

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 180**

51 Int. Cl.:

C12M 1/00 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

D06M 23/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.01.2015 PCT/FR2015/050035**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.07.2015 WO15104501**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2015 E 15702538 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 3092297**

54 Título: **Procedimiento de detección, identificación y enumeración de microorganismos en un soporte poroso impregnado en seco con un medio de reacción deshidratado**

30 Prioridad:

09.01.2014 FR 1450149

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

24.02.2020

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)
69280 Marcy l'Étoile, FR**

72 Inventor/es:

**MONTET, MARIE-PIERRE y
ROZAND, CHRISTINE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 744 180 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 detección, identificación y enumeración de microorganismos en un soporte poroso impregnado en seco con un medio de reacción deshidratado

5 La presente invención se refiere, de manera general, al campo del análisis microbiológico. Más particularmente, se refiere a un procedimiento de detección, identificación y/o enumeración de microorganismos en un soporte poroso impregnado en seco en todo su grosor con un medio de reacción deshidratado.

10 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.

15 Comercialmente, se han propuesto varios productos para sustituir un medio de cultivo en caja de Petri. Uno de ellos, el sistema Petrifilm™, que comprende unos nutrimentos rehidratables, se utiliza muy ampliamente. Otro sistema desarrollado por la compañía Nissui Pharmaceutical, el Compact Dry™, consiste también en un medio deshidratado. 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 poco espacio de incubación.

20 Así, existen esquemáticamente dos maneras de obtener un medio de cultivo rehidratable:

La primera consiste en aportar el medio de cultivo en forma líquida en el soporte y después secar el conjunto.

25 La segunda consiste en adherir el medio de cultivo en forma deshidratada a un soporte, a fin de obtener de inmediato un medio de cultivo rehidratable.

30 El primer método, a saber la obtención de medios nutritivos rehidratables fabricados incluyendo una fase de impregnación húmeda de los nutrimentos, es objeto de varias solicitudes de patentes. Así, la solicitud de patente CN10233734, describe un procedimiento en el que el caldo nutritivo se mezcla con un componente químico cuya evaporación es rápida. El documento WO2005/061013 describe un marcador disuelto en un disolvente y depositado sobre una capa absorbente a fin de detectar las vaginitis. Más recientemente, la solicitud de patente US20130089887 describe un soporte, a saber una fina membrana impregnada de sustratos cromogénicos y/o fluorogénicos disueltos en un disolvente, puesto en contacto con un medio de agar. El documento FR 2268076
35 divulga un material estable de ensayo de sensibilidad a los antibióticos. Sin embargo, este método, al disolverse en agua o en un disolvente, tiene un impacto negativo en la duración de la conservación del medio de cultivo rehidratable. En efecto, poniendo en suspensión algunos productos frágiles, tales como las enzimas, los sustratos enzimáticos o metabólicos, los antibióticos, puede impactar gravemente en su estabilidad global. El calentamiento necesario para el secado del medio de cultivo puede también desnaturalizar y hacer ineficaces los componentes
40 termosensibles del medio de reacción. Este método en fase acuosa no permite tampoco poder controlar y hacer variar la localización del medio de reacción y/o de los diferentes aditivos necesarios para la revelación bacteriana.

45 A fin de paliar los inconvenientes de los medios de cultivo obtenidos por este método, el segundo método propone depositar directamente sobre el soporte el polvo nutritivo sin fase previa de disolución de esta última.

50 Así, la compañía 3M propone un medio nutritivo deshidratado adherido y depositado sobre una película sin pasar por una fase previa de solubilización del medio. Este dispositivo está constituido de dos partes, una película inferior y una película superior recubiertas en la superficie por algunos componentes del medio de cultivo deshidratado. En el momento del análisis, la muestra se deposita entre estas dos películas.

Este dispositivo y el método de detección asociado, tal como se describe en la solicitud WO 2009/082667, presentan varios inconvenientes.

55 En primer lugar, este dispositivo necesita, para su fabricación, una etapa de adhesión de los nutrimentos deshidratados sobre las películas que han tenido que encolarse previamente. Después, el medio de cultivo no puede formar de facto una estructura tridimensional de la cual se puede hacer variar la altura y la concentración por estratos ya que está adherido a una película. Solo hay, por lo tanto, disponible, una pequeña capa superficial del medio. El volumen de la muestra líquida necesaria para el análisis microbiológico no puede entonces exceder de 1 o 2 ml, lo que impacta sobre el umbral de sensibilidad de detección. Después, el embalaje del Petrifilm™ necesita la
60 fabricación conjunta de la película inferior y de la película superior. No permite tampoco tener en un mismo dispositivo varios medios de cultivo diferentes. Además, este dispositivo queda limitado en sus aplicaciones y no puede, por ejemplo, utilizarse como hisopos o apósitos. Y finalmente, el Petrifilm™ necesita obligatoriamente la ayuda de un operario exterior que aporte la muestra acuosa.

La publicación de Gina Fridley *et al.* "controlled release of dry reagents in porous media for tunable temporal and spatial distribution upon rehydration" Lab Chip (7 de noviembre de 2012), vol. 12(21), páginas 4321-4327, muestra unos métodos de impresión de reactivos sobre un soporte poroso.

5 Por otro lado, en una solicitud de patente anterior FR1257047, la solicitante propone un método de aislamiento a partir de una muestra a analizar, en un medio de cultivo rehidratable *in situ*, que permite obtener colonias aisladas. Este medio rehidratable está recubierto de una membrana que permite la realización del aislamiento de las colonias. Así, el medio de cultivo permanece estéril y las colonias se desarrollan en la membrana que se encuentra justo por encima de él.

10 Ahora bien, el aislamiento de colonias sobre un soporte de agar o no se ve, a veces, como una restricción y es frecuentemente incompatible con experimentos efectuados fuera del laboratorio y/o con personas que tienen muy poco conocimiento y experiencia en microbiología.

15 Frente a la suma de las problemáticas desarrolladas antes, la presente invención propone un nuevo procedimiento de detección, identificación y enumeración de microorganismos susceptibles de estar comprendidos en una muestra.

Así, un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo que comprenda un medio deshidratado que mejore la sensibilidad de detección.

20 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento de detección, identificación y enumeración de microorganismos sin recurrir al aislamiento.

25 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo y un procedimiento que permitan una multidetección, y así obtener a partir de una misma muestra a analizar y sin realizar aislamiento, unos cultivos aislados, identificables y enumerables, sobre diferentes medios de reacción presentes en un mismo dispositivo.

30 La invención tiene también como objetivo proporcionar un dispositivo y un procedimiento particularmente flexibles. El medio de reacción puede ser un medio más o menos complejo, cromogénico por ejemplo, o muy simple, es decir que contenga únicamente un número limitado de sustratos (antibióticos, sustratos metabólicos, etc.). El dispositivo y el procedimiento pueden tener también modalidades de utilización muy variadas tales como un hisopo o un absorbente revelador de contaminaciones microbianas en apósitos, pañales, envases de alimentos.

35 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo cuya utilización es posible por personas que tengan poca experiencia en microbiología. Así, el dispositivo puede rehidratarse de una sola vez por el operario en el momento del análisis de la muestra. La rehidratación puede también realizarse *in situ* sin la ayuda del operario si, especialmente, la muestra a ensayar se coloca cerca del medio de reacción rehidratable, lo que permite su rehidratación progresiva. La muestra a analizar puede, por ejemplo, ser una herida exudativa o un trozo de carne y producir un líquido susceptible de contener los microorganismos a detectar.

40 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo que sirve él mismo para recoger la muestra, tal como un hisopo.

45 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo cuya producción y comercialización se ven facilitadas por el hecho de que el soporte poroso impregnado en seco por un medio de reacción se produce independientemente de su embalaje.

50 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo en el que se efectúa un gradiente de concentración de los sustratos de reacción, permitiendo así limitar la cantidad de estos sustratos y limitar el coste de producción del dispositivo.

Otros objetivos aparecerán a partir de la lectura de la presente solicitud.

55 La presente invención tiene por lo tanto como objetivo alcanzar todo o parte de los objetivos antes citados.

En consecuencia, la presente invención tiene por objeto un procedimiento de detección y/o identificación y/o enumeración, de al menos un microorganismo diana en una muestra susceptible de contenerlo, que comprende las etapas siguientes:

60 (a) proporcionar un dispositivo para la detección y/o la identificación y/o la enumeración de microorganismos que comprende un soporte poroso que comprende polvo de un medio de cultivo con al menos un antibiótico y/o al menos un compuesto termosensible, tal como un sustrato enzimático o metabólico, en todo su grosor, impregnándose dicho soporte en seco antes en todo su grosor con dicho medio de cultivo,

65 (b) poner en contacto una muestra con el soporte poroso,

(c) incubar el dispositivo,

(d) detectar y/o identificar y/o enumerar la o las colonias de microorganismos dentro del soporte poroso, cuando los microorganismos buscados están presentes en la muestra.

5 Según la invención, el dispositivo se impregna en seco en todo su grosor por un medio de reacción deshidratado. La incorporación de materiales pulverulentos en unos soportes porosos puede efectuarse según al menos cuatro técnicas:

10 - utilización de una bomba al vacío tal como se describe en la patente US 5,213,843;

- puesta en vibración mecánica del soporte poroso mismo, sobre el cual se ha depositado el polvo mediante un sistema vibratorio cualquiera, permitiendo las sacudidas que el polvo penetre más o menos profundamente.

15 - utilización de un campo electrostático;

- puesta en vibración ultrasónica, simultáneamente a la aplicación del polvo, utilizando un generador UltraSonidos que hace vibrar un sonotrodo, tal como se describe en la patente FR 2866578. Cuando el producto poroso pasa debajo del sonotrodo, la acción de éste pone las partículas de polvo en vibración, y éstas penetran entonces en las cavidades del cuerpo poroso.

20 De manera preferida, el procedimiento de fabricación del soporte poroso impregnado en seco en todo su grosor comprende una etapa de puesta en vibración de las partículas de polvo por un campo eléctrico. Preferiblemente, este campo eléctrico es alternativo. La patente EP 1.028.836 describe la impregnación de textiles (no tejidos, tejidos, etc.) aplicando un campo eléctrico alternativo entre dos sistemas de electrodos entre los cuales se encuentra el tejido recubierto de polvo. Las partículas de polvo que se cargan eléctricamente entran en vibración a la frecuencia del campo alternativo. Así, de manera sorprendente, esta técnica puede utilizarse para impregnar en seco un soporte poroso con un medio de reacción deshidratado. Los desplazamientos de las partículas permiten, por lo tanto, su penetración en las porosidades del soporte. Las partículas han penetrado en profundidad el soporte poroso, en todo el grosor del soporte.

25 Así, las zonas del soporte impregnadas de medio se impregnan por todo el grosor del soporte, al haber atravesado el polvo el grosor del soporte poroso. Así, al menos todo o parte del soporte poroso comprende un medio de reacción en forma de polvo en todo su grosor, pudiendo algunas zonas sobre el soporte estar, no obstante, libre de cualquier medio como, por ejemplo, el perímetro del soporte.

30 El grado de impregnación de las partículas en el grosor del soporte puede controlarse, por ejemplo, homogéneo, localizado o en gradiente, en función de las características de las materias en presencia (soportes y polvos) pero también de las características del procedimiento utilizado (intensidad del campo eléctrico, tiempo de tratamiento, frecuencia, etc.).

35 El soporte puede impregnarse de manera secuencial en el tiempo, lo que puede permitir una mejor impregnación. Así, la impregnación de gelificante puede tener lugar previamente a la impregnación de medio de reacción.

40 La impregnación en seco de un medio deshidratado en todo el grosor de un soporte poroso no necesita la utilización de agua y permite un control de la localización de las partículas. Además, permite una flexibilidad en el grosor de la capa impregnada permitiendo definir diferentes zonas en el grosor de cantidad y naturalezas diferentes.

45 De manera ventajosa, un gradiente de concentración de los sustratos de reacción se efectúa en el soporte poroso, permitiendo así limitar la cantidad de estos sustratos y limitar el coste de producción del dispositivo. Se puede elegir también tener un soporte poroso que comprenda un tipo de sustrato distribuido de manera homogénea y otro tipo de sustrato distribuido en gradiente. De manera ventajosa, el soporte está impregnado en todo su grosor por un medio nutritivo y superficialmente por unos sustratos cromógenos. En otro modo de realización, los sustratos están encapsulados, lo que permite su liberación secuencial después de la incubación del dispositivo. Así, este modo de

50 realización tiene la ventaja de limitar la utilización de los sustratos evitando sus diluciones en el medio de nutrición durante la rehidratación del medio.

55 Asimismo, también puede encapsularse un agente selectivo como un antibiótico. Este modo de realización es particularmente ventajoso ya que permite diferir el contacto del contenido (que comprende una cantidad reducida de microorganismos diana, si estos últimos están presentes) con el agente selectivo destinado a orientar el crecimiento de los microorganismos hacia el de los microorganismos buscados. Así, los microorganismos en fase de estrés microbiano no se ponen directamente en contacto con el agente selectivo, teniendo estos últimos el riesgo, en esta etapa, de ralentizar su crecimiento y por lo tanto aumentar el tiempo necesario al análisis, o bien inhibir totalmente su crecimiento y así impedir su detección/identificación. En efecto, los microorganismos diana se denominan "estresados" cuando están presentes en la muestra a analizar. Los microorganismos (entre ellos los microorganismos diana) necesitan un cierto lapso de tiempo para adaptarse a las condiciones que existen en el

interior del soporte poroso. En su estado denominado "estresado", los microorganismos diana son particularmente sensibles, especialmente a la presencia de agentes selectivos tales como unos antibióticos.

5 Así, el soporte poroso puede comprender diferentes medios de reacción. Estos medios de reacción se localizan en diferentes zonas del soporte. Estas zonas pueden corresponder a unas zonas verticales y por lo tanto al grosor del soporte y/o corresponde a unas zonas horizontales del soporte. El soporte poroso puede por lo tanto tener, a nivel de una zona, varios medios de reacción, tal como por ejemplo un medio de cultivo y un medio de revelación. El dispositivo puede también tener uno o varios medios de reacción dispuestos en unas zonas diferentes de uno o varios soportes porosos, teniendo cada una de estas zonas un medio de reacción distribuido en todo el grosor del soporte.

En la práctica, varios parámetros pueden influir en la realización de este procedimiento como principalmente:

- 15 - la textura de la red de fibras o de filamentos, o de manera general del soporte poroso utilizado;
- las características físico-químicas de los polvos tales como la naturaleza o la granulometría del polvo;
- la duración de tratamiento, la intensidad del campo eléctrico, así como la frecuencia del campo eléctrico;

20 Por lo tanto, convendrá adaptar estos parámetros a fin de permitir una impregnación en seco satisfactoria del medio de reacción en el soporte poroso.

25 Preferiblemente, la cantidad de medio de reacción, en forma de polvo, impregnado en el soporte poroso está comprendida $0,01 \text{ g/cm}^3$ y $0,1 \text{ g/cm}^3$ preferentemente entre $0,02 \text{ g/cm}^3$ y $0,09 \text{ g/cm}^3$, más preferiblemente entre $0,03 \text{ g/cm}^3$ y $0,06 \text{ g/cm}^3$. Preferiblemente, cuando el medio de reacción comprende un medio de cultivo y, eventualmente, un medio de revelación, la cantidad de medio de reacción, en forma de polvo, impregnado está comprendida entre $0,01 \text{ g/cm}^3$ y $0,09 \text{ g/cm}^3$, más preferiblemente entre $0,03 \text{ g/cm}^3$ y $0,06 \text{ g/cm}^3$. Así, la presente invención tiene la ventaja de permitir un crecimiento optimizado, especialmente debido a la cantidad en exceso del medio de cultivo que palia así los problemas de competición nutricional entre los microorganismos.

30 Se describe también que, cuando el medio de reacción comprende un medio de revelación sin medio de cultivo, la cantidad de medio de reacción, en forma de polvo impregnado es mucho más reducida y está comprendida entre $0,10 \text{ mg/cm}^3$ y 10 mg/cm^3 .

35 Según la invención, el soporte poroso se pone en contacto con la muestra.

En un modo de realización de la invención, la muestra es acuosa y permitirá la rehidratación del medio de reacción comprendido en el soporte poroso.

40 Según otro modo de realización, un volumen apropiado de líquido se añade a la muestra y/o al soporte poroso a fin de rehidratar el medio de reacción, cuando la muestra no es acuosa o insuficientemente acuosa.

45 En la práctica, el experto en la materia seleccionará el volumen apropiado de líquido o de la muestra acuosa en función de su viscosidad, del diámetro del soporte poroso, esto con el fin de rehidratar el medio y permitir el crecimiento de los microorganismos.

Ventajosamente, la rehidratación del soporte poroso necesita un volumen de líquido o de muestra acuosa superior a 2 ml, preferiblemente superior a 3 ml, aún más preferiblemente superior a 4 ml, lo que permite mejorar la sensibilidad de detección cuando los microorganismos están a baja concentración en la muestra.

50 Según la presente invención, la muestra puede comprender una etapa previa de preparación, concentración o dilución de la muestra.

55 Según la invención, la rehidratación del soporte puede realizarse con o sin la intervención de un operario.

La muestra acuosa puede añadirse al dispositivo manualmente, con la ayuda de una pipeta, o automáticamente. Puede también contenerse en al menos un depósito integrado al dispositivo y/o en canales que permitan la rehidratación del soporte poroso. Se extiende entonces en el soporte simplemente presionando el depósito.

60 Ventajosamente, la muestra se pone en contacto con el soporte poroso colocándolo por debajo del soporte poroso. Así, la rehidratación tiene lugar por la parte inferior y/o lateral, preferentemente por la parte inferior. Este modo de realización permite una hidratación homogénea de todo el soporte poroso y evita, especialmente, que los nutrientes y/o sustratos, se arrastren con el líquido o la muestra acuosa a la parte inferior del dispositivo. Ventajosamente, este modo de realización permite al procedimiento según la invención efectuarse en el espacio solucionando el problema relacionado con la ausencia de gravedad de la muestra y/o del líquido.

65

ES 2 744 180 T3

- 5 En un modo de realización, no hay intervención humana y la muestra acuosa proviene directamente de una zona productora del líquido a ensayar. Puede tratarse, por ejemplo, de una herida exudativa, o de productos alimenticios que liberan líquidos durante su almacenamiento. La muestra, debido a su naturaleza, liberará una parte de sus líquidos constitutivos que empaparán, en el transcurso del tiempo, el soporte poroso. La zona productora de la muestra a ensayar puede también ser una zona perineal de los humanos o animales que excretan orina. El soporte poroso se pone entonces cerca de esta zona y se impregna progresivamente con la muestra acuosa producida.
- 10 En otro modo de realización, el contacto de la muestra con el soporte poroso se lleva a cabo por extracción de la muestra con la ayuda del soporte poroso. El soporte poroso se utiliza entonces como hisopo y el operario deberá colocar este último en un tubo que contiene la cantidad adecuada de líquido si la muestra no es acuosa o insuficientemente acuosa.
- 15 El dispositivo se incuba después *in situ* (caso del apósito, del pañal, etc.) o en incubadora durante un lapso de tiempo suficiente para permitir la detección de las colonias microbianas dentro del soporte poroso.
- Según un modo de realización preferido, el procedimiento según la invención es un procedimiento de detección que puede utilizarse mediante lectura visual u óptica del soporte poroso.
- 20 La invención se refiere también a un dispositivo que comprende un soporte poroso impregnado en seco en todo su grosor por un medio de reacción deshidratado que permite la revelación de colonias de microorganismos en el interior de dicho soporte, calandrándose dicho soporte poroso.
- 25 El soporte poroso se ha impregnado en seco en todo su grosor, es decir que cuando existe la presencia de un medio de reacción en un sitio del soporte, éste está presente en esta zona en todo el grosor del soporte.
- 30 El soporte poroso ha sufrido una operación de calandrado. El calandrado, por la presión y la temperatura de calentamiento generadas, permite la retención y el mantenimiento estable en el tiempo del medio de reacción deshidratado en el soporte poroso, asegurando la retención de los diferentes elementos tales como los elementos nutritivos en el soporte poroso. Permite también la obtención de una superficie superior rigurosamente lisa y plana del soporte poroso.
- 35 Preferiblemente, el calandrado se lleva a cabo a una temperatura superior a la temperatura ambiente, preferiblemente a una temperatura comprendida entre 30°C y 60°C. Una temperatura inferior a 60°C permite no desnaturalizar los compuestos termolábiles.
- 40 El calandrado permite, además de la aceleración de la rehidratación del soporte poroso con respecto al soporte poroso no calandrado, una compresión de las fibras que constituyen el soporte poroso. Esta compresión, asociada a la presencia del medio deshidratado dentro del soporte poroso permite una rehidratación simultánea en todas las zonas del soporte colocadas horizontalmente y preserva así la distribución elegida (homogénea o en gradiente) de las sustancias.
- El calandrado permite así mantener el medio de reacción en el interior del soporte y facilitar su manipulación.
- 45 El soporte comprende al menos un medio de reacción deshidratado, en forma de polvo, repartido en todo el grosor del soporte poroso, teniendo dicho soporte un grosor comprendido entre 0,5 y 2 mm después del calandrado. Preferiblemente, el soporte poroso tiene un grosor de 0,8 a 1,8 mm, más preferiblemente de 1 a 1,5 mm.
- 50 La superficie del soporte poroso está comprendida entre 1 cm² y 40 cm², preferiblemente entre 10 cm² y 30 cm², más preferiblemente entre 15 cm² y 25 cm².
- El soporte poroso es apto para retener un volumen de agua superior a 2 ml, preferiblemente superior a 3 ml. Así, un soporte poroso de 25 cm² de superficie y un grosor de 1 mm después del calandrado tendrá la capacidad de retener un volumen de agua de 3 ml.
- 55 El dispositivo según la invención, debido a la presencia de medio de cultivo en todo su grosor, presenta, por lo tanto, la ventaja de permitir una mejor sensibilidad por su capacidad para retener un volumen de muestra líquida elevado.
- 60 Preferiblemente, la cantidad de medio de reacción, en forma de polvo, impregnado en el soporte poroso está comprendida entre 0,01 g/cm³ y 0,1 g/cm³, preferentemente entre 0,01 g/cm³ y 0,09 g/cm³, más preferiblemente entre 0,03 g/cm³ y 0,06 g/cm³. Preferiblemente, cuando el medio de reacción comprende un medio de cultivo y, eventualmente, un medio de revelación, la cantidad de medio de reacción en forma de polvo impregnado está comprendida entre 0,01 g/cm³ y 0,09 g/cm³, más preferiblemente entre 0,03 g/cm³ y 0,06 g/cm³. Así, la presente invención tiene la ventaja de permitir un crecimiento optimizado, debido especialmente a la cantidad en exceso del medio de cultivo, que palia así los problemas de competición nutricional entre los microorganismos. De manera sorprendente, la detección de algunas cepas es así más rápida que en medio de agar.
- 65

- El dispositivo según la invención comprende al menos un antibiótico y/o al menos un compuesto termosensible, tal como un sustrato enzimático o metabólico. Presenta así la ventaja de tener una estabilidad incrementada debido a que este compuesto no se ha puesto en suspensión durante la fabricación del dispositivo y/o ha sufrido calentamiento necesario para la deshidratación de un medio de cultivo.
- 5 Según un modo de realización, el dispositivo comprende un soporte poroso que comprende al menos un medio de reacción, en forma de polvo, repartido de manera homogénea en el grosor del soporte poroso. Según otro modo de realización, al menos un medio de reacción, en forma de polvo, se distribuye de manera gradual en el grosor del soporte poroso.
- 10 Otro modo de realización propone al menos dos medios de reacción diferentes, en forma de polvo, repartidos en al menos dos capas, comprendiendo dicho soporte en un punto dado del grosor, uno o/y el otro medio de cultivo.
- 15 Según la invención, el dispositivo comprende una pluralidad de medios de reacción.
- De manera preferida, el dispositivo comprende una capa superior protectora. La capa protectora está dispuesta sobre el soporte poroso y ninguna otra capa está dispuesta entre el soporte poroso y la capa protectora. Preferentemente, la capa protectora se coloca directamente sobre el soporte poroso.
- 20 La capa protectora puede ser translúcida o transparente, lo que permite la visibilidad de las colonias a través de esta capa. 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 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.
- 25 Preferiblemente, el dispositivo comprende un receptáculo para contener la muestra acuosa y/o el líquido. Preferentemente, el receptáculo comprende también el soporte poroso que se rehidrata entonces preferiblemente por su parte inferior.
- 30 Ventajosamente, el dispositivo comprende una capa inferior impermeable al agua. Preferiblemente, esta capa inferior es rígida, lo que permite un mejor manejo del dispositivo. Se fabrica a partir de compuestos tales como el poliéster, el polipropileno, o el poliestireno. Preferentemente, se fabrica a partir de celulosa. Puede tratarse de cartón o de papel asociado a una película impermeable al agua. Puede contener canales termoformados que servirán para la buena rehidratación del soporte poroso.
- 35 De manera ventajosa, las diferentes capas del dispositivo se fabrican a partir de materiales reciclables.
- 40 Según un modo de realización particular de la invención, la capa inferior es translúcida o transparente.
- Según un modo de realización particular de la invención, el dispositivo comprende también un código de identificación tales como los códigos de barras o las etiquetas RFID.
- 45 Según la presente invención, es también posible asociar dentro de un mismo dispositivo diferentes medios de reacción dispuestos los unos al lado de los otros y que se rehidratarán simultáneamente con la misma muestra a ensayar.
- 50 En un modo de realización, el dispositivo comprende una varilla en el extremo de la cual está fijado el soporte poroso, impregnado en seco por un medio de reacción deshidratado.
- La fijación puede realizarse mediante cualquier medio conocido por el experto en la materia como, por ejemplo, el encolado o también la termosoldadura.
- 55 El soporte poroso fijado a una varilla puede así tener la función de hisopo.
- Ventajosamente, el dispositivo comprende también un tubo transparente impermeable al agua que puede recoger el hisopo y un tapón hermético del tubo.
- 60 Después de la realización de la extracción por el hisopo, éste se coloca en el tubo que contiene el agua necesaria para la rehidratación del soporte poroso colocado en su parte apical.
- Después, el tubo se tapona y se incuba.
- 65 En otro modo de realización, el soporte poroso está integrado en un apósito, un vendaje, un pañal o un embalaje alimenticio.

Preferiblemente, el dispositivo comprende, debajo del soporte poroso, una capa inferior porosa que se pone en contacto con la muestra a analizar.

5 Más preferiblemente, el dispositivo comprende también una capa superior impermeable transparente sobre al menos una parte.

La invención se refiere también a la utilización de un dispositivo según la invención para detectar y/o identificar y/o enumerar al menos un microorganismo diana en una muestra susceptible de contenerlo.

10 Ventajosamente, la invención se refiere a la utilización de un dispositivo que comprende una varilla en el extremo de la cual está fijado dicho soporte poroso, como un hisopo.

15 En otro modo de realización, la invención se refiere a la utilización de un dispositivo según la invención como apósito.

Según otro modo de realización, la invención se refiere también a la utilización de un dispositivo según la invención como pañal.

20 También en otro modo de realización, la invención se refiere a la utilización de un dispositivo según la invención como embalaje de productos alimenticios.

25 Se entiende por muestra, una pequeña parte o pequeña cantidad separada de una entidad por un acto sustractivo denominado habitualmente extracción, con fines de análisis. La muestra puede ser de origen biológico, humano, animal, vegetal o medioambiental. Puede referirse a un producto durante un proceso industrial o un producto terminado, por ejemplo alimenticio. Puede, por lo tanto, corresponder a una extracción de fluido biológico (sangre total, suero, plasma, orina, líquido cefalo-raquídeo, secreción orgánica), una extracción de tejido o unas células aisladas. Puede ser de origen industrial o bien, según una lista no exhaustiva, una muestra de aire, una muestra de agua, una muestra tomada de una superficie, una pieza o un producto en curso de tratamiento o manufacturado, un
30 producto de origen alimenticio. Entre las muestras de origen alimenticio, se puede citar, de manera no exhaustiva, una muestra de productos lácteos (yogures, quesos, etc.), de carne, de pescado, de huevos, de frutos, de verduras, de agua, de bebida (leche, zumo de fruta, soda, etc.) y los productos constitutivos o anexos del producto terminado. Una muestra alimenticia puede finalmente proceder de una alimentación destinada a los animales, tales como, especialmente, harinas animales. Esta muestra puede sufrir previamente a su análisis una preparación de tipo
35 enriquecimiento, extracción, concentración, purificación, según unos métodos conocidos por el experto en la materia.

40 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.

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

45 A título de 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*.

50 A título de bacterias gram negativas, se pueden citar las bacterias de los géneros siguientes: *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas*

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

55 A título de mohos, se pueden citar los mohos de los géneros siguientes: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*.

Se entiende por soporte poroso, un volumen de porosidad adecuada, en forma de tejidos o de no tejidos que presentan una red fibrosa o filamentosa, de espuma con porosidad abierta. Se trata de un soporte tridimensional en el que las partículas del medio de reacción han penetrado en una zona dada del soporte poroso en todo su grosor.

60 El soporte puede ser a base de diversos compuestos absorbentes de poder de retención de agua muy alto, tales como la viscosa, el rayón, el algodón, las fibras celulósicas naturales o modificadas químicamente como la carboximetilcelulosa, los polímeros químicos absorbentes o super-absorbentes tales como las sales de poliacrilato, copolímero acrilato/acrilamida. De manera preferida, el soporte poroso tendrá una masa de superficie comprendida entre 50 g/m² y 150 f/m², preferiblemente entre 90 g/m² y 110 g/m².

65

Por medio de reacción, se entiende un medio que comprende todos los elementos necesarios para la supervivencia y/o para el crecimiento de los microorganismos. Este medio de reacción puede o bien servir únicamente de medio de revelación, o bien servir de medio de cultivo y de revelación. En el primer caso, el cultivo de los microorganismos tiene lugar previamente y, en el segundo caso, el medio de reacción constituye también el medio de cultivo.

5 Así, el medio de reacción del dispositivo según la invención es un medio de revelación y/o un medio de cultivo.

Se entiende por medio de revelación cualquier medio que contiene una molécula capaz de acoplarse con los microorganismos o las parejas de unión de dichos microorganismos y que permiten, por sus propiedades de transducción (fluorescencia, coloración, radioactividad, etc.), revelar la presencia de dichos microorganismos. Esta revelación de la presencia de microorganismos diana puede obtenerse, especialmente, por visualización (a simple vista) o lectura óptica de una coloración o de una fluorescencia sobre todo o parte del soporte.

10 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 microorganismos diana, según unos criterios perfectamente conocidos y al alcance de este experto en la técnica.

20 El medio de reacción según la invención puede contener eventuales aditivos como, por ejemplo: unas peptonas, uno o varios factores de crecimiento, unos hidratos de carbono, uno o varios agentes selectivos, unos tampones, colorantes, unos o varios gelificantes, unos hidrogeles, un agente viscoso, etc.

25 Preferiblemente, el medio de reacción del dispositivo según la invención comprende al menos un gelificante cuya cantidad está comprendida entre 1 mg/cm^2 y 2 mg/cm^2 . El agente gelificante se puede seleccionar entre los gelificantes bien conocidos por el experto en la materia tales como el agar, la agarosa, los poloxámeros, la goma guar, la xantana.

30 Así, el soporte poroso y los gelificantes permiten limitar la difusión de los sustratos y de los microorganismos y participan en la formación de colonias microbianas aisladas. Se entiende por polvo, unas partículas que tienen una granulometría de 1 a 200 micrómetros. Para perfeccionar la homogeneización del polvo, es posible una micronización de los compuestos minoritarios tales como los sustratos y antibióticos.

35 Por "al menos un microorganismo diana" se entiende, en el sentido de la presente invención, al menos un microorganismo que se desea detectar y/o identificar y/o enumerar.

En el sentido de la presente invención, la definición de la "sensibilidad de detección" es idéntica a la comúnmente admitida en el estado de la técnica, a saber la capacidad para dar un resultado positivo (aparición de una reacción coloreada y/o fluorescente) cuando la cepa bacteriana diana está presente en la muestra.

40 Descripción de los dibujos:

La figura 1 es una representación esquemática de la invención de ninguna manera limitativa.

45 La figura 1 representa de manera esquemática un soporte poroso (10) comprendido en un dispositivo según la invención que comprende una pluralidad de medios de reacción (11) a nivel de las diferentes zonas, teniendo entonces cada una de estas zonas un medio de reacción distribuido por todo el grosor del soporte.

La figura 1b corresponde a una vista por arriba del soporte poroso (10) según la invención.

50 La figura 1c corresponde a una vista por debajo según otro modo de realización en el que el soporte poroso se impregna por unos medios de reacción a nivel de zonas que forman unos círculos en la superficie, teniendo cada una de estas zonas entonces un medio de reacción distribuido por todo el grosor del soporte.

55 Ejemplo 1: preparación de un soporte poroso según la invención, que comprende un polvo de medio de cultivo distribuido de manera homogénea dentro del soporte.

Material:

60 - soportes no tejidos 95 g/m^2 (ref 95NN81, sca Life) de 25 cm^2 de dimensión de 2 mm de grosor (antes del calandrado):

- medio de cultivo deshidratado ChromID CPS 3, 0,13g (600-04595, bioMerieux) + xantana 0,06g (ref 4452073479, Alliance gum pharma)

65 Protocolo:

ES 2 744 180 T3

Se espolvorean 0,2 g de polvo sobre el soporte de manera homogénea y después el soporte se coloca entre dos electrodos aplicando un voltaje de 3200 V/mm durante 15 segundos a una humedad relativa comprendida entre el 35 y el 45%.

- 5 El soporte se calandra a 60°C aplicando una presión de $3 \cdot 10^5$ Pa/cm².

Los soportes se atraviesan así por el polvo de medio de cultivo.

- 10 Ejemplo 2: preparación de un soporte poroso según la invención, que comprende polvo de medio de reacción distribuido de manera homogénea dentro del soporte y polvo de medio de reacción distribuido únicamente en la superficie.

Material:

- 15 - Soportes no tejidos 95 g/m² de 25 cm² de dimensión y 2 mm de grosor (antes del calandrado) (ref 95NN81, sca Life).

- 20 - medio 1: medio de cultivo deshidratado ChromID CPS 3(0,13g) (600-04595, bioMerieux) + xantana 0,06g (ref 4452073479, Alliance gum)

- 20 - medio 2: medio de cultivo deshidratado ChromID CPS 3(0,13g) (600-04595, bioMerieux) + xantana 0,06g (ref 4452073479, Alliance gum)+ imipenem monohidrato micronizado (sp2129, Merck and Co)

- 25 Se impregna una primera cara con medio de reacción de manera homogénea según el protocolo del ejemplo 1. Después, se da la vuelta al soporte y la segunda cara se impregna con un medio de reacción que comprende un antibiótico, el imipenem, con la ayuda de un campo eléctrico más bajo de 1050 V/mm durante 15 segundos para que el polvo penetre menos y permanezca más en la superficie. El calandrado se efectúa como se describe en el ejemplo 1.

- 30 Ejemplo 3: preparación de un soporte poroso según la invención, que comprende polvo de medio de reacción distribuido de manera homogénea dentro del soporte y polvo de medio de reacción distribuido en gradiente dentro del soporte.

- 35 Material idéntico al ejemplo 2.

- 35 Se impregna una primera cara con el medio 1 de manera homogénea según el protocolo del ejemplo 1. Después se da la vuelta al soporte y se impregna la segunda cara con el segundo medio con el mismo campo eléctrico fuerte (3169V/mm).

- 40 Se obtiene por lo tanto un gradiente de impregnación del segundo medio de reacción en el interior de una distribución homogénea del primer medio de reacción.

- 45 Ejemplo 4: preparación de un soporte poroso según la invención, que comprende diferentes polvos de medios de reacción distribuidos dentro del soporte en dos capas.

- 45 Se impregna una primera cara con el medio de reacción de manera homogénea con un campo eléctrico medio (1408 V/mm). Después, se da la vuelta al soporte y se impregna la segunda cara con un segundo medio de reacción con el mismo campo eléctrico medio (1408 V/mm).

- 50 Se obtienen por lo tanto dos capas distintas de medios de reacción y todo el grosor del soporte poroso comprende polvo de medio de reacción.

- 55 Ejemplo 5: Detección de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* con un dispositivo según la invención que comprende, como antibiótico, el imipenem a 1 mg/l.

- 55 Material:

1. Reactivos utilizados

- 60 * agar CPS3 (bioMérieux ref. 43549, 22002)

* Chrom ID CPS3 medio seco (bioMerieux, ref. 600-04595)

* frasco Tryptone sel 9 ml, (AES ref. 111499, lote 327601)

- 65

* Xantana (Alliance Gum FF Pharma lot FF 2524429) granulometría < 75 µm

* Imipenem (bioMérieux INC Ref 066259-1)

2. Cepas utilizadas

5

* *E.coli* ATCC 25922, CMI (concentración mínima inhibidora) de 0,12 mg/ml

* *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, CMI 2 mg/ml

10 Método:

Para realizar los medios de agar, se añade un litro de agua a la muestra de ensayo del medio seco, es decir 38,3 g por ChromID CPS3. El medio seco se disuelve entonces bajo agitación, se lleva a ebullición y después se esteriliza en autoclave. Después del enfriamiento del medio de agar a 55°C, el imipenem esterilizado por filtración se añade a la concentración de 1 mg/l.

15

Para realizar una impregnación según la presente invención del medio seco Chrom ID CPS3, se realiza una muestra de ensayo del medio seco que corresponde a la fabricación de un litro de medio, es decir 26 g, muestra de ensayo a la cual se añade la xantana (20 g) y el imipenem (1 g). El conjunto de los constituyentes se mezcla después en un turbula®. Los soportes porosos se impregnan después con los polvos de los medios de cultivo realizados como se ha descrito anteriormente y se esterilizan por rayo gamma entre 10 y 17 kGy.

20

Resultados:

25 Agar ChromID CPS3

	Concentraciones UFC/ml de partida	ChromID CPS3 sin antibiótico		ChromID CPS3 con Imipenem 1mg/l	
		UFC	UFC/ml	UFC	UFC/ml
<i>E.coli</i> ATCC 25922	10 ³	67/56/88	703	0/0/0	0
	10 ⁵	≥ 300 colonias	-	0/0/0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 ³	122/105/105	1107	69/61/73	677
	10 ⁵	≥ 300 colonias	-	≥ 300 colonias	-

UFC: Unidad que forma Colonias

30 Soporte poroso según la invención

	Concentraciones UFC/ml de partida	ChromID CPS3 sin antibiótico		ChromID CPS3 con Imipenem 1mg/l	
		UFC	UFC/ml	UFC	UFC/ml
<i>E.coli</i> ATCC 25922	10 ³	28/32/32	307	0/0/0/0/0/0	0
	10 ⁵	≥ 300 colonias	-	0/0/0/0/0/0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 ³	49/57/61	556	40/53/38/39/46/56	453
	10 ⁵	≥ 300 colonias	-	≥ 300 colonias	-

Conclusión

35 Se han ensayado dos cepas, *E.coli* ATCC 25922 (CMI 0.12) y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (CMI 2mg/l).

Los resultados obtenidos con los soportes porosos según la invención y con los medios agar ChromID CPS3 concuerdan con el crecimiento de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 que tiene una CMI de 2 mg/l en presencia de imipenem a 1 mg/l y la ausencia de crecimiento de la cepa *E. coli* ATCC 25922 que tiene una CMI de 0,12 mg/l en presencia de imipenem a 1 mg/l.

40

Ejemplo 6: Detección de *Proteus* y de *Pseudomonas* con un dispositivo según la invención que comprende, como antibiótico, el Ciprofloxacino a 1,5 mg/l.

45 Material:

* Base Mueller Hinton 2 polvo (bioMérieux, Ref 8301143, lote 1002661760)

- * Agar Americano (ROKO SA Ref 11000301)
- * Agar Europeo (SETEXAM Ref TMN2)
- 5 * Ciprofloxacina (HCL TOKU-E COMPANY Ref C032)
- * Agar ChromID CPS3 (bioMérieux Ref 43549, 22002)
- * Chrom ID CPS3 medio seco (bioMérieux Ref 600-04595)
- 10 * Frasco Tryptone sel 9 ml (AES ref 111499, lote 327601)
- * Agar MH2 ((Muller Hinton 2) pre-vertidas (bioMérieux Ref:43301)
- 15 * Agar TSA (bioMérieux Ref: 43011)
- * Xantana (Alliance Gum FF Pharma lot FF 2524429) granulometría < 75 µm
- * Ciprofloxacina (HCL ref: 00743041)
- 20 Los soportes porosos se han impregnado por los medios siguientes:
- * MH2 (Muller Hinton 2) + xanthan alliance gum pharma
- 25 * MH2 + xanthan alliance gum pharma + 1,5 mg/l ciprofloxacina
- * MH2 + xanthan alliance gum pharma
- * CPS3 + xanthan alliance gum pharma
- 30 * CPS3 + xanthan alliance gum pharma + 1,5 mg/l ciprofloxacina
- Cepas ensayadas:
- 35 * Proteus mirabilis API 8803099, ADM AP3, CMI: 0,125
- * Proteus mirabilis API 8803080, ADM JS10, CMI: 0,25
- * Proteus mirabilis API 9406037, colección bioMérieux, CMI: 4
- 40 * Proteus vulgaris API 8803017, ADM CQ11, CMI: 0,125
- * Pseudomonas aeruginosa API 9405061, colección bioMérieux, CMI: 0,125
- 45 * Pseudomonas aeruginosa API 7509005, ATCC 25853, CMI: 0,5
- * Pseudomonas aeruginosa API 9410075 CMI: 16
- * Pseudomonas aeruginosa API 9405063 CMI: 4
- 50

Método:

Para realizar los medios de agar, se añade un litro a la muestra de ensayo del medio seco, es decir 38,3 g para ChromID CPS3 y 41,57 g para el medio Muller Hinton2. El medio seco se disuelve después bajo agitación magnética, se lleva a ebullición y después se esteriliza en autoclave. Después del enfriamiento del medio de agar a 55°C, se añade la ciprofloxacina esterilizada por filtración al medio de agar a la concentración de 1,5 mg/l.

Para realizar una impregnación según la presente invención de los medios secos MH2 y Chrom ID CPS3, se realiza la muestra de ensayo del medio seco, que corresponde a la fabricación de un litro de medio, es decir 26 g para ChromID CPS3 y 26,07 g para el medio Muller Hinton2, muestra de ensayo a la cual se añade xantana (20 g) y, si es necesario, la ciprofloxacina (1,5 g). El conjunto se mezcla después en un turbula®. Los soportes porosos se impregnan después con los polvos de los medios de cultivo como se describe a continuación y se esterilizan por rayo gamma entre 10 y 17 kGy.

65 Resultados:

ES 2 744 180 T3

CEPAS	CMI	Medio de agar MH2	Medio de agar MH2 + Ci 1,5 mg/l	Impregnación de soporte poroso con MH2	Impregnación de soporte poroso con MH2 + Ci 1,5 mg/l
<i>Proteus mirabilis</i> API 8803099	0,032	++	--	++	--
<i>Proteus mirabilis</i> API 8803080	0,38-0,5	++	--	++	--
<i>Proteus mirabilis</i> API 9406037	8-12	++	++	++	++
<i>Proteus vulgaris</i> API 8803017	0,125	++	--	++	--
<i>P. aeruginosa</i> API 9405061	0,25	++	--	++	--
<i>P. aeruginosa</i> API 7509005	0,25	++	--	++	--
<i>P. aeruginosa</i> API 9410075	sup 32	++	++	++	++
<i>P. aeruginosa</i> API 9405063	6-8	++	++	++	++

CEPAS	CMI	Medio de agar ChromID CPS3	Medio de agar ChromID CPS3 + Ci 1,5mg/l	Impregnación de soporte poroso con ChromID CPS3	Impregnación de soporte poroso con ChromID CPS3 + Ci 1,5 mg/l
<i>Proteus mirabilis</i> API 8803099	0,032	++	--	++	--
<i>Proteus mirabilis</i> API 8803080	0,38-0,5	++	--	++	--
<i>Proteus mirabilis</i> API 9406037	8-12	++	++	++	++
<i>Proteus vulgaris</i> API 8803017	0,125	++	--	++	--
<i>P. aeruginosa</i> API 9405061	0,25	++	--	++	--
<i>P. aeruginosa</i> API 7509005	0,25	++	--	++	--
<i>P. aeruginosa</i> API 9410075	sup 32	++	++	++	++
<i>P.aeruginosa</i> API 9405063	6-8	++	++	++	++

Conclusiones

5 En este ejemplo, los medios de agar Muller Hinton y ChromID CPS3 con o sin ciprofloxacina a 1,5 g/l se han comparado con los soportes porosos según la presente invención impregnados por los mismos medios con o sin ciprofloxacina a 1,5 g/l para tres cepas de *Proteus mirabilis*, una cepa de *Proteus vulgaris* y cuatro cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Todas estas cepas eran de CMI que engloba el valor 1,5 mg/l de ciprofloxacina. Las cepas de CMI inferiores a 1,5 mg/l (*Proteus mirabilis*:API 8803099, *Proteus mirabilis*:API 8803080, *Proteus vulgaris*: API 8803017, *Pseudomonas aeruginosa*: API 9405061, *Pseudomonas aeruginosa*: API 7509005) no presenta crecimiento sobre un medio de agar MH2 + Sustratos + ciprofloxacina (1,5 mg/l) y ChromID CPS3 adicionados en ciprofloxacina (1,5 mg/l). De la misma manera, estas cepas denominadas sensibles a la ciprofloxacina para una CMI de 1,5 mg/l no presentan tampoco crecimiento sobre los soportes porosos impregnados con los medios ChromID CPS3 y MH2+Sustrato en presencia de ciprofloxacina a 1,5 mg/l. Por lo tanto, existe una concordancia entre los resultados obtenidos sobre medios agar y sobre soportes porosos impregnados según la presente invención. Todas estas cepas presentan un crecimiento sobre medios de agar MH2+Sustrato, ChromID CPS3, soportes porosos impregnados por medio MH2+Substrato y ChromID CPS3.

20 Las cepas de CMI superiores a 1,5 mg/l (*Proteus mirabilis*: API 9406037, *Pseudomonas aeruginosa*: API 9410075, *Pseudomonas aeruginosa*: API 940506) crecen sobre todos los medios de agar o impregnados con o sin ciprofloxacina (1,5 g/l). Estos resultados confirman que es posible realizar unos medios de cultivo según la presente invención que contienen pequeñas cantidades de principios activos, como unos sustratos cromogénicos o unos antibióticos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de detección y/o de identificación y/o de enumeración, de al menos un microorganismo diana en una muestra susceptible de contenerlo, que comprende las etapas siguientes:
- (a) proporcionar un dispositivo para la detección y/o la identificación y/o la enumeración de microorganismos que comprende un soporte poroso que comprende polvo de un medio de cultivo con al menos un antibiótico y/o al menos un compuesto termosensible, tal como un sustrato enzimático o metabólico, en todo su grosor, impregnándose en seco antes por todo su grosor con dicho medio de cultivo,
- 10 (b) poner en contacto una muestra con el soporte poroso, rehidratándose el medio de cultivo con una muestra acuosa o un volumen adecuado de líquido cuando la muestra no es acuosa o insuficientemente acuosa,
- (c) incubar el dispositivo,
- 15 (d) detectar y/o identificar y/o enumerar la o las colonias de microorganismos dentro del soporte poroso, cuando los microorganismos buscados están presentes en la muestra.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende una etapa previa de preparación, dilución o concentración de la muestra.
3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la muestra se pone en contacto con la parte inferior del soporte poroso.
- 25 4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la etapa b) se lleva a cabo mediante extracción de la muestra con la ayuda del soporte poroso.
5. Dispositivo que comprende un soporte poroso que comprende al menos un medio de cultivo en forma de polvo repartido por todo el grosor del soporte poroso, comprendiendo dicho medio de cultivo al menos un antibiótico y/o al menos un compuesto termosensible tal como un sustrato enzimático o metabólico, teniendo dicho soporte poroso un grosor comprendido entre 0,5 y 2mm y estando calandrado.
- 30 6. Dispositivo según la reivindicación 5, caracterizado por que al menos un medio de cultivo en forma de polvo está repartido en el grosor del soporte poroso de manera homogénea.
- 35 7. Dispositivo según la reivindicación 5, caracterizado por que al menos un medio de cultivo en forma de polvo está repartido gradualmente en el grosor del soporte poroso.
8. Dispositivo según la reivindicación 7, caracterizado por que comprende al menos dos medios de cultivo diferentes en forma de polvo repartidos en al menos dos capas, comprendiendo dicho soporte, en un punto dado del grosor, uno u otro medio de cultivo.
- 40 9. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que el medio de cultivo comprende al menos un gelificante cuya cantidad está comprendida entre 1 mg/cm² y 2 mg/cm².
- 45 10. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que la cantidad de medio de cultivo impregnada en el soporte poroso está comprendida entre 0,10 mg/cm³ y 0,1 g/cm³, preferentemente entre 0,01 g/cm³ y 0,09 g/cm³.
- 50 11. Dispositivo que comprende una pluralidad de soporte poroso tales como se describen en las reivindicaciones 5 a 10.
12. Apósito que comprende el dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10.
- 55 13. Pañal que comprende el dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10.
14. Embalaje alimentario que comprende el dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10.
- 60 15. Hisopo que comprende el dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10.
16. Utilización de un dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10 para detectar y/o identificar y/o enumerar al menos un microorganismo diana en una muestra susceptible de contenerlo.

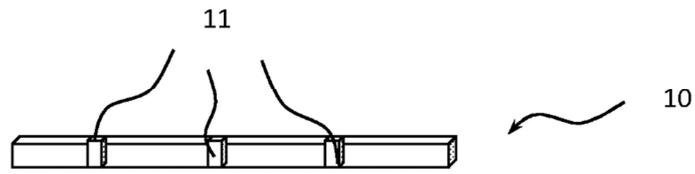


Figura 1A

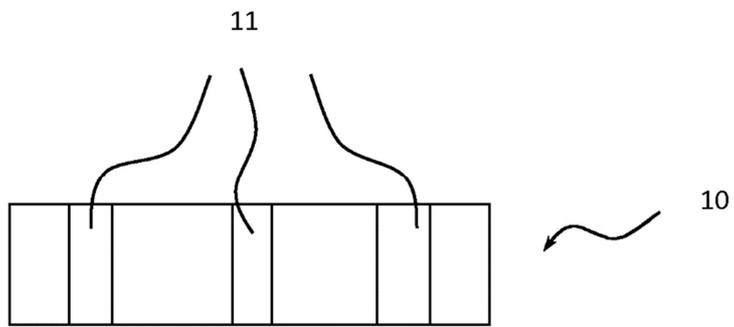


Figura 1B

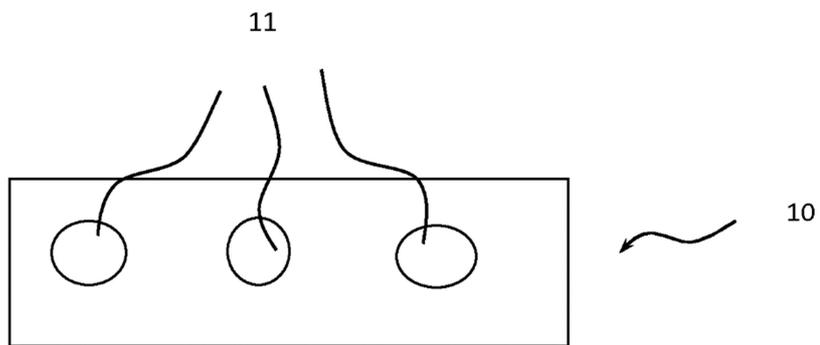


Figura 1C