capa nutritiva. Esto es particularmente ventajoso para asegurar una buena cohesión entre la capa nutritiva y la capa de aislamiento cuando esta última está dispuesta en la capa nutritiva. El calandrado permite, además de la aceleración de la rehidratación de la capa nutritiva con respecto a una capa nutritiva no calandrada, una compresión de las fibras que constituyen la capa nutritiva. Esta compresión, asociada a la presencia del medio deshidratado dentro de la capa nutritiva, genera un fuerte aumento del poder capilar de esta última, provocando su rehidratación casi instantáneamente y generando un fenómeno de aspiración de la capa de aislamiento dispuesta en su superficie. La capa de aislamiento se encuentra por lo tanto pegada contra la capa nutritiva (siendo al mismo tiempo mecánicamente independiente de esta última), asegurando así la ausencia de espacio entre las dos capas y, en consecuencia, un crecimiento y/o supervivencia microbiana óptimo(s) sobre toda la superficie de la capa de aislamiento. Por lo tanto, no es necesario recurrir a un medio de unión (por ejemplo, una capa aglutinante) entre la capa de aislamiento y la capa nutritiva. Esto representa una ventaja significativa, en la medida en la que tal medio de unión ralentiza el paso de los elementos nutritivos de la capa nutritiva rehidratada hacia los microorganismos presentes sobre la capa de aislamiento, reduciendo así el crecimiento y/o las probabilidades de supervivencia de estos microorganismos.

Tal como se ha indicado anteriormente, la posibilidad de separar la capa nutritiva y la capa de aislamiento, permitiendo así comercializar y/o almacenar las dos capas separadamente, representa una realidad más industrial. Tal efecto técnico permite, por lo tanto, además, considerar las capas nutritivas y de aislamiento independientemente la una de la otra, incluso desde un punto de vista comercial y/o logístico (almacenaje). Esto representa una ventaja significativa para el usuario, que dispone, en particular, de la posibilidad de combinar al final unas capas nutritivas y de aislamiento con unas propiedades diferentes y adecuadas para los microorganismos a resaltar.

Se entiende por capa de aislamiento, una capa cuyo principal constituyente es un material que, por su naturaleza, su tamaño, y su disposición estérica, retiene los microorganismos en su superficie siendo al mismo tiempo permeable a los elementos comprendidos en la capa nutritiva situada debajo de la capa de aislamiento.

La capa de aislamiento puede basarse en uno o varios materiales o derivarse de estos materiales tales como el látex, el politetrafluoroetileno, el fluoruro de poli(vinilideno), el policarbonato, el poliestireno, la poliácido, la polisulfona, la poliétersulfona, la celulosa, una mezcla de celulosas y nitrocelulosa. Ventajosamente, la capa de aislamiento es porosa, preferiblemente se trata de una membrana porosa permeable a los elementos comprendidos en la capa nutritiva, apta para retener los microorganismos en su superficie y que recubre todo o parte de la capa nutritiva. La solicitante ha descubierto que las membranas de microfiltración del agua (y de manera general de los líquidos) actualmente comercializadas, presentan generalmente las propiedades requeridas para utilizarse como capa de aislamiento. Permiten obtener una resistencia muy buena al desgarro durante la manipulación, una porosidad controlada, un carácter perfectamente liso, un grosor fino y la mayor parte del tiempo una fuerte hidrofilia. Su color, generalmente blanco, permite optimizar la diferenciación de colonias coloreadas sobre su superficie. La solicitante ha descubierto, de manera sorprendente, que la utilización de estas membranas de filtración, no es para una acción de filtración "tradicional" de líquidos (como se hace para el agua o de manera general para los líquidos) sino como soporte liso y resistente para efectuar el aislamiento de la muestra a ensayar, sobre su superficie era particularmente adecuada para la realización de la presente invención. La capacidad de filtración y la hidrofilia de la membrana de filtración, por su parte, se aprovechan para permitir y optimizar el paso de los líquidos nutritivos presentes en la capa nutritiva (después de su rehidratación) hacia la capa de aislamiento impidiendo al mismo tiempo la migración en sentido inverso de las bacterias, levaduras y mohos sembrados en la superficie de la capa de aislamiento.

Para los fines de la presente solicitud, dichas membranas de filtración se designan indiferentemente "membranas de filtración", "membranas de microfiltración" o también "membranas filtrantes", siendo estas expresiones sinónimas las unas de las otras. Estas membranas de filtración están comprendidas en el grupo constituido por las membranas porosas.

En un modo de realización de la invención, la capa de aislamiento es activa. Puede así contener sitios específicos receptores de las bacterias, tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, bacteriófagos o fragmentos de bacteriófagos, aptámeros o cualesquiera ligandos específicos que podrán fijarse de manera covalente o indirectamente por unos elementos bioquímicos afines de los cuales uno al menos está fijado de manera covalente como, por ejemplo, un sistema que utiliza estreptavidina y biotina.

Alternativamente, la capa de aislamiento es activa y contiene compuestos inhibidores o destructores de las bacterias tales como bacteriófagos, péptidos anti-bacterianos, antibióticos, que podrán fijarse o no en o sobre la capa de aislamiento. Los compuestos pueden fijarse de manera covalente o indirectamente por unos elementos bioquímicos afines. También, en otro modo de realización de la invención, la capa de aislamiento es activa conteniendo unos elementos que estimulan o aceleran el crecimiento de los microorganismos. A título de ejemplo, un agente viscoso tal como el polietilenglicol está dispuesto sobre la capa de aislamiento.

El aislamiento se puede efectuar sobre todo o parte de la capa de aislamiento, que define la superficie útil para el

aislamiento.

La capa de aislamiento está constituida de una superficie que permite el paso de los elementos del medio nutritivo y de los agentes selectivos o reactivos.

5 Ventajosamente, la capa de aislamiento comprende poros cuyo diámetro está comprendido entre 0,01 y 0,8  $\mu\text{M}$ , preferiblemente entre 0,2  $\mu\text{m}$  y 0,6  $\mu\text{m}$  a fin de retener las bacterias, levaduras y mohos sobre su superficie. Según un modo de realización particular, la capa de aislamiento comprende unos poros, cuyo diámetro está comprendido entre 0,25  $\mu\text{m}$  y 0,6  $\mu\text{m}$ , por ejemplo entre 0,3  $\mu\text{m}$  y 0,6  $\mu\text{m}$ , o también entre 0,4  $\mu\text{m}$  y 0,6  $\mu\text{m}$ .

10 Alternativamente, puede tratarse de una capa que no presenta poros medibles, como una membrana de diálisis, una membrana de celulosa permeable al agua y a los compuestos químicos y definida por su capacidad de retención de los compuestos de un tamaño molecular superior a un umbral. Ventajosamente, la membrana permitirá retener las moléculas químicas de un peso molecular superior a 500000 daltons (o comprendido entre 5000 y 500000 daltons).

15 De manera ventajosa, la capa de aislamiento comprende zonas confinadas que permiten facilitar el aislamiento de los microorganismos. Pueden también permitir disminuir el tiempo de crecimiento y por lo tanto obtener el resultado más rápidamente.

20 En un modo de realización, la capa de aislamiento posee unidades hidrófobas y/o hidrófilas que delimitan espacialmente el crecimiento de las bacterias. El tamaño de la unidad hidrófila está comprendido entre 10 y 500  $\mu\text{m}$ , preferiblemente entre 300 y 500  $\mu\text{m}$ , es decir un diámetro superior a la potencia de separación del ojo. Cuando se trata de la microbiología clásica y por lo tanto de una observación visual.

25 En otro modo de realización, la capa de aislamiento contiene unas unidades nanoestructuradas, incompatibles con el crecimiento microbiano, que delimita unas zonas confinadas que permiten el crecimiento del microorganismo.

30 Las unidades hidrófobas están dispuestas en forma de una unidad de superficies que es una cuadrícula regular o irregular, un ensamblaje de hexágonos regulares o irregulares o según una mezcla de los dos patrones, o eventualmente de otras formas.

Los materiales deseables para la realización de esta unidad hidrófoba incluyen la cera, tinta hidrófoba, resinas epoxi, aceite silicona, cera silicona, resina de poliestireno, óxido de alúmina, polifluoroetileno, etc.

35 La capa de aislamiento recubre todo o parte de la capa nutritiva. La capa de aislamiento está colocada sobre la capa nutritiva, recubriéndola en parte a fin de permitir la rehidratación del medio por un líquido. En un modo de realización preferido, la capa nutritiva puede estar recubierta totalmente por la capa de aislamiento.

40 El dispositivo puede contener al menos un medio de rehidratación en contacto con la capa nutritiva tal como un depósito anexo al dispositivo o incluido en este último y/o canales que permiten la rehidratación de la parte inferior o lateral de la capa nutritiva, preferentemente de la parte inferior de esta última.

45 La superficie útil para el aislamiento puede rodearse de una zona que no permite el desarrollo microbiano. Puede tratarse de una zona realizada de un material impermeable o de una zona hidrófoba. Ventajosamente, dicha zona puede estar estructurada para guiar la utilización manual.

50 Se entiende por medio de aislamiento, un medio que permite poner en contacto los microorganismos con el medio de cultivo desplazándose sobre este último a fin de depositar la muestra. La muestra se empobrece conforme a la fricción de la muestra y/o del medio de aislamiento sobre la capa de aislamiento, por lo tanto se depositan las células aisladas, lo que permite obtener, después del crecimiento, unas colonias aisladas.

55 El medio de aislamiento presenta una o varias superficies de contacto con dicho medio de cultivo. Tal medio puede utilizarse manualmente, por ejemplo por un asa, un asa de platino, una pipeta, una varilla esmerilada, una varilla que comprende una bola terminal, un escobillón. Puede tratarse también de bolas.

Ventajosamente, el procedimiento según la invención se puede realizar mediante un sistema automatizado. Un sistema particularmente adecuado es el sistema PREVI<sup>TM</sup> Isola tal como el protegido en la solicitud de patente WO-A-2005071055 y comercializado por la solicitante.

60 Según la invención, el medio de cultivo se rehidrata con un volumen de líquido predeterminado.

65 Un volumen apropiado de líquido se propaga en el medio de cultivo. En la práctica, el experto en la materia elegirá el volumen apropiado de líquido en función de la viscosidad del líquido, el diámetro de la capa nutritiva, y esto con el fin de rehidratar el medio y permitir el crecimiento de los microorganismos. La etapa de rehidratación tiene lugar antes o simultáneamente a la etapa b) y/o c) y/o d), preferentemente antes o simultáneamente a la etapa b) y/o c). En un modo de realización particular, el líquido se añade manualmente con la ayuda de una pipeta o automáticamente. En

otro modo, el líquido está contenido en al menos un depósito integrado al dispositivo y/o unos canales que permiten la rehidratación de la capa nutritiva. El líquido se extiende entonces en la capa nutritiva por simple presión del depósito. Una ventaja de una rehidratación por la parte inferior y/o lateral, preferentemente por la parte inferior, es que permite una hidratación homogénea de toda la capa nutritiva. Este modo de realización evita en particular a los nutrientes de la capa nutritiva ser arrastrados por el líquido en la parte inferior del dispositivo.

Según un modo de realización de la invención, el líquido utilizado para reconstituir el medio de cultivo es una solución acuosa. Según un modo de realización particular, el líquido contiene unas micropartículas con unas cubiertas lipídicas, preferiblemente el líquido contiene unos glóbulos rojos.

El líquido puede ser también un tampón o una solución que contiene unos complementos del medio de cultivo, tales como antibióticos o sustratos.

Según la invención, el dispositivo comprende a ambos lados de la capa nutritiva y de la capa de aislamiento una capa inferior impermeable al agua.

una capa superior protectora.

La capa superior puede ser translúcida o transparente, permitiendo la visibilidad de las colonias a través de esta capa. Preferiblemente, la capa superior protectora está separada de las colonias mediante un medio de separación. El medio de separación puede ser una pared lateral o cualquier otro medio que permita a la capa superior no estar en contacto con las colonias.

Ventajosamente, la capa superior podrá apoyarse sobre las partes de la capa de aislamiento que no permiten el desarrollo microbiano, como las zonas periféricas o las unidades hidrófobas.

La capa superior puede estar unida por uno de los lados a una de las otras capas del dispositivo mediante cualquier medio, a saber, por ejemplo, un medio adhesivo o mecánico.

Permite también evitar las contaminaciones durante la incubación. Es impermeable a las bacterias y limita la pérdida de vapor de agua. En efecto, el dispositivo se incuba durante un tiempo y a una temperatura predeterminados que permiten el crecimiento de los microorganismos independientemente de las condiciones de humedad ambiente. Así, la naturaleza de la capa superior se selecciona con el fin de permitir los intercambios gaseosos necesarios para el crecimiento de los microorganismos, permitiendo al mismo tiempo una hidratación local. La capa inferior es impermeable al agua. Preferentemente, esta capa inferior es rígida, permitiendo un mejor agarre con la mano del dispositivo. Está fabricada a partir de compuestos tales como el poliéster, polipropileno, poliestireno. Preferentemente, se fabrica a partir de celulosa. Puede tratarse de cartón o de papel asociado a una película impermeable al agua. Puede contener unos canales termoformados que servirán para la buena rehidratación de la capa nutritiva.

De manera ventajosa, las diferentes capas del dispositivo se fabrican a partir de materiales reciclables.

Según un modo de realización particular de la invención, la capa inferior y/o la capa nutritiva y/o la capa de aislamiento es translúcida o transparente.

Según un modo de realización particular de la invención, el dispositivo comprende también un código de identificación tal como los códigos de barras o las etiquetas RFID.

Un dispositivo según la invención puede ser de forma clásica, a saber de forma circular. No obstante, puede ser de forma diferente y, en particular, de forma cuadrada o rectangular. Según otra variante, las diferentes capas pueden ser de formas diferentes. Así, por ejemplo, las capas superior, inferior y nutritiva, pueden ser de forma cuadrada y la capa de aislamiento y/o la superficie útil para el aislamiento de forma circular. Las diferentes capas pueden ser de colores diferentes, favoreciendo la discriminación de las bacterias sospechosas.

La invención se refiere también a la utilización de un dispositivo según la invención.

La invención, su funcionalidad, sus aplicaciones, así como sus ventajas se comprenderán mejor a partir de la lectura de la presente descripción, realizada en referencia a las figuras, en las que:

- las figuras 1A y 1B son representaciones esquemáticas del dispositivo según la invención. El dispositivo 10 comprende una capa inferior impermeable al agua 14, una capa nutritiva 12, dispuesta sobre la capa inferior, que comprende un medio de cultivo deshidratado, una capa de aislamiento 20 permeable a los elementos comprendidos en la capa nutritiva, apta para retener las bacterias en su superficie y que recubre todo o parte de la capa nutritiva, una capa superior protectora 15. Este dispositivo comprende también unas zonas hidrófilas/hidrófobas 13, un depósito 19 y unos canales 18 que permiten la rehidratación de la parte inferior o lateral de la capa nutritiva.

El dispositivo puede tener unos medios de separación 16 que permiten a la capa superior 15 no estar en contacto con las colonias.

- 5 - la figura 2A es una fotografía del dispositivo según la invención, cuya superficie de aislamiento útil es de 25 cm<sup>2</sup>;
- la figura 2B representa una ampliación de la parte central del dispositivo. El dispositivo se ha sembrado mediante una muestra de *Escherichia coli* a una concentración de 10<sup>6</sup> UFC/ml.
- 10 - la figura 3 muestra el contenido de una caja de Petri sembrada con una cepa de *Klebsiella pneumoniae* en presencia de un medio de cultivo UriSelect™ 4 con una capa de aislamiento que consiste en una membrana filtrante de nitrato de celulosa Macherey Nagel, a título de ejemplo;
- 15 - la figura 4 muestra el contenido de una caja de Petri sembrada con una cepa de *Klebsiella pneumoniae* en presencia de un medio de cultivo UriSelect™ 4 con una capa de aislamiento que consiste en una membrana filtrante de nitrato de celulosa Sartorius, a título de ejemplo;
- 20 - la figura 5 muestra el contenido de una caja de Petri sembrada con una cepa de *Klebsiella pneumoniae* en presencia de un medio de cultivo UriSelect™ 4 con una capa de aislamiento que consiste en una membrana filtrante de acetato de celulosa, a título de ejemplo;
- la figura 6 muestra el contenido de una caja de Petri sembrada con una cepa de *Klebsiella pneumoniae* en presencia de un medio de cultivo UriSelect™ 4 con una capa de aislamiento que consiste en una membrana filtrante de poliéster;
- 25 - la figura 7 muestra el contenido de una caja de Petri sembrada con una cepa de *Escherichia coli* en presencia de un medio de cultivo UriSelect™ 4 con una capa de aislamiento que consiste en una membrana filtrante de nitrato de celulosa Macherey Nagel, a título de ejemplo;
- 30 - la figura 8 muestra el contenido de una caja de Petri sembrada con una cepa de *Escherichia coli* en presencia de un medio de cultivo UriSelect™ 4 con una capa de aislamiento que consiste en una membrana filtrante de poliéster, a título de ejemplo;
- la figura 9 muestra el contenido de una caja de Petri sembrada con una cepa de *Escherichia coli* en presencia de un medio de cultivo UriSelect™ 4 con una capa de aislamiento que consiste en una membrana filtrante de acetato de celulosa, a título de ejemplo;
- 35 - la figura 10 muestra el contenido de una caja de Petri sembrada con una cepa de *Escherichia coli* en presencia de un medio de cultivo UriSelect™ 4 con una capa de aislamiento que consiste en una membrana filtrante de poliéster, a título de ejemplo;
- 40 - la figura 11 muestra los contenidos de cuatro cajas de Petri en presencia de un medio de cultivo de agar UriSelect™ 4 y de un medio de cultivo impregnado UriSelect™ 4 deshidratado en una capa nutritiva que comprende un soporte no tejido de tipo Glatfleiter, Airlaid 150 g/m<sup>2</sup> en presencia de una muestra de una cepa de *Escherichia coli*, a título de ejemplo;
- 45 - la figura 12 muestra los contenidos de cuatro cajas de Petri en presencia de un medio de cultivo de agar UriSelect™ 4, de un medio de cultivo UriSelect™ 4 deshidratado impregnado en una capa nutritiva que comprende un soporte no tejido de tipo Glatfleiter, Airlaid 150 g/m<sup>2</sup> en presencia de una muestra de una cepa de *Escherichia cloacae*, a título de ejemplo;
- 50 - la figura 13 muestra los detalles de la figura 16, que representan dos contenidos de dos cajas de Petri, a título de ejemplo;
- 55 - la figura 14 muestra los contenidos de cuatro cajas de Petri en presencia de un medio de cultivo UriSelect™ 4 impregnado en una capa nutritiva que comprende un soporte no tejido de tipo Glatfleiter, Airlaid 150 g/m<sup>2</sup> en presencia de una capa de aislamiento tal como una membrana filtrante de acetato de celulosa y en presencia de una muestra de una cepa de *Clostridium Freundii*, a título de ejemplo;
- 60 - la figura 15 muestra el contenido de una caja de Petri que comprende una capa nutritiva que contiene un soporte no tejido impregnado con un medio de cultivo de agar de tipo Chrom ID CPS ID3 en presencia de una muestra de *Enterococcus faecalis*, a título de ejemplo;
- 65 - la figura 16 muestra el contenido de una caja de Petri que comprende una capa nutritiva que contiene un soporte no tejido de tipo Airlaid MH 100 137 impregnado de un medio d cultivo de tipo Chrom ID CPS3 deshidratado y sin agar;

- la figura 17 muestra el contenido de una caja de Petri en presencia de un medio de cultivo de tipo medio de agar Chrom ID CPS ID3 y de una capa nutritiva que comprende un soporte no tejido impregnado de un medio de tipo ChromID CPS3 deshidratado y sin agar en presencia de una capa de aislamiento tal como una membrana filtrante de poliéster y de una muestra de una cepa de *Enterobacter cloacae*, a título de ejemplo;

- la figura 18 muestra en detalle una capa nutritiva que comprende un soporte no tejido de tipo Airlaid MH 100 137 impregnado de un medio de cultivo de tipo Chrom ID CPS ID3 sin agar y en presencia de una capa de aislamiento tal como una membrana de poliéster;

- la figura 19 muestra otro ejemplo de soporte según la figura 18.

Ejemplos

Ejemplo 1: Obtención de colonias aisladas a partir de una solución altamente contaminada sobre un medio rehidratado Petrifilm (ejemplo ilustrativo)

A partir de una solución calibrada con una carga bacteriana teórica de  $10^8$  UFC/ml, 1000 µl de soluciones cargadas en *Escherichia coli* a diferentes concentraciones, obtenidas por diluciones sucesivas de un factor 10 se depositan en el centro de la película inferior del Petrifilm®. La película superior del Petrifilm® se baja sobre la muestra. Un difusor plástico, con la cara cóncava hacia abajo, se coloca en el centro del ensayo Petrifilm®. La muestra se reparte uniformemente ejerciendo una ligera presión en el centro del difusor de plástico. El inóculo se reparte así sobre la totalidad de la zona de crecimiento antes de que se forme el gel.

Tabla 1:

Dilución UFC/ml	$10^8$	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$	10
Colonias	≥300	≥300	≥300	≥300	≥300	≥300	78	7
	No contable							

Los resultados muestran que son necesarias seis diluciones a fin de obtener unas colonias aisladas y explotables.

Ejemplo 2: Obtención de colonias aisladas a partir de una solución altamente contaminada sobre medio rehidratado (ejemplo ilustrativo)

A partir de la misma solución calibrada con una carga bacteriana de  $10^8$  UFC/ml que ha servido para la inoculación del Petrifilm®, se realiza una inoculación mecánica mediante el método de los cuadrantes, sobre el dispositivo que permite obtener sobre una superficie limitada (25 cm<sup>2</sup>) del dispositivo unas colonias aisladas.

Así, el dispositivo se ha sembrado con 10 µl (contenido de un asa bacteriológica) de una solución calibrada con una carga bacteriana teórica de  $10^8$  UFC/ml cargada en *Escherichia coli* y depositada sobre el 1<sup>er</sup> cuadrante 21 de la superficie de aislamiento del dispositivo, cuya superficie de aislamiento útil es de 25 cm<sup>2</sup>. El segundo cuadrante 22 se siembra con un nuevo asa bacteriológica estirando varias estrías a partir del cuadrante 21. El tercer cuadrante 23 se siembra como el segundo sin cambiar de asa bacteriológica. El 4<sup>o</sup> cuadrante 24 se siembra con estrías no estiradas a partir del cuadrante 22.

El dispositivo está formado por una capa de aislamiento con unas unidades hidrófobas/hidrófilas 28 sobre la cual se realiza el aislamiento. Las unidades hidrófobas/hidrófilas permiten mejorar el aislamiento, en particular sobre una pequeña superficie (25 cm<sup>2</sup>) delimitando espacialmente el crecimiento de los microorganismos.

Una capa que contiene el medio de cultivo rehidratado 25. Una capa inferior impermeable al agua 26 y una capa superior translúcida que cierra el dispositivo 27.

Las figuras 2a y 2b muestran que el aislamiento mecánico sobre el dispositivo permite la formación de colonias aisladas. El aislamiento es así posible gracias a la utilización de un único dispositivo sin dilución previa.

Ejemplo 3: Obtención de colonias aisladas sobre una capa de aislamiento de tipo membrana filtrante, dispuesta sobre una capa nutritiva constituida por un soporte no tejido impregnado por un medio nutritivo deshidratado.

El objetivo de este ejemplo es comparar los morfotipos y el tiempo de crecimiento de colonias que se desarrollan sobre una membrana porosa y/o filtrante (preferentemente filtrante) colocada sobre un medio de cultivo de agar o sobre una capa nutritiva impregnada de medio de cultivo deshidratado.

El tamaño y el color de las colonias procedentes de diferentes especies bacterianas sembradas sobre estas membranas porosas y/o filtrantes se evalúan por el operario.

### 3.1 Material

Los experimentos descritos a continuación se refieren en particular a unas cepas de *Escherichia coli*, de *Clostridium freundii*, *Enterococcus faecalis*, de *Klebsiella pneumoniae*, y de *Enterobacter cloacae*.

Las capas de aislamiento ensayadas para el presente ejemplo comprenden:

- una membrana filtrante de poliéster (Macherey Nagel Polyester) que comprende unos poros de diámetro 0,2 µm, 0,4 µm, 1 µm y 5 µm (referencia comercial: PORAFIL® PE),

- una membrana filtrante de nitrato de celulosa (Macherey Nagel Polyester) que comprende unos poros de diámetro 0,2 µm, 0,4 µm, 1 µm y 5 µm (referencia comercial: PORAFIL® NC),

- una membrana filtrante de acetato de celulosa (Macherey Nagel Polyester) que comprende unos poros de diámetro 0,2 µm, 0,4 µm, 1 µm y 5 µm (referencia comercial: PORAFIL® CA),

- una membrana filtrante de ésteres mixtos de celulosa ("cellulose mixed esters" en inglés; Macherey Nagel Polyester) que comprende unos poros de diámetro 0,2 µm, 0,4 µm, 1 µm y 5 µm (referencia comercial: PORAFIL® CM),

- una membrana filtrante de nitrato de celulosa (Sartorius stedim Biotech) que comprende unos poros de diámetro 0,45 µm.

Para los fines de los presentes experimentos, se utilizan los soportes no tejidos siguientes:

- Glatfelter, Airlaid 100g/m<sup>2</sup>,

- Glatfelter, Airlaid concert 150g/m<sup>2</sup>,

- unos soportes PDI 60g/m<sup>2</sup>.

Los medios de cultivo utilizados para impregnar el soporte no tejido en los presentes experimentos son: un caldo de soja triptico (TSB-D), un medio de cultivo de tipo UriSelect® 4 (referencia comercial: Bio Rad), o un medio de cultivo de tipo Chrom ID CPS 3 sin agar.

Los medios de cultivo con agar utilizados durante los presentes experimentos son los siguientes: UriSelect®4 (referencia comercial Bio Rad) y Chrom ID CPS 3.

### 3.2 Protocolo experimental

En primer lugar, las diferentes membranas filtrantes se ensayan sobre un medio on agar de tipo UriSelect® 4 (véase la sección 3.3.1 anterior).

En segundo lugar, el medio de cultivo con agar UriSelect® 4 se sustituye por los diferentes soportes no tejidos impregnados de un medio de cultivo anteriormente citado (véase la sección 3.3.2 anterior).

Los soportes no tejidos e impregnados del medio de cultivo se rehidratan con un volumen de agua estéril predeterminado y de un inóculo bacteriano en el momento de realizar el análisis. El volumen/la cantidad de agua estéril necesaria para la rehidratación del soporte no tejido e impregnado del medio de cultivo varía en función de la naturaleza del soporte no tejido y de la dimensión de este. Este dato es fácilmente determinable por el experto en la materia mediante sus conocimientos generales y, si fuese necesario, de ensayos de rutina.

La incubación del conjunto membrana filtrante y soporte no tejido impregnado o membrana filtrante y medio con agar, se efectúa a una temperatura de 37°C. La lectura visual de los resultados que permite la determinación del morfotipo de las colonias y la calidad del aislamiento en la superficie de la membrana porosa y/o filtrante se realiza, en primer lugar, después de una duración de incubación de 24h y después, en segundo lugar, después de una duración total de incubación de 48h.

### 3.3 Resultados

3.3.1 Aislamiento de diferentes microorganismos sobre diferentes tipos de membranas filtrantes, en presencia de un medio de cultivo con agar

Las figuras 3, 4, 5 y 6 muestran el aislamiento de una cepa de *Klebsiella pneumoniae* en presencia de un medio de cultivo con agar UriSelect™ 4, después de una duración de incubación de 24h.

Más precisamente, la membrana filtrante de la figura 3 es de nitrato de celulosa (Macherey Nagel).

La membrana filtrante de la figura 4 es de nitrato de celulosa Sartorius (Sartorius).

5 La membrana filtrante de la figura 5 es de acetato de celulosa.

La membrana filtrante de la figura 6 es de poliéster.

En estas figuras 3, 4, 5 y 6, se señala la presencia de colonias directamente utilizables (CDU) bien individualizadas.

10 Las figuras 7, 8, 9 y 10 muestran la presencia de *Escherichia coli* en presencia de un medio de cultivo con agar UriSelect™ 4, después de una duración de incubación de 24h.

Más precisamente, la membrana filtrante de la figura 7 es de nitrato de celulosa Macherey Nagel.

15 La membrana filtrante de la figura 8 es de poliéster.

La membrana filtrante de la figura 9 es de acetato de celulosa.

20 La membrana filtrante de la figura 10 es de poliéster.

En estas figuras 7, 8, 9 y 10, se señala la presencia de colonias directamente utilizables (CDU) bien individualizadas. El crecimiento bacteriano es óptimo, los morfotipos y el crecimiento de las colonias obtenidas son conformes a lo que se espera de un crecimiento microbiano directamente sobre medio con agar. El aislamiento realizado sobre una membrana porosa y/o filtrante lleva a unos morfotipos de colonias y a una calidad de aislamiento clásicamente obtenidos con un aislamiento realizado directamente sobre medio con agar.

3.3.2 Aislamiento y enumeración/recuento de microorganismos sobre unas membranas filtrantes depositadas sobre unos soportes no tejidos impregnados de un medio de cultivo deshidratado.

30 El presente experimento pone en presencia un soporte no tejido impregnado de un medio de cultivo deshidratado. Durante la realización del análisis, el soporte no tejido se impregna de agua a fin de rehidratar el medio de cultivo.

35 Como se muestra en la figura 11, el soporte de impregnación utilizado es de tipo Glatfeler, Airlaid 150g/m<sup>2</sup>. Este último está impregnado con un medio de cultivo UriSelect™ 4 deshidratado.

Los contenidos de las cajas de Petri mostrados en la figura 11 ponen en evidencia el crecimiento de las bacterias *Escherichia coli* y la presencia de colonias directamente utilizables (CDU) bien individualizadas.

40 La figura 12 muestra unos resultados similares en presencia de bacterias *Enterobacter cloacae*.

La figura 13 muestra unos resultados similares a los de las figuras 11 y 12, en presencia de un medio con agar de tipo UriSelect™ 4.

45 Unos resultados similares son también visibles sobre los contenidos de las cajas de Petri mostrados en la figura 14 en presencia de un medio de cultivo UriSelect™ 4 impregnado en seco en un soporte no tejido de tipo Glatfeler, Airlaid 150 g/m<sup>2</sup> en presencia de una membrana filtrante de acetato de celulosa.

3.3.3 Impregnación con un medio de cultivo de tipo Chrom ID CPS ID3 deshidratado

50 El presente experimento se refiere a una muestra de *Enterococcus faecalis* en presencia de un medio de cultivo con agar Chrom ID CPS ID3 (véase la figura 15) y de un medio deshidratado Chrom ID CPS3 sin agar impregnado en el soporte no tejido en presencia de una membrana filtrante de poliéster (véase la figura 16).

55 Otro experimento se refiere a una muestra de *Enterobacter cloacae* en presencia de un medio de cultivo con agar de tipo Chrom ID CPS ID3 y de un medio de cultivo impregnado de tipo Chrom ID CPS3 deshidratado y sin agar en presencia de una membrana filtrante de poliéster (véase la figura 17). En esta figura 17, se señala la presencia de colonias directamente utilizables (CDU) bien individualizadas.

60 Las figuras 18 y 19 muestran los resultados de un experimento que pone en presencia un medio de cultivo Chrom ID CPS ID3 sin agar impregnado sobre un soporte no tejido Airlaid MH 100 137 en presencia de una membrana filtrante de poliéster.

65 Como se muestra en las figuras 18 y 19, se señala la presencia de colonias directamente utilizables (CDU) bien individualizadas. Aunque el aislamiento se ha efectuado sobre membranas filtrantes colocadas sobre unos medios de cultivo deshidratado, y no sobre medios con agar, esto no ha afectado el crecimiento bacteriano, el cual se

mostró óptimo. Por otro lado, los morfotipos de las colonias obtenidas son similares a los obtenidos con aislamiento sobre membranas porosas y/o filtrantes posicionadas sobre medio con agar.

### 3.4 Conclusión

5 Los resultados de los experimentos relativos al ejemplo 3 indican que es posible realizar aislamientos de microorganismos sobre una capa de aislamiento de tipo membrana filtrante. Se señala que estas membranas filtrantes no se utilizan para la acción de filtración de líquido, que es su objetivo principal, sino para realizar el  
10 aislamiento de una muestra que puede estar cargada extremadamente de microorganismos, lo que exige de ellas las mismas cualidades de superficie que las que se obtienen sobre los medios con agar. Por otro lado, el aislamiento no ha generado deformaciones de la membrana filtrante, permaneciendo esta última como pegada a la capa nutritiva (soporte nutritivo) subyacente sin que sea necesaria ninguna unión física o química entre la membrana filtrante y la capa nutritiva. Esta intimidad de la membrana filtrante con la capa nutritiva después del aislamiento se verifica cuando se examina la integridad y la continuidad de la línea de aislamiento a través de la disposición de las colonias bacterianas.  
15

Además de la compatibilidad de las membranas porosas y/o filtrantes con el acto de aislamiento microbiano, la solicitante ha demostrado que la superposición de la capa de aislamiento de tipo membrana filtrante y de la capa nutritiva de tipo soporte no tejido impregnado del medio de cultivo deshidratado permite el crecimiento óptimo de los microorganismos sobre la capa de aislamiento como lo muestran los morfotipos de las colonias bacterianas obtenidos.  
20

Parece también que el soporte no tejido impregnado de un medio de cultivo deshidratado representa una alternativa válida a la puesta en cultivo de los microorganismos en presencia de un medio de cultivo con agar que contiene agar. En efecto, la capa nutritiva permite intercambios nutricionales con los microorganismos localizados sobre la capa de aislamiento a fin de permitir un crecimiento microbiano de calidad. Así, la presencia de una capa de aislamiento dispuesta por encima de una capa nutritiva impregnada de un medio de cultivo deshidratado permite obtener colonias aisladas de microorganismos en la superficie de la capa de aislamiento. La porosidad de la membrana de filtración permite la retención de los microorganismos en su superficie y la transferencia de los nutrientes solubilizados presentes en el soporte nutritivo de la superficie de la membrana de filtración. El ejemplo 3 demuestra bien que tales transferencias son óptimas ya que no se ha observado ningún retraso de crecimiento sugerido, en particular por un tamaño disminuido de las colonias. Se señala de nuevo que esta transferencia es óptima en ausencia de medio de unión o aglutinante entre la membrana de filtración y la capa nutritiva.  
25  
30

De manera general, los intercambios de nutrientes y de agua entre la capa nutritiva y la membrana filtrante permiten un crecimiento microbiano óptimo. El medio de cultivo impregnado es rehidratable o puede ser rehidratado poco tiempo antes o simultáneamente al aislamiento microbiano.  
35

El ejemplo 3 demuestra en particular que el dispositivo objeto de la invención es compatible con el aislamiento y el crecimiento microbiano.  
40

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de aislamiento de al menos un microorganismo procedente de una muestra susceptible de contaminarse por dicho microorganismo que comprende las etapas siguientes:
- 5 (a) proporcionar un dispositivo para el aislamiento de microorganismos que comprende
- \* una capa inferior impermeable al agua
  - 10 \* una capa nutritiva, dispuesta sobre la capa inferior, que comprende un soporte que contiene un medio de cultivo deshidratado, obteniéndose dicha capa nutritiva por impregnación, preferentemente en seco, de dicho soporte por el medio de cultivo deshidratado, y después calandrado
  - 15 \* una capa de aislamiento permeable a los elementos comprendida en la capa nutritiva, apta para retener las bacterias en su superficie y que recubre todo o parte de la capa nutritiva
  - \* una capa superior protectora
- 20 (b) depositar un volumen determinado de la muestra sobre la capa de aislamiento
- (c) aislar los microorganismos por agotamiento o por cobertura de la muestra con la ayuda de un medio de aislamiento
- (d) incubar el dispositivo durante un tiempo y a una temperatura predeterminados que permite el crecimiento de los
- 25 microorganismos
- comprendiendo dicho procedimiento también al menos una etapa de rehidratación del medio de cultivo con un volumen de líquido predeterminado antes o simultáneamente a la etapa b) y/o c) y/o d), preferentemente antes o
- 30 simultáneamente a la etapa b) y/o c).
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la capa de aislamiento posee unas unidades hidrófilas y/o hidrófobas.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que el dispositivo comprende también un código de
- 35 identificación tales como los códigos de barras o las etiquetas RFID.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el líquido utilizado para rehidratar el medio de cultivo es una solución acuosa y/o un líquido que contiene micropartículas con unas cubiertas lipídicas.
- 40 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que al menos la capa nutritiva y la capa de aislamiento no están unidas entre sí dentro de dicho dispositivo.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho soporte es un soporte no tejido.
- 45 7. Dispositivo para el cultivo de microorganismos que comprende:
- \* una capa inferior impermeable al agua
  - \* una capa nutritiva, dispuesta sobre la capa inferior, que comprende un soporte que contiene un medio de cultivo
  - 50 deshidratado, obteniéndose dicha capa nutritiva por impregnación, preferentemente en seco, de dicho soporte por el medio de cultivo deshidratado, y después calandrado
  - \* una capa de aislamiento permeable a los elementos comprendidos en la capa nutritiva, apta para retener las bacterias en su superficie y que recubre todo o parte de la capa nutritiva
  - 55 \* una capa superior protectora,
- en el que al menos la capa nutritiva y la capa de aislamiento son mecánicamente independientes la una de la otra.
- 60 8. Dispositivo según la reivindicación 7, comprendiendo dicho dispositivo al menos un depósito integrado en el dispositivo y/o unos canales que permiten la rehidratación de la capa nutritiva.
9. Dispositivo según la reivindicación 7 u 8, en el que la capa de aislamiento es una membrana porosa, preferentemente una membrana de microfiltración de un líquido.
- 65 10. Dispositivo según una de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la capa de aislamiento contiene unas unidades

hidrófobas y/o hidrófilas.

11. Dispositivo según una de las reivindicaciones 7 a 10, siendo dicho soporte un soporte no tejido.

5 12. Utilización de un dispositivo según una de las reivindicaciones 7 a 11 para aislar al menos un microorganismo.

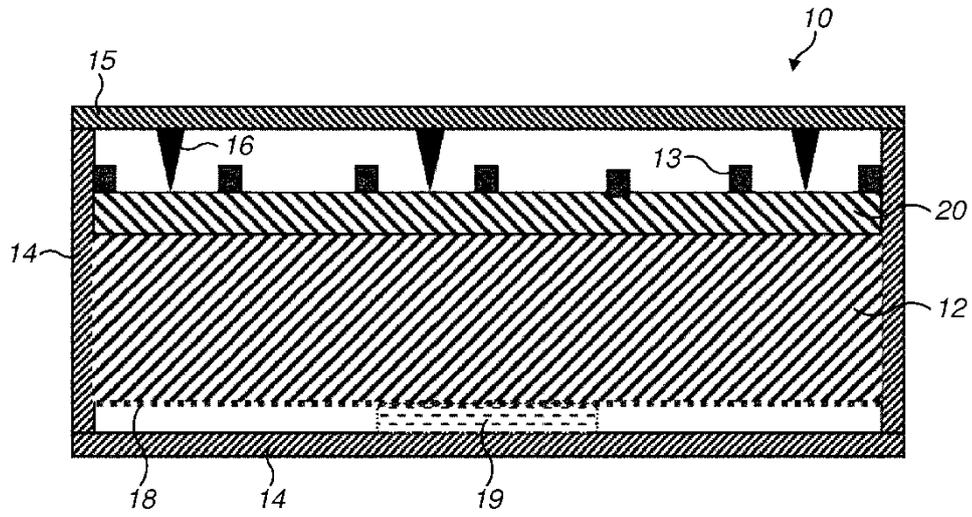


FIG. 1A

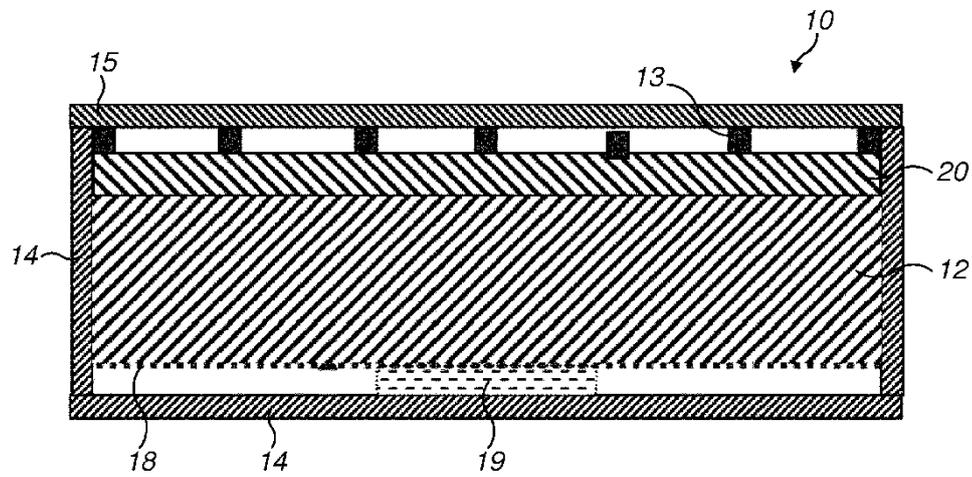


FIG. 1B

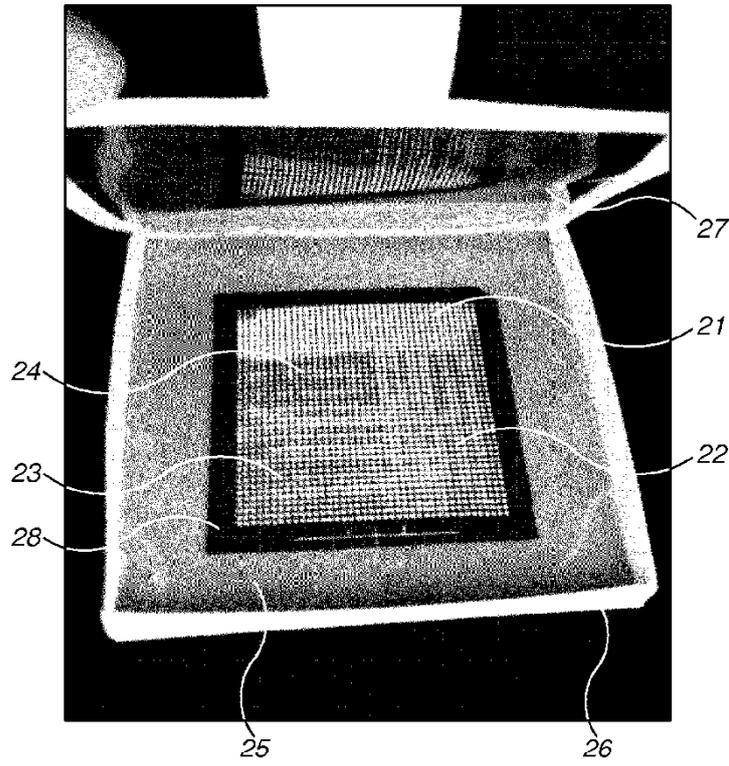


FIG. 2A

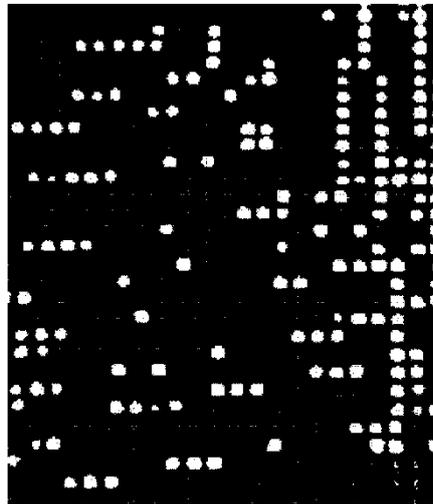
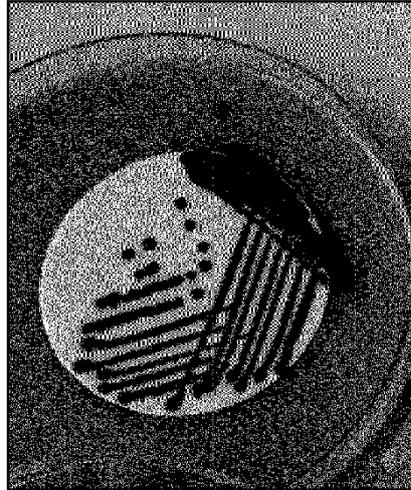
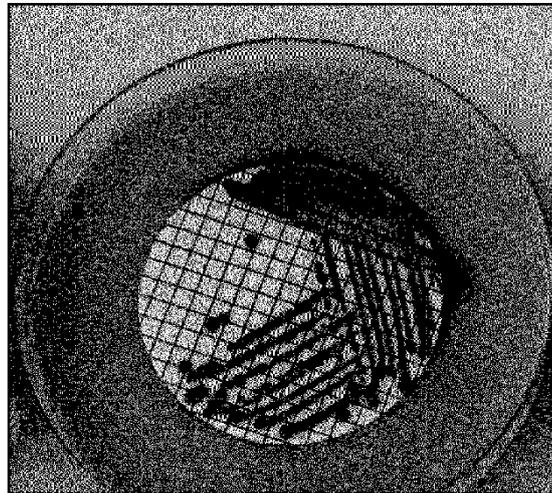


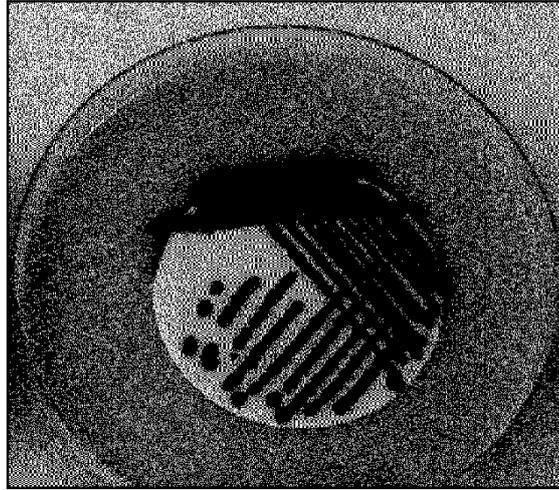
FIG. 2B



*FIG. 3*



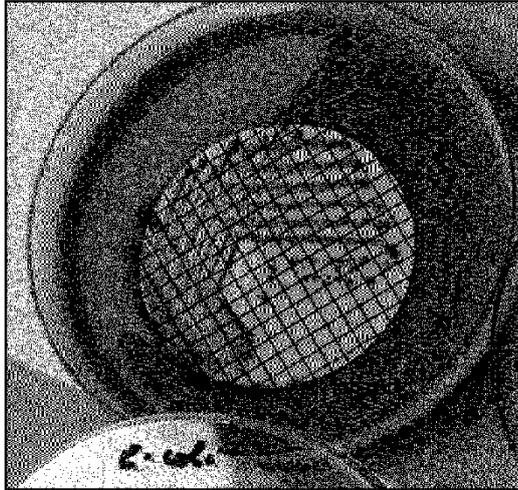
*FIG. 4*



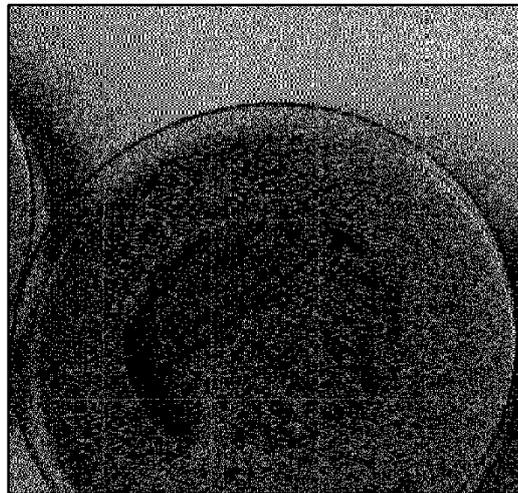
*FIG. 5*



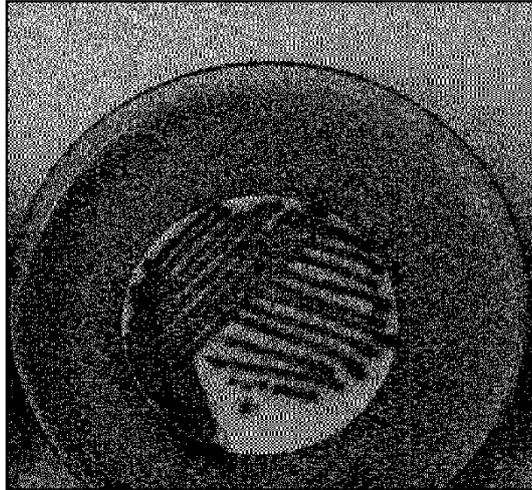
*FIG. 6*



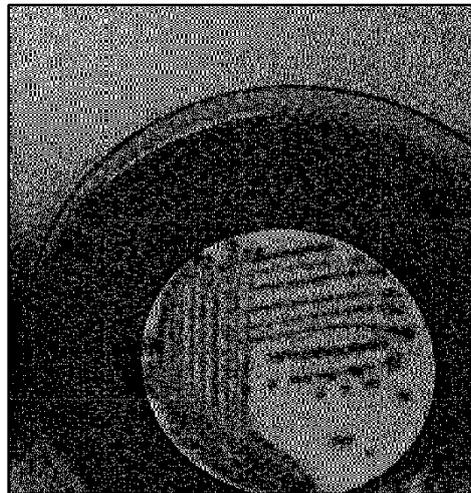
*FIG. 7*



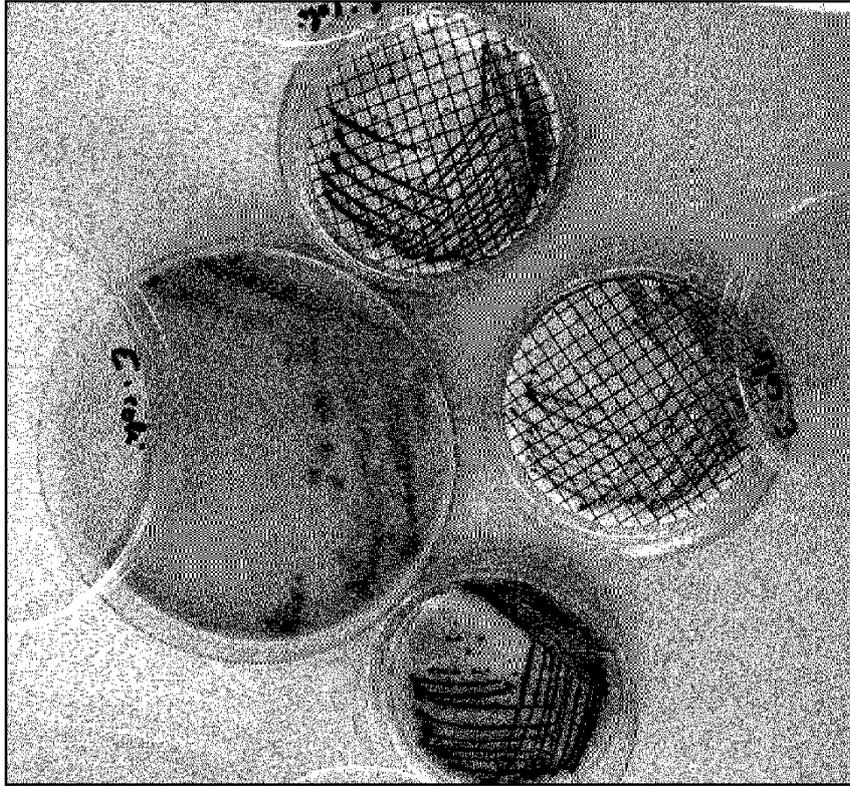
*FIG. 8*



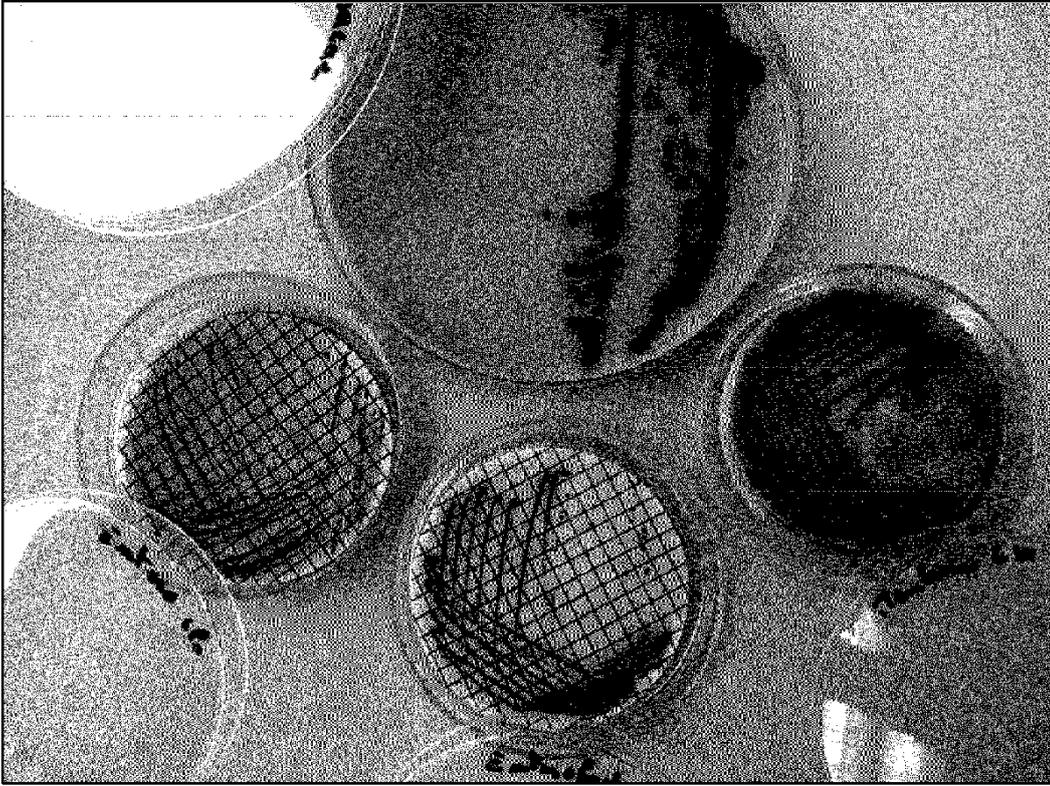
*FIG. 9*



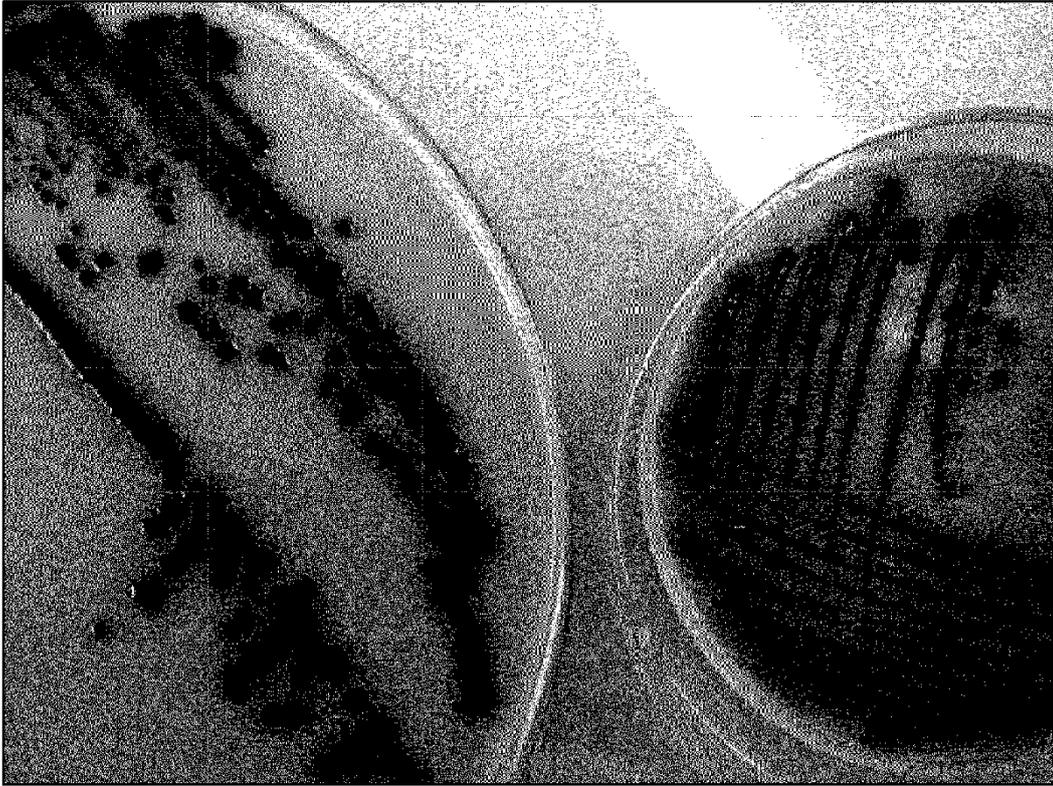
*FIG. 10*



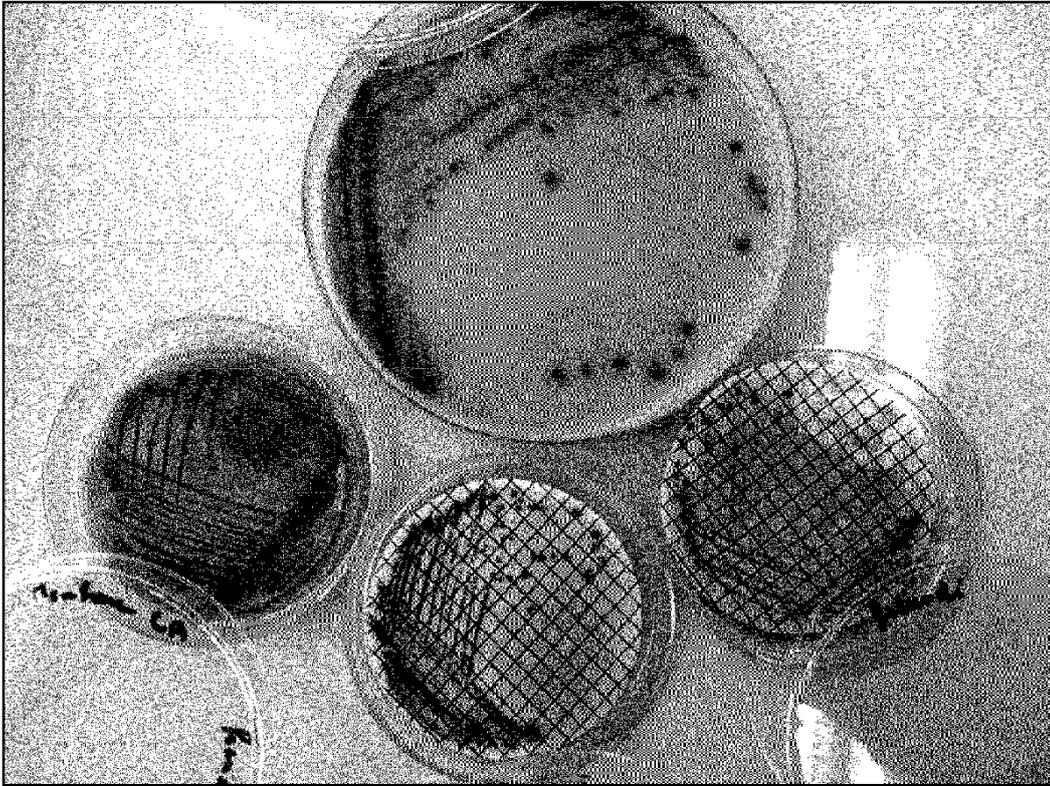
*FIG. 11*



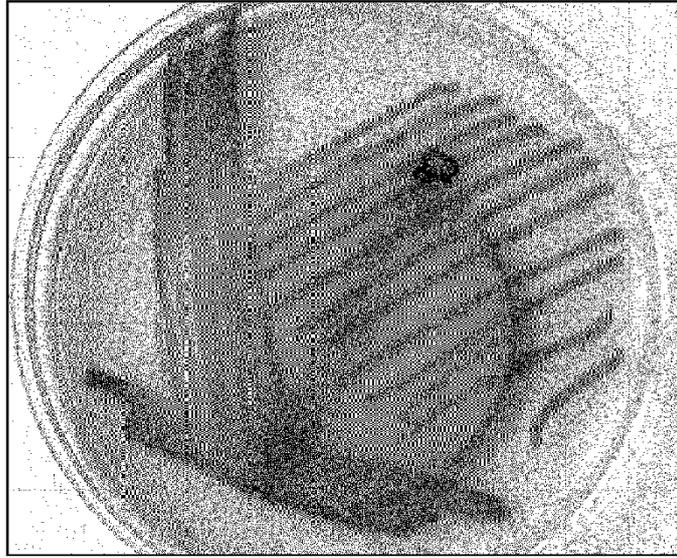
*FIG. 12*



*FIG. 13*



*FIG. 14*



*FIG. 15*



*FIG. 16*

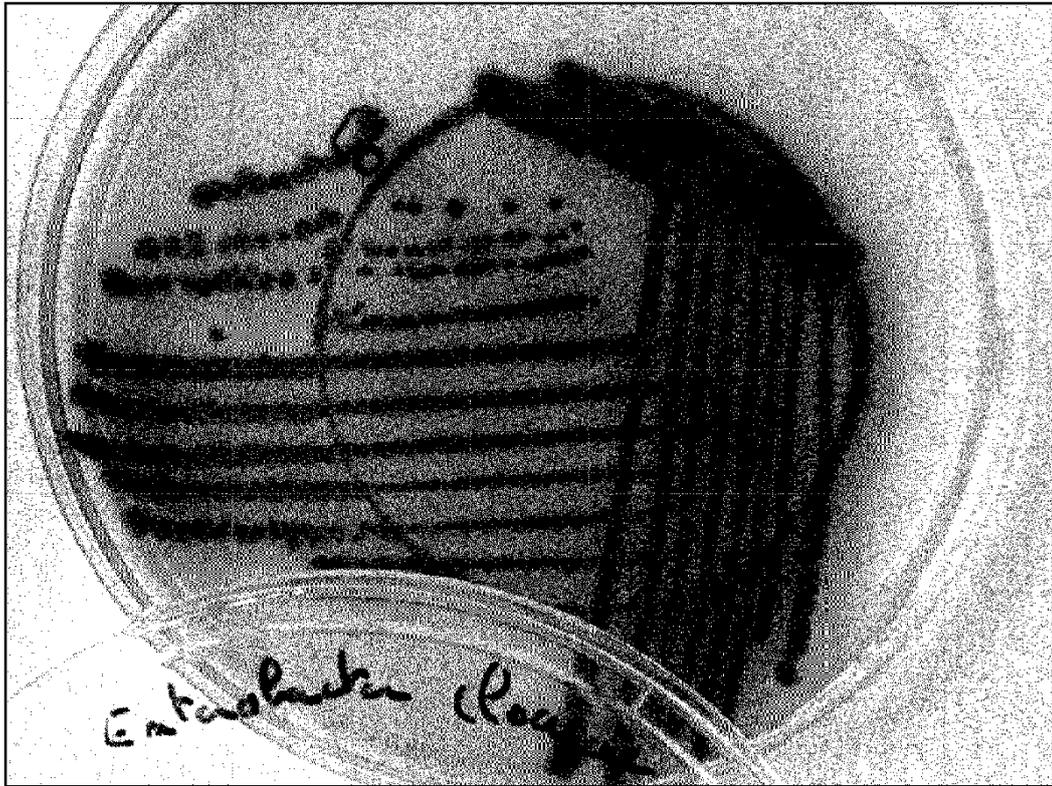
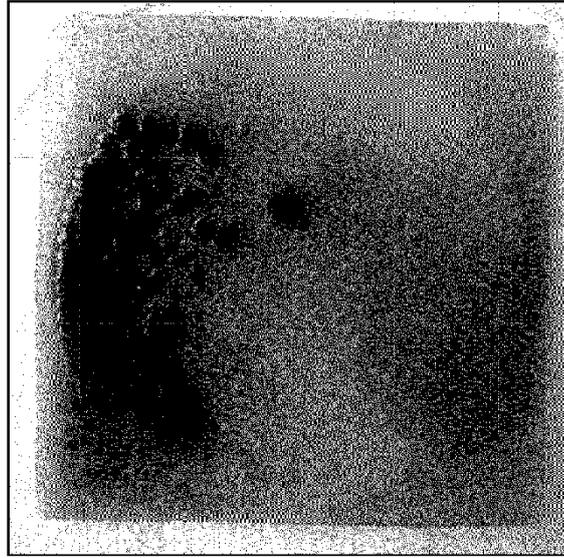
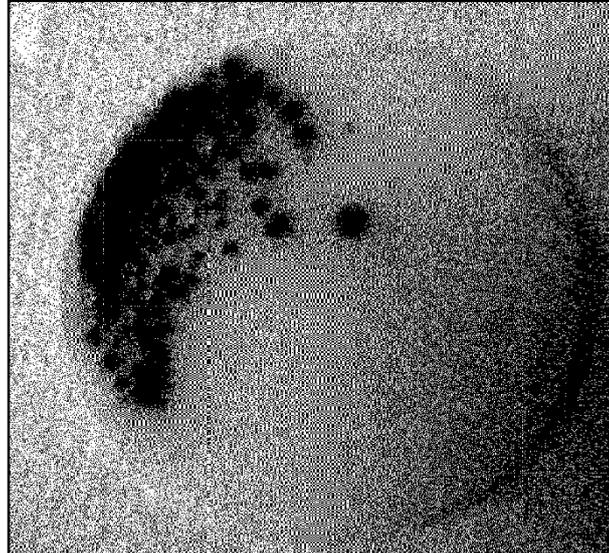


FIG. 17



*FIG. 18*



*FIG. 19*