



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 289**

21 Número de solicitud: 201030031

51 Int. Cl.:

**G01N 33/487** (2006.01)

**G01N 27/74** (2006.01)

**C12M 1/34** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **14.01.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **28.07.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**28.07.2011**

71 Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**  
**c/ Serrano, 117**  
**28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Baldrich Rubio, Eva;**  
**Muñoz Pascual, Francisco Javier y**  
**Martínez Mendizábal, Susana**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Dispositivo inductivo detector de presencia bacteriana.**

57 Resumen:

Dispositivo inductivo detector de presencia bacteriana. La invención se refiere a un novedoso dispositivo (1) para la detección de presencia bacteriana que comprende dos transductores inductivos similares configurados de modo que uno de ellos puede quedar libre a la vez que el otro es expuesto a una solución, y que están adaptados para su conexión a un analizador de impedancias, deduciéndose de la variación de la impedancia del transductor inductivo cuando se expone a una solución la presencia o ausencia de bacterias en dicha solución.

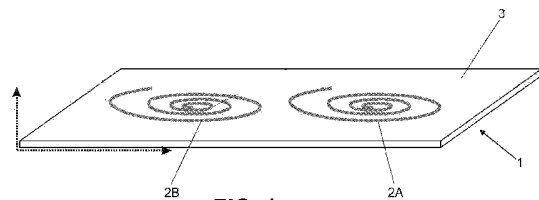


FIG. 1a

ES 2 363 289 A1

**DESCRIPCIÓN**

Dispositivo inductivo detector de presencia bacteriana.

**5 Objeto de la invención**

Un primer objeto de la presente invención es un dispositivo inductivo para la detección de presencia bacteriana en una muestra de una forma rápida y sencilla.

10 Un segundo objeto de la presente invención es un procedimiento para la detección de presencia bacteriana en una muestra empleando el dispositivo detector anterior.

**Estado de la técnica**

15 La detección rápida y sensible de presencia bacteriana es un requisito clave para la prevención eficaz de un importante número de problemas sanitarios y medioambientales. Sin embargo, aunque simple en concepto, este objetivo se enfrenta todavía con grandes desafíos.

20 La mayoría de los métodos de detección actualmente disponibles se fundamentan en técnicas clásicas como el cultivo, las pruebas bioquímicas y la enumeración por microscopia o por citometría de flujo, que aunque extremadamente sensibles, requieren de largos tiempos de ensayo, laboratorios adecuados, instrumentación costosa y personal altamente especializado.

25 Recientes avances en métodos alternativos, incluyendo las técnicas inmunológicas (inmunoensayos, separaciones inmunomagnéticas), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la espectrometría de masas, así como el floreciente campo de los microarrays de ADN, están sentando las bases para el desarrollo de kits comerciales y sistemas de detección portátiles de manejo más sencillo. Sin embargo, muchos de estos métodos aún son complejos y requieren tiempos de análisis excesivamente largos.

30 Por otro lado, la determinación de la conductividad de las partículas bacterianas es una fuente importante de información sobre el estado fisiológico de la célula. La conductividad de las partículas bacterianas está determinada principalmente por el número de grupos cargados presente en la pared celular (de estructura gel-porosa) y por la movilidad de los contraiones desde/hacia ella. Sus valores experimentales han sido obtenidos mediante diferentes técnicas, entre las cuales se puede citar el artículo de A. Vander Wal, M. Minor, W. Norde, A. J. B. Zehnder y J. Lyklema, J. Colloid Interface Sci., 1997, 186, 71-79. VanderWal y colaboradores observaron que la conductividad de la superficie de las bacterias en suspensión tiende a aumentar ligeramente con la concentración de electrolito en solución. Sin embargo, la conductividad de las células resultó insignificante en comparación con la solución electrolítica tanto a las más altas como a las más bajas concentraciones de electrolito ensayadas. Mientras que el primero es el comportamiento esperado para suspensiones diluidas de partículas esféricas no conductoras y no cargadas, la segunda observación se atribuyó a la fuga de iones a través de la membrana citoplasmática. En consecuencia, las estimaciones de estos autores para la conductividad de las células, que son equivalentes a las de una solución electrolítica de unos 1-5 mM, resultaron más fiables medidas en presencia de electrolitos a concentración 0.01-0.04 M.

45 Posteriormente, se demostró que la conductividad del espacio periplásmico bacteriano aumenta con la raíz cuadrada de la fuerza iónica del medio (Hötzel, Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res., 1999, 1450, 53-60).

Más recientemente, Suehiro detectó un aumento en la conductancia tras la concentración de *E. coli* por dielectrophoresis sobre la superficie de arrays de microelectrodos interdigitados (J Suehiro, R. Hamada, D. Noutomi, M. Shutou y M. Hara, J. Electroanal. Chem., 2003, 57, 157-168). Además, el incremento en conductancia resultó directamente proporcional a la cantidad de bacterias capturadas.

**Descripción de la invención**

55 La presente invención describe una nueva estrategia para la detección de presencia bacteriana en una solución utilizando transductores inductivos. En efecto, la conductividad de la pared bacteriana contribuye a aumentar la conductividad global de una solución, lo cual provoca un cambio del campo magnético alrededor del transductor inductivo y, por tanto, también de su inductancia. Una sencilla y rápida medición de la inductancia de un transductor inductivo expuesto a una solución proporciona así información acerca de la conductividad de dicha solución. Las ventajas de esta estrategia de medida son un tiempo de respuesta extremadamente rápido, un formato de ensayo sin reactivo ni marcador, y la explotación de dispositivos altamente compatibles con la producción en masa y de bajo coste.

60 En particular, los transductores inductivos empleados en la presente invención son bobinas inductivas. La inductancia  $L$  de una bobina depende de su composición y diseño, aunque también cambia en presencia de metales en su proximidad o cuando se producen cambios en factores externos como la luz o la temperatura. Estos cambios en la inductancia dificultan la adquisición de señales coherentes o reproducibles a lo largo del tiempo (por ejemplo, obtenidas en días diferentes o en localizaciones dispares), dificultando así su uso como sensor en determinadas aplicaciones. Además, bobinas microfabricadas mediante tecnología CMOS y situadas en posiciones alejadas dentro de una misma oblea de silicio suelen presentar ligeras diferencias de composición y por tanto distinto comportamiento.

Sin embargo, se ha comprobado que la relación entre las inductancias de bobinas adyacentes en la oblea se mantiene prácticamente constante entre ciertos límites de temperatura. Esto es debido en parte al hecho de que bobinas adyacentes tienden a mostrar características similares al haber sido fabricadas a la vez y en similares condiciones. Además, el efecto de los factores externos es similar en dos bobinas cercanas y condiciona de la misma forma la respuesta de ambas, algo que se traduce en valores cercanos de la inductancia y resistencia. El dispositivo de la presente solicitud aprovecha estas características para realizar medidas diferenciales de inductancia: una primera bobina o bobina activa se pone en contacto con una solución y se mide su inductancia, esta medida se corrige respecto a la de una segunda bobina o bobina de referencia para compensar cambios en las condiciones ambientales, y finalmente la medida de inductancia de la bobina activa ya corregida se correlaciona con la concentración de bacterias en una solución.

Según un primer aspecto de la invención, se describe un dispositivo detector de presencia bacteriana que comprende dos transductores inductivos similares entre sí configurados de modo que uno de ellos puede quedar libre a la vez que el otro es expuesto a una solución. En el presente documento, denominaremos transductor inductivo de referencia al transductor que queda libre durante el procedimiento de medida, mientras que el transductor inductivo expuesto a la solución se denominará transductor activo. Además, el dispositivo de la invención está adaptado para su conexión a un analizador de impedancias para llevar a cabo las medidas de inductancia de los transductores inductivos a partir de las cuales se deducirá la presencia bacteriana o no en la solución problema y, en su caso, la concentración de bacterias de acuerdo con el procedimiento que se describirá más adelante.

Aunque el dispositivo de la invención se puede realizar utilizando cualquier tipo de transductor inductivo cuya inductancia varíe cuando se modifica el campo magnético a su alrededor, de acuerdo con una realización preferente de la invención los transductores inductivos son bobinas inductivas cubiertas por una capa aislante. Las bobinas inductivas pueden estar individualizadas, es decir, formadas cada una sobre un sustrato diferente para facilitar la deposición de una solución solamente sobre la bobina activa o para permitir la toma de medidas por inmersión diferencial de las dos bobinas en una solución, o bien estar formadas adyacentes y coplanares sobre un mismo sustrato. Se entiende que, aunque la configuración básica de este dispositivo se realiza con un mínimo de dos bobinas, una de referencia y otra activa, es posible fabricar un dispositivo que disponga de un número variable de bobinas de referencia y de un número variable de bobinas activas para facilitar la toma simultánea de varias medidas.

Por otro lado las bobinas de la invención pueden ser de cualquier tamaño siempre que permitan que un volumen de solución cubra completamente la bobina activa, modificando así su inductancia para realizar la medida. Del mismo modo, la distancia entre las dos bobinas deberá ser suficiente como para exponer la bobina activa a una solución sin que la solución afecte a la bobina de referencia. De acuerdo con una realización preferida de la invención, sin embargo, las bobinas tienen un radio de entre  $100\ \mu\text{m}$  y  $1000\ \mu\text{m}$ , estando en este caso normalmente fabricadas empleando técnicas de microfabricación o mediante técnicas habituales en microelectrónica, como deposición química en fase vapor, pulverización catódica o similares.

Por último, en otra realización preferida más el dispositivo de la invención comprende un anillo de guarda conectado a masa alrededor de cada bobina para reducir posibles fugas de corriente.

Según un segundo aspecto de la invención, se describe un procedimiento de detección de presencia bacteriana en una solución problema empleando un dispositivo que comprende una bobina activa (A) y una bobina de referencia (B) cubiertas por una capa aislante y conectadas a un analizador de impedancias. En el presente documento, denominaremos "solución problema" a la solución cuya concentración bacteriana se desea medir, y "solución de referencia" a la solución sin bacterias que se emplea como referencia. El procedimiento, por tanto, comprende los siguientes pasos:

1) Realizar al menos una medida de inductancia con ambas bobinas en contacto con una solución de referencia sin bacterias, obteniéndose las inductancias de referencia  $L_{Aref}$ ,  $L_{Bref}$ .

2) Medir las inductancias  $L_{Amed}$ ,  $L_{Bmed}$  de las bobinas ( $2_A$ ,  $2_B$ ) con la bobina activa (A) en contacto con la solución problema y la bobina de referencia (B) en contacto con la solución de referencia sin bacterias.

3) Deducir la presencia y/o concentración de bacterias en la solución problema en función del cambio de inductancia de la bobina activa (A).

Preferentemente, el cambio de inductancia de la bobina activa (A) se obtiene restando su inductancia de referencia  $L_{Aref}$  de su inductancia de medida  $L_{Amed}$  corregida para compensar cambios ambientales. En efecto, la inductancia de medida  $L_{Amed}$  está afectada no sólo por la presencia de la solución problema, sino también por el cambio en condiciones ambientales. Para compensar este cambio, según una realización preferente, se multiplica la inductancia de medida  $L_{Amed}$  por un factor obtenido de la relación entre los valores de la inductancia de la bobina de referencia (B) en las condiciones de la primera medida y las de la segunda medida. Matemáticamente, se puede expresar como:

$$\Delta L_A = L_{Aref} - L_{Amed} \cdot L_{Bref}/L_{Bmed}$$

De este modo, se comprueba que cambios en la inductancia corregida de la bobina activa  $L_A$  indican la presencia de bacterias en la solución problema. Es más, es posible realizar una calibración previa de los valores de  $L_A$  en presencia

## ES 2 363 289 A1

de soluciones con concentraciones de bacterias conocidas, pudiendo obtenerse así una estimación de la concentración de bacterias en la solución problema.

Además, se ha comprobado que las medidas de inductancia realizadas por el analizador de impedancias se realizan preferentemente a frecuencias de entre 4 MHz y 20 MHz, y más preferiblemente aún a frecuencias de entre 4 MHz y 10 MHz.

Preferentemente, con el objeto de mejorar la precisión de las medidas se realiza una pluralidad de medidas de inductancia con la solución de referencia y se toman las inductancias de referencia  $L_{Aref}$ ,  $L_{Bref}$  como la media de todas ellas.

Preferentemente la solución de referencia sin bacterias es una solución salina, más preferentemente una solución salina PBS, o un medio de cultivo bacteriano. A su vez, la solución salina puede ser cualquier solución cuya conductividad haya sido ajustada mediante la adición de sales. Similarmente, la solución problema puede ser una dilución de la muestra bacteriana en una solución salina más preferentemente una solución salina PBS, o en un medio de cultivo bacteriano. A su vez, la solución salina puede ser cualquier solución cuya conductividad haya sido ajustada mediante la adición de sales.

Por último, según otra realización preferente el procedimiento de detección de presencia bacteriana descrito emplea como solución de referencia la matriz de la solución problema, que ha sido previamente sometida a depleción de presencia bacteriana.

### Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1a y 1b muestran respectivamente una vista en perspectiva y una sección transversal del dispositivo de la invención.

Las Figuras 2a y 2b muestran el promedio de los datos obtenidos para cada concentración de bacterias diluidas en PBS y agua respectivamente.

Las Figuras 3a y 3b muestran los cambios en inductancia en función de la concentración de sal ensayada.

La Figura 4 muestra los cambios en inductancia en función de la concentración de bacterias en muestras de agua mineral, suplementada o no con sales para ajustar la conductividad.

### Descripción de una realización preferente

Se describe una realización preferente de la invención haciendo referencia a las figuras adjuntas. La Fig. 1a muestra una vista en perspectiva del dispositivo (1) de la invención donde se aprecian dos microbobinas ( $2_A$ ,  $2_B$ ) formadas sobre un sustrato (3). La vista de detalle de la Fig. 1b muestra una vista en sección de una de las microbobinas ( $2_A$ ,  $2_B$ ) donde se observan las capas que la forman: una capa de silicio recubierta de óxido de silicio como aislante forma la base para las propias microbobinas ( $2_A$ ,  $2_B$ ), que están protegidas por un recubrimiento aislante hecho en este ejemplo de  $\text{SiO}_2$  y  $\text{Si}_3\text{N}_4$ .

#### Ejemplo 1

##### *Detección de bacterias en medio salino PBS*

La validez de esta invención se ha demostrado mediante la determinación de la presencia de la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*), un indicador reconocido de contaminación fecal en las fuentes de agua, en una solución salina PBS. Para ello se realizaron diluciones seriadas en PBS o en agua mineral, previamente esterilizados, a partir de una solución madre de concentración conocida. Esta solución madre consistió en un cultivo de noche en medio de cultivo LB, sometido a centrifugación durante 10 minutos a 12 000 rpm, eliminación del medio sobrenadante y resuspensión del precipitado en PBS o en agua.

Se utilizaron pares de microbobinas ( $2_A$ ,  $2_B$ ) de 500  $\mu\text{m}$  de radio fabricadas por tecnología CMOS usando 2 niveles de aluminio con sección de 5  $\mu\text{m}$  (grosor) x 1.5  $\mu\text{m}$  (altura) y 49 vueltas cada uno. Dentro de cada dispositivo, las dos microbobinas ( $2_A$ ,  $2_B$ ) estaban situadas coplanarmente y encapsuladas en una configuración T08. Los contactos de las microbobinas ( $2_A$ ,  $2_B$ ) se alejaron lo más posible (evitando aumentar en exceso su resistencia) de su área activa para facilitar la deposición de la muestra a estudiar. Cada microbobina ( $2_A$ ,  $2_B$ ) estaba rodeada de un anillo protector (anillo de guarda) para reducir posibles fugas de corriente.

Para la obtención de medidas, se depositaba sobre la microbobina activa ( $2_A$ ) una gota de 0.5  $\mu\text{l}$  de volumen de PBS o de agua estériles como solución de referencia, o de una gota de 0.5  $\mu\text{l}$  de volumen de cada una de las concentraciones bacterianas preparada en PBS o en agua estériles. Seguidamente, se medía la inductancia en un rango de frecuencias entre 4 y 20 MHz y se calculaba el cambio en la inductancia  $L_A/L_B$  generada. Para cada concentración, se realizaron cuatro mediciones independientes (correspondientes a deposiciones independientes de muestra sobre la bobina sensora), y para la solución de referencia se realizaron un mínimo de 10 medidas independientes (correspondientes a

un mínimo de 10 deposiciones independientes de solución de referencia sobre la bobina sensora). Cada medición era seguida de lavado con solución salina y agua, así como secado bajo un flujo de nitrógeno. El promedio de los datos obtenidos para cada concentración de bacterias se comparó entonces con los obtenidos en solución de referencia (PBS o agua estériles en la ausencia de bacterias) (Figuras 2a y 2b).

5

En todos los experimentos llevados a cabo en PBS, la presencia de bacterias en el medio se generó un aumento detectable de inductancia para concentraciones de *E. coli* de 500 a  $1 \times 10^5$  células/ $\mu\text{l}$  (Figura 2a). Teniendo en cuenta que el volumen de gota depositada es de 50 microlitros, somos capaces de detectar alrededor de 200 bacterias con este método novedoso. El cambio en la inductancia fue más evidente en las frecuencias más bajas estudiadas (4-10 MHz). Sin embargo, la presencia de bacterias en agua mineral no genera cambios en inductancia significativos.

10

La constante dieléctrica de algunas suspensiones de partículas aumenta significativamente a medida que disminuye la frecuencia de la medida, probablemente debido al desplazamiento tangencial de los contraiones respecto a la superficie de las partículas cargadas. La "relajación" de los contraiones es uno de los mecanismos responsables del aparente comportamiento capacitivo de la membrana de las células vivas. En este sentido, las células vivas expuestas a un campo eléctrico se comportan como pequeños condensadores y acumulan cargas eléctricas en superficie. La permitividad resultante resultaría de la acumulación de cargas alrededor de las membranas celulares. Por lo tanto las superficies celulares se caracterizan en solución por un aumento de la densidad de iones en su entorno cercano. Esto se debe principalmente a las características de la pared que rodea la célula, que está básicamente compuesta de peptidoglicano, un componente que a condiciones fisiológicas está altamente cargado y contribuye de forma importante a la atracción de iones de la solución hacia su proximidad.

15

20

### Ejemplo 2

#### 25 *Detección de la salinidad/conductancia de una solución*

Como se ha descrito en las secciones anteriores, la impedancia de una bobina inductiva ( $2_A$ ,  $2_B$ ) es sensible a un cierto número de factores externos. Como se describe en esta invención, uno de estos factores es la conductancia/salinidad de la solución que se deposita en su superficie. Por esta razón, decidimos investigar los valores mínimos de la conductividad necesarios para activar la respuesta de las microbobinas ( $2_A$ ,  $2_B$ ) anteriormente descritas. En las Figura 3a y 3b se resumen los cambios de inductancia registrados para una dilución en serie de una solución salina PBS (la solución PBS contiene 10 mM de tampón  $\text{PO}_4$ , NaCl 140 mM y KCl 3 mM, a pH 7,4). Como se observa en las figuras 3a y 3b, los cambios en inductancia se correlacionan con la concentración de sal ensayada. El rango de detección lineal abarca concentraciones de PBS entre 5 y 75 mM y el PBS sin diluir (150 mM de sal aproximadamente) genera valores cercanos a la saturación del dispositivo. Las diluciones de PBS por encima de 1:64 (equivalente a una concentración de sal de 4,87 mM) no generan ningún cambio detectable en la inductancia. El límite inferior de detección (LOD) para esta mezcla de sal es de 4,13 mM, calculado como el promedio de 10 blancos independientes (obtenidos en agua sin sal), más 3 veces su desviación estándar.

30

35

#### 40 Ejemplo 3

#### *Detección de bacterias en muestras de agua*

La aplicabilidad de la invención al estudio de muestras reales se ha llevado a cabo mediante la determinación de *E. coli*, inoculada a diferentes concentraciones ( $0$ - $10^6$  células/ $\mu\text{l}$ ), en agua mineral. Las muestras fueron entonces suplementadas con sales (PBS concentrado) hasta una concentración final  $0$ - $150$  mM. Como se ilustra en la figura 4, la presencia bacteriana no es detectable directamente en agua, ni en los tampones salinos más diluidos estudiados (dilución 1:8 de PBS, equivalente a concentración de sales de 19 mM). Cuando el agua es suplementada con sales hasta una concentración equivalente a PBS 1:4 (38 mM), se puede detectar presencia de bacterias por encima de  $10^3$  células/ $\mu\text{l}$  pero el límite de detección del ensayo está por encima de  $10^6$  células/ $\mu\text{l}$ . Solamente a conductividad equivalente o por encima de la del PBS podemos detectar *E. coli* en un rango entre  $10^2$  y  $10^6$  células/ $\mu\text{l}$ . Por tanto, la presente invención permite el estudio de muestras de agua, una vez su conductividad ha sido ajustada adecuadamente.

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Dispositivo (1) detector de presencia bacteriana, **caracterizado** porque comprende dos transductores inductivos similares configurados de modo que uno de ellos puede quedar libre a la vez que el otro es expuesto a una solución, y que están adaptados para su conexión a un analizador de impedancias.

2. Dispositivo (1) detector de presencia bacteriana de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque los transductores inductivos son bobinas (2<sub>A</sub>, 2<sub>B</sub>) cubiertas por una capa aislante.

10 3. Dispositivo (1) detector de presencia bacteriana de acuerdo con la reivindicación 2, donde las bobinas (2<sub>A</sub>, 2<sub>B</sub>) están dispuestas adyacente y coplanarmente sobre el mismo sustrato (3).

15 4. Dispositivo (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-3, que además comprende un anillo de guarda conectado a masa alrededor de cada bobina (2<sub>A</sub>, 2<sub>B</sub>) para reducir posibles fugas de corriente.

5. Dispositivo (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-4, donde el radio de las bobinas (2<sub>A</sub>, 2<sub>B</sub>) está comprendido entre 100 μm y 1000 μm.

20 6. Procedimiento de detección de presencia bacteriana en una solución problema empleando un dispositivo (1) que comprende un par de bobinas (2<sub>A</sub>, 2<sub>B</sub>), respectivamente bobina activa y bobina de referencia, cubiertas por una capa aislante y conectadas a un analizador de impedancias, **caracterizado** porque comprende los siguientes pasos:

25 - realizar al menos una medida de inductancia con ambas bobinas (2<sub>A</sub>, 2<sub>B</sub>) en contacto con una solución de referencia sin bacterias, obteniéndose las inductancias de referencia L<sub>Aref</sub>, L<sub>Bref</sub> de las bobinas (2<sub>A</sub>, 2<sub>B</sub>);

- realizar una medida de las inductancias L<sub>Amed</sub>, L<sub>Bmed</sub> de las bobinas (2<sub>A</sub>, 2<sub>B</sub>) con la bobina (2<sub>A</sub>) activa en contacto con la solución problema y la bobina (2<sub>B</sub>) de referencia en contacto con la solución de referencia sin bacterias; y

30 - deducir la presencia y/o concentración de bacterias en la solución problema en función del cambio de inductancia de la bobina (2<sub>A</sub>) activa.

35 7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, donde el cambio de inductancia de la bobina (2<sub>A</sub>) activa se obtiene restando su inductancia de referencia L<sub>Aref</sub> de su inductancia de medida L<sub>Amed</sub> corregida para compensar cambios ambientales.

8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, donde el cambio de inductancia de la bobina (2<sub>A</sub>) activa se obtiene de acuerdo con la siguiente fórmula:

40 
$$\Delta L_A = L_{Aref} - L_{Amed} \cdot L_{Bref}/L_{Bmed}$$

45 9. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-8, donde las medidas de inductancia se realizan a frecuencias de entre 4 MHz y 20 MHz.

10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, donde las medidas de inductancia se realizan a frecuencias de entre 4 MHz y 10 MHz.

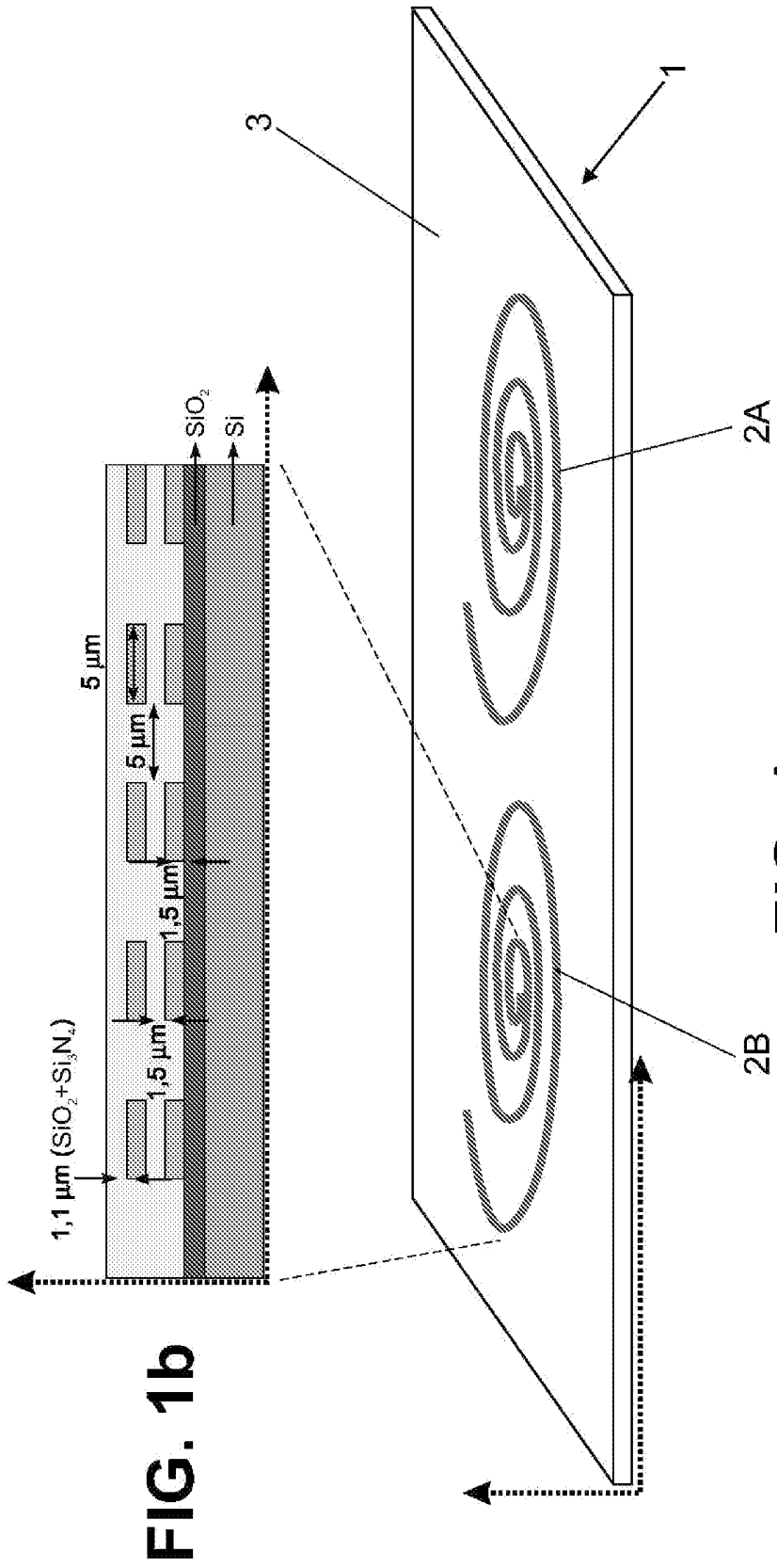
50 11. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-10, donde la solución de referencia sin bacterias es una solución salina o un medio de cultivo bacteriano.

12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, donde la solución salina es una solución salina PBS.

55 13. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-12, donde la solución problema es una solución salina o un medio de cultivo bacteriano.

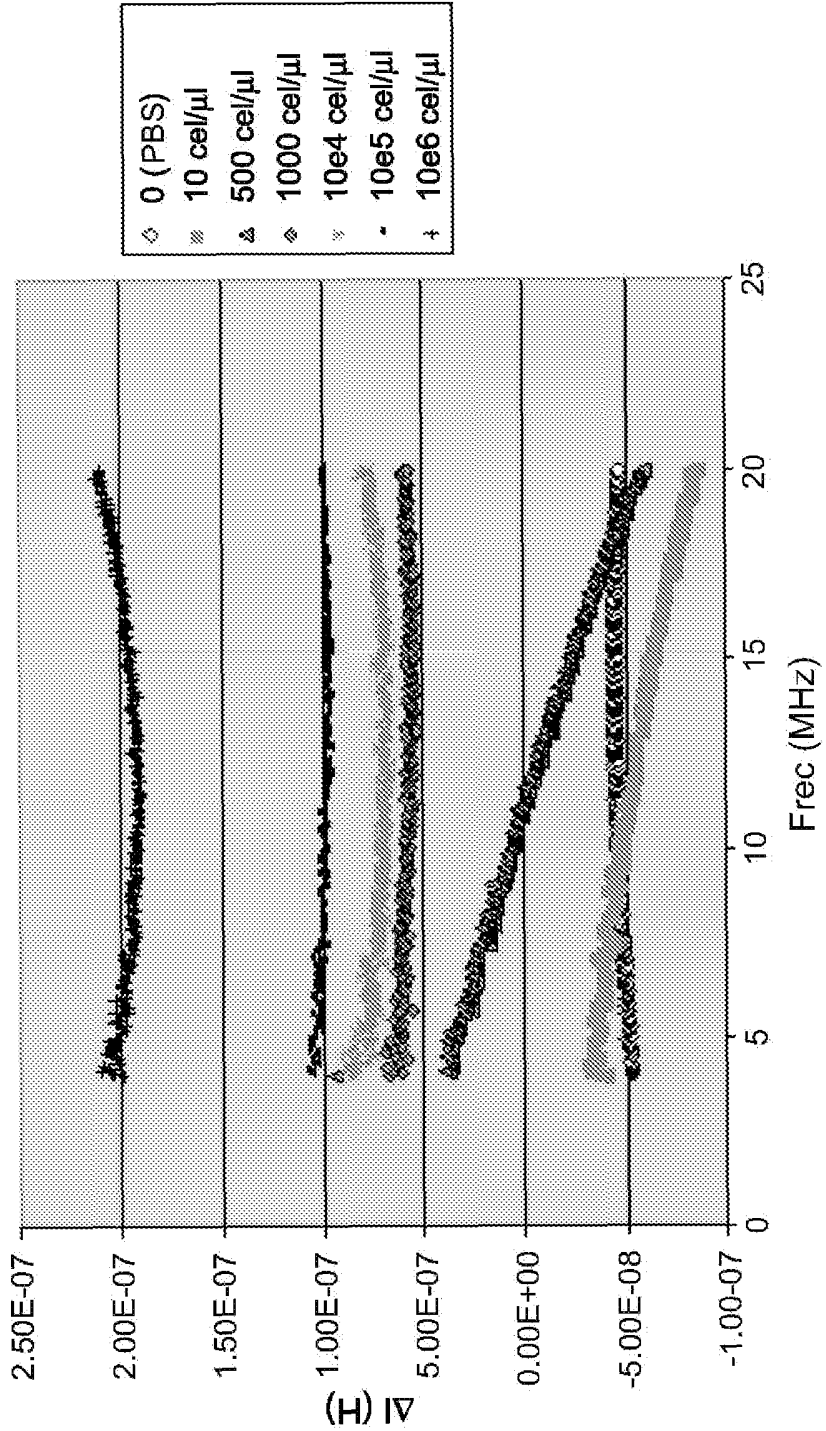
14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, donde la solución salina es una solución salina PBS.

60 15. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-14, donde la solución de referencia se obtiene a partir de la matriz de la solución problema previamente sometida a depleción de presencia bacteriana.



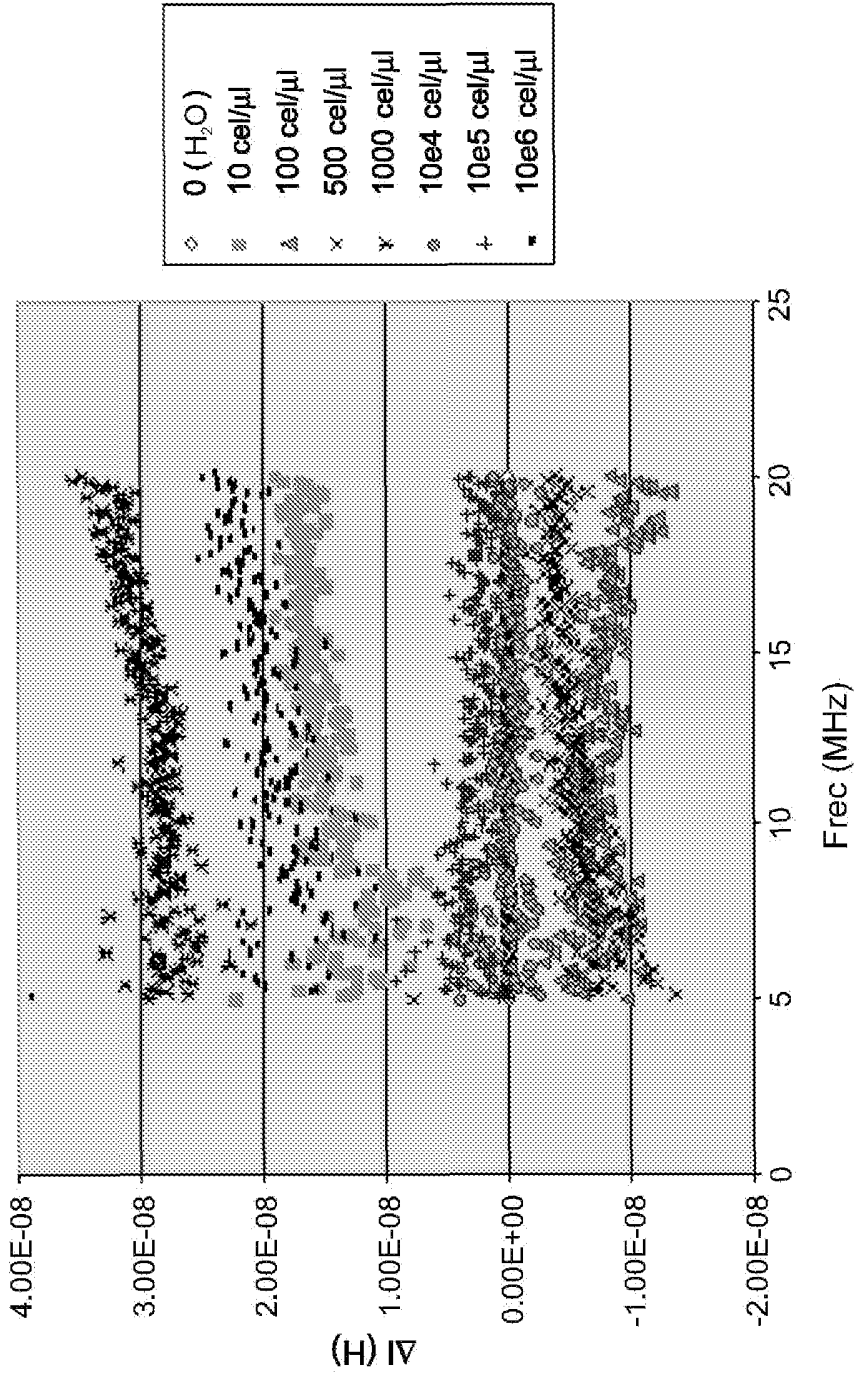
**FIG. 1b**

**FIG. 1a**

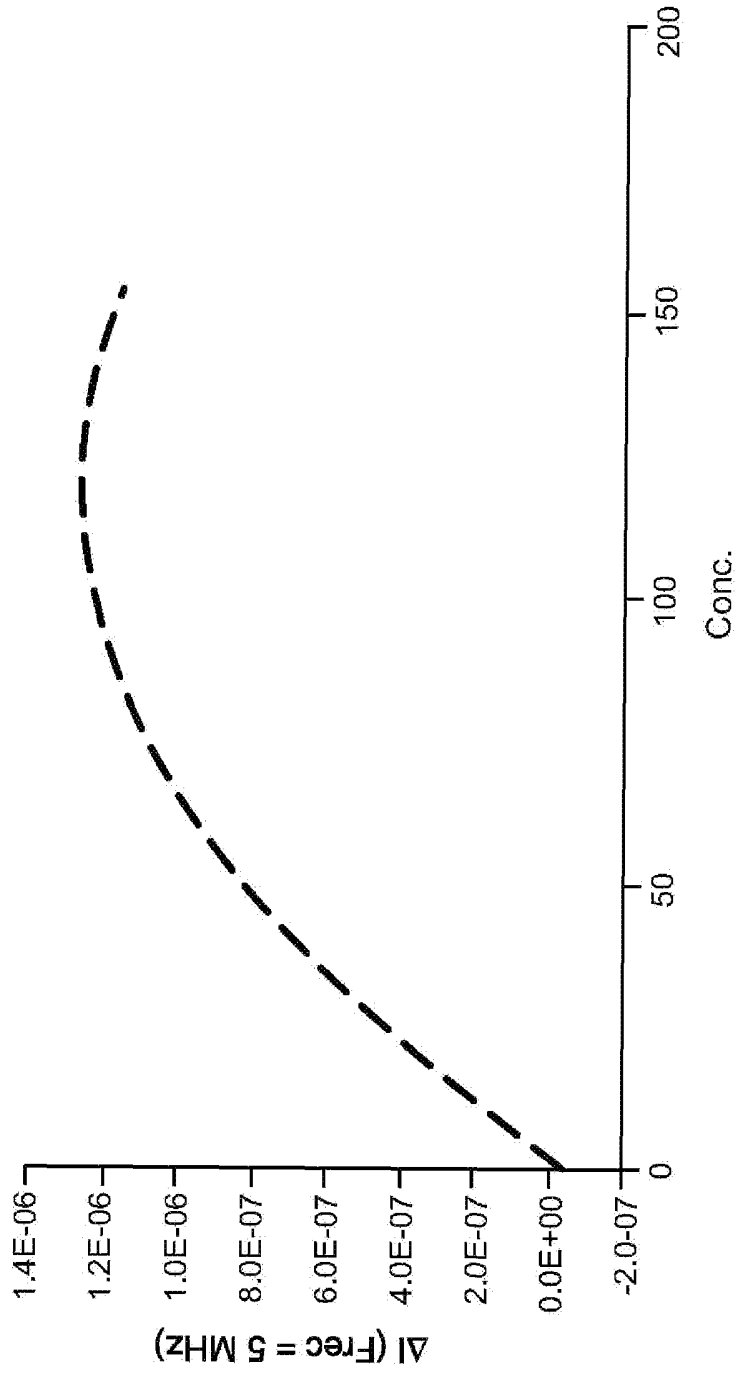


**FIG. 2a**

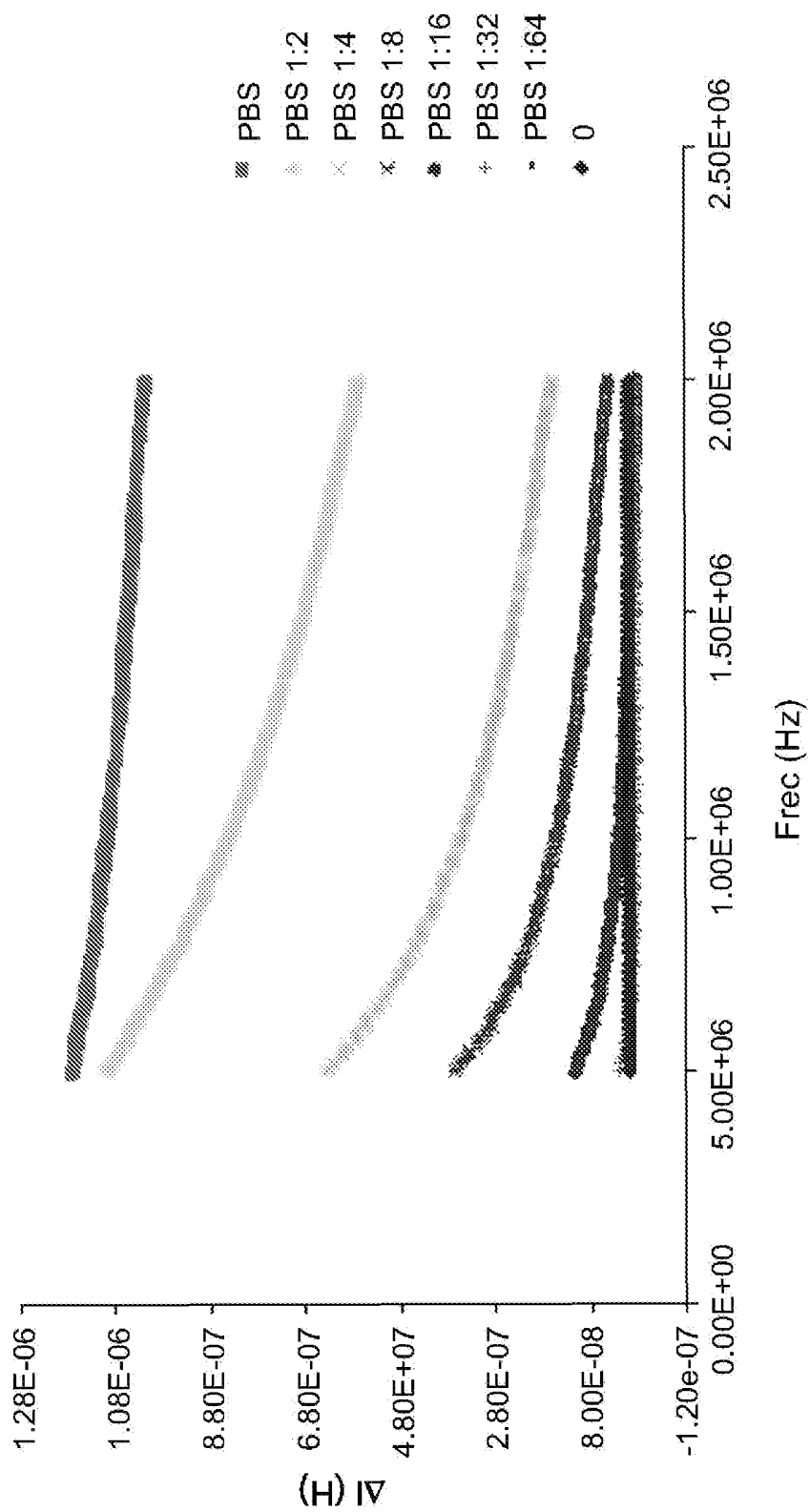




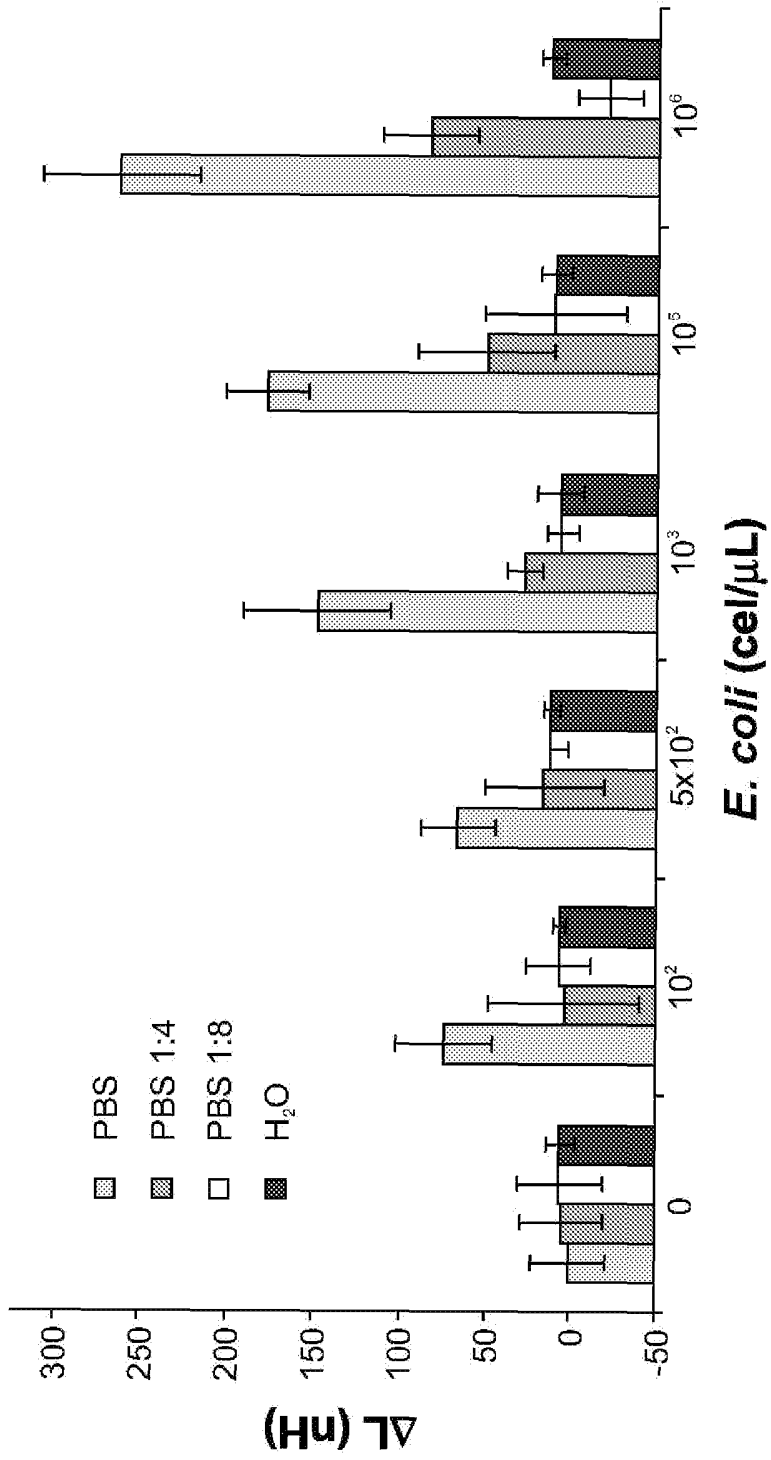
**FIG. 2b**



**FIG. 3a**



**FIG. 3b**



**FIG. 4**



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030031

②② Fecha de presentación de la solicitud: 14.01.2010

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2009202985 A1 (GULAK PATRICK GLENN et al.) 13.08.2009, resumen; párrafos [20],[24],[71-73]; figuras 2,3A-3B,10A-10B.	1-5
X	ES 2280335 T3 (NTE S A) 16.09.2007, página 3, línea 29 – página 4, línea 7; página 4, líneas 21-36; página 4, línea 64 – página 5, línea 15; reivindicaciones 1,2,8,12; figuras 2,4,5.	6-15
X	US 2005112544 A1 (ACEA BIOSCIENCES) 26.05.2005, reivindicaciones; figuras.	1-15
A	US 2005244987 A1 (CANON KK) 03.11.2005, resumen; párrafos [11-31],[48],[56]; figura 1.	1-2

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
06.05.2011

Examinador  
E. Pina Martínez

Página  
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**G01N33/487** (2006.01)

**G01N27/74** (2006.01)

**C12M1/34** (2006.01)

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

G01N, C12M

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

INVENES, EPODOC, WPI, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 06.05.2011

**Declaración****Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 2-15

Reivindicaciones 1

**SI****NO****Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)**

Reivindicaciones

Reivindicaciones 1-15

**SI****NO**

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

**Base de la Opinión.-**

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

**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2009202985 A1 (GULAK PATRICK GLENN et al.)	13.08.2009
D02	ES 2280335 T3 (NTE S A)	16.09.2007

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

Se considera D01 el documento de la técnica anterior más próximo al objeto de las reivindicaciones. Este documento, junto con el documento D02, perteneciente asimismo al estado de la técnica anterior a la solicitud, afecta a la novedad y/o actividad inventiva de todas las reivindicaciones, tal y como se explicará a continuación.

Reivindicación 1

Siguiendo la terminología empleada en la reivindicación 1, el documento D01 describe lo siguiente (las referencias entre paréntesis se refieren a D01):

Dispositivo detector de presencia bacteriana que comprende dos transductores inductivos (140, párr. [0024]) similares configurados de modo que uno de ellos puede quedar libre a la vez que el otro es expuesto a una solución (ver figura 3A), y aptos para ser conectados a un analizador de impedancias (120).

A la vista de lo anterior todas las características técnicas del dispositivo reivindicado se encuentran descritas en D01, por lo que esta reivindicación carece de novedad en el sentido del Art. 6.1 de la Ley de Patentes 11/86

Reivindicaciones 2-5

Las reivindicaciones dependientes no parecen comprender características adicionales o alternativas que les confieran el necesario requisito de actividad inventiva frente al estado de la técnica anterior.

En particular, el hecho de que los transductores sean bobinas (reivindicación 2) constituye una de las alternativas evidentes al alcance del experto en la materia, que no ejercería esfuerzo inventivo para seleccionar este tipo de inductores y emplearlos en el dispositivo de D01.

En cuanto a la configuración definida en las reivindicaciones 3 y 5 está análogamente descrita en D01 (ver figura 3A) en la que se observan dos electrodos adyacentes y coplanarios, dispuestos sobre un mismo sustrato, estando las dimensiones de los mismos dentro del rango de las decenas de micras.

El anillo de guarda conectado a masa definido en la reivindicación 4 se considera un elemento común en los sectores de la técnica relacionada, similar a las capas de pasivación y aislantes descritas en D01 (230, párr. [0020]), y cuya implementación no comportaría el ejercicio de un esfuerzo inventivo.

Por lo anterior, se concluye que las reivindicaciones 2-5 carecen del requisito de actividad inventiva según se establece en el Art. 8.1 LP.

Reivindicación 6

El documento D02 describe el siguiente procedimiento (las referencias entre paréntesis se refieren a D02):

Procedimiento de detección de presencia bacteriana en una solución problema empleando un dispositivo que comprende un par de electrodos (22, 23), respectivamente electrodo activo (22) y electrodo de referencia (23), que comprende los siguientes pasos:

- medida de la impedancia en la región A, con el electrodo en contacto con la solución problema (con bacterias) y en la región B con el electrodo de referencia en contacto con la solución de referencia (sin bacterias)
- deducir la presencia y/o concentración de bacterias en la solución problema en función del cambio de impedancia del electrodo activo (ver reivindicación 1).

De lo anterior se infiere que las etapas esenciales del procedimiento reivindicado están descritas en D02.

La única diferencia mencionable entre este procedimiento y el reivindicado en la solicitud reside en el uso de bobinas en lugar de otro tipo de electrodos y en la medida de la inductancia en lugar de la impedancia.



No obstante, se consideran estos aspectos alternativas de selección del tipo de transductor, que no comportarían una contribución técnica al problema planteado y que por tanto serían opciones de selección obvias para un experto en la materia.

Así, la reivindicación 6 no satisface el requisito de actividad inventiva del Art. 8.1 LP a la vista del estado de la técnica anterior.

#### Reivindicaciones 7-15

El resto de reivindicaciones dependientes no comprenden etapas del procedimiento adicionales o alternativas que impliquen el ejercicio de un esfuerzo inventivo por parte del experto en la materia.

En particular, la compensación de los cambios ambientales de la reivindicación 7 está contemplada en el documento D02 (pág. 3, lín. 48-50).

En cuanto a los rangos de frecuencia de las reivindicaciones 9 y 10 se encuentran dentro de los rangos aplicados en D02 (ver reiv. 1).

Por último, la etapa definida en la reivindicación 15 de reducción o eliminación de presencia bacteriana se describe en D02 (ver reiv. 7)

Por tanto, a la vista a del estado de la técnica anterior, las reivindicaciones 7-15 no satisfacen el requisito de actividad inventiva del Art. 8.1 LP.

En conclusión, la solicitud no satisface los requisitos de patentabilidad que se establecen en el Art.4.1 LP.