

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①① Número de publicación: **2 164 537**

②① Número de solicitud: 009901456

⑤① Int. Cl.⁷: C12Q 1/04

①②

PATENTE DE INVENCION

B1

②② Fecha de presentación: **30.06.1999**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2002**

Fecha de concesión: **12.03.2003**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
26.02.2003

④⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.04.2003**

④⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.04.2003

⑦③ Titular/es:
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
Patio de Escuelas Menores, 1
37007 Salamanca, ES

⑦② Inventor/es: **Velázquez Pérez, Encarnación;**
Martínez Molina, Eustaquio;
Mateos González, Pedro F. y
Chordi Corbo, Andrés

⑦④ Agente: **Dávila Baz, Angel**

⑤④ Título: **Kit y procedimiento para la identificación de bacilos Gram positivos esporulados aerobios o anaerobios facultativos de la familia bacillaceae.**

⑤⑦ Resumen:

Kit y procedimiento para la identificación de bacilos Gram positivos esporulados aerobios o anaerobios facultativos de la familia bacillaceae.

Kit y procedimiento para la identificación de bacilos Gram positivos esporulados de la familia bacillaceae, aerobios facultativos presentes en muestras clínicas o veterinarias, de alimentos tanto de origen vegetal como animal, de agua, suelo atmósferas y, en general, de cualquier tipo de muestras. Comprende las etapas de (a) aislar las bacterias en un medio sólido en placas adecuado para su crecimiento a la temperatura y pH adecuados para cada cepa a aislar; (b) incubar el medio resultante; (c) realizar una tinción de Gram y una tinción de esporas y (d) sembrar, a partir de este medio, una colonia o suspensión de bacilos Gram positivos esporulados en los medios de cultivo adecuados para la realización de las pruebas deseadas; y (e) identificar la cepa aislada comparando los resultados de dichas pruebas con los de una base de datos patrones.

La invención abarca el kit para la realización del procedimiento.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Kit y procedimiento para la identificación de bacilos Gram positivos esporulados aerobios o anaerobios facultativos de la Familia Bacillaceae.

5

La presente invención se refiere a un procedimiento para la identificación de bacilos Gram positivos esporulados de la Familia Bacillaceae presentes en cualquier tipo de muestras ya sean de procedencia humana, animal, vegetal, industrial o medioambiental, así como un conjunto o kit de medios de cultivo sólidos y/o líquidos y los reactivos necesarios para ser utilizados en dicho procedimiento.

10

El procedimiento y el kit junto a sus reactivos según la invención son susceptibles de ser aplicados en la identificación de bacilos Gram positivos esporulados en todas y cada una de las industrias, centros de estudio y enseñanza, diagnóstico, análisis o investigación que trabajan o pueden aislar este tipo de bacterias.

15

Actualmente la identificación de estas bacterias está basada fundamentalmente en la utilización de atributos fisiológicos y bioquímicos recogidos en el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática. No existen kits diseñados para la identificación de estos microorganismos a pesar de que muchas de sus especies tienen importancia desde el punto de vista de la salud humana y/o animal, bien como patógenos, bien como productores de antibióticos.

20

Los sistemas comerciales diseñados para otros grupos de bacterias no incluyen las pruebas necesarias para identificar estas bacterias y además en sus bases de datos no las incluyen, por lo que el usuario carece de una referencia para comparar los resultados obtenidos, cuando el objeto de la identificación es una de estas bacterias.

25

De acuerdo con esta invención se proporciona un procedimiento y un conjunto o kit de medios diseñados específicamente para la identificación de estas bacterias. Igualmente, se proporcionan no sólo pruebas fisiológicas y bioquímicas adecuadas a la identificación del grupo de bacterias que nos ocupa, sino también bases de datos con los que se pueden comparar los resultados obtenidos por el usuario.

30

La ventaja de hacer estas pruebas por medio de agruparlas en un kit posibilita la comparación del resultado de las pruebas con una base de datos proporcionada, dando una identificación inmediata y segura de la especie de bacilo analizado.

35

Estudios anteriores, intentaban la identificación, a partir del caldo original, lo que causaba muchas interferencias, dificultando la identificación de la especie.

De acuerdo con la invención, se proporciona ahora un procedimiento para identificar bacilos Gram positivos esporulados aerobios o anaerobios facultativos presentes en muestras clínicas o veterinarias, de alimentos tanto de origen vegetal como animal, de agua, suelo, atmósferas y, en general, de cualquier tipo de muestras, caracterizado porque comprende las etapas de:

40

- (a) aislar las bacterias en un medio sólido en placas adecuado para su crecimiento a la temperatura y pH adecuados para cada cepa a aislar; (b) incubar el medio resultante; (c) realizar una tinción de Gram y una tinción de esporas y (d) sembrar, a partir de este medio, una colonia o suspensión de bacilos Gram positivos esporulados en los medios de cultivo adecuados para la realización de la pruebas deseadas;; (e) identificar la cepa aislada comparando los resultados de dichas pruebas con los de una base de datos patrones.

45

50

Según el procedimiento de la invención, la siembra se realiza en un conjunto de medios de cultivo sólidos, semisólidos y/o líquidos junto con reactivos específicos para la identificación de dichas bacterias Gram positivas a través de la realización de las siguientes pruebas:

55

- Catalasa

- Crecimiento en anaerobiosis en caldo de tioglicolato

- Test de Voges-Proskauer

60

- Producción de ácido a partir de D-Glucosa, L-Arabinosa, D-xylosa, D-manitol

- Hidrólisis de caseína

ES 2 164 537 B1

- Hidrólisis de gelatina
- Hidrólisis de almidón
- 5 - β -galactosidasa
- Utilización de citrato
- 10 - Utilización de propionato
- Desaminación de fenilalanina
- Reducción de nitratos
- 15 - Crecimiento a pH 6.8
- Crecimiento a pH 5.7
- 20 - Crecimiento a pH 5
- Crecimiento a pH 8
- Crecimiento a 2, 5, 7 y 10 % de NaCl
- 25 - Crecimiento en presencia de lisozima
- Crecimiento a 10i C, 40i C y 65i C
- 30 - Oxidasa
- Ureasa

Concretamente, tales pruebas se realizan utilizando los siguientes medios y reactivos específicos:

- 35 1. Prueba de Catalasa: Un medio en el que se pone de manifiesto la producción de catalasa junto a un reactivo específico para detectara que comprende:

1.a. El medio:

- | | | |
|----|--|-----------|
| 40 | - Fuente de nitrógeno asimilable orgánica o inorgánica | 0,1-1 % |
| | - Sales minerales | <0,1 % |
| | - Glucosa | 0,1-1 % |
| | - Peptona o mezcla de aminoácidos | 0,1-1 % |
| 45 | - Extracto de levadura | 0,1-0,5 % |

1.b. El reactivo:

- | | |
|--|---------|
| - Agua oxigenada o peróxido de hidrógeno | 10-40 % |
|--|---------|

- 50 2. Prueba de Crecimiento en anaerobiosis en caldo de tioglicolato: Un medio en el que se pone de manifiesto el crecimiento en condiciones de anaerobiosis, que comprende:

- | | | |
|----|------------------------|------------------|
| 55 | - Extracto de levadura | 4-5 % |
| | - Peptona de caseína | 1-1-5 % |
| | - Glucosa | 0,2-0,5 % |
| | - Cloruro sódico | 0,1-0,2 % |
| | - L-cisteína | 0,04-0,05 % |
| | - Tioglicolato sódico | 0,05-0,15 % |
| 60 | - Bisulfito sódico | 0,008-0,01 % |
| | - Resazurina | 0.0001-0,00015 % |

ES 2 164 537 B1

3. Test de Voges-Proskauer o producción de acetoina: Un medio en el que se pone de manifiesto la producción de acetoina junto a un reactivo específico para detectara que comprenden:

3.a. El medio:

5	- Peptona	0,5-0,7 g
	- Glucosa	0,3-0,5 g
	- Extracto de levadura	0,1-0,5 %
	- Cloruro sódico	0,3-0,5 g
10	- Ácidos o bases simples precisos para ajustar el pH a 6,5	

3.b. Los reactivos:

15	- Hidróxido sódico	35-45 %
	- Creatina	9-11 mg

4. Producción de ácido a partir de D-Glucosa, L-Arabinosa, D-xylosa, D-manitol: Medios en los que se pone de manifiesto, la producción de ácido a partir de azúcares, que comprenden:

20	- Fuente de nitrógeno asimilable orgánica o inorgánica	0,1-1 %
	- Sales minerales	<0,1 %
	- D-Glucosa, L-Arabinosa, D-Xilosa o D-Manitol	0,5-1 %
	- Un indicador de pH con zona de viraje entre 6 y 8	0,001 %

25 5. Hidrólisis de caseína: Un medio en el que se pone de manifiesto la hidrólisis de caseína, que comprende:

	- Leche en polvo desnatada	9-11 %
	- Extracto de levadura	0.2-0,3 %

30 6. Hidrólisis de gelatina: Un medio en el que se pone de manifiesto la hidrólisis de gelatina, que comprende:

	- Gelatina	12-15 %
	- Extracto de levadura	0,2-0,4 %

35 7. Hidrólisis de almidón: Un medio en el que se pone de manifiesto la hidrólisis de almidón junto a un reactivo específico para detectara, que comprende:

7.a. El medio:

40	- Almidón de patata	0,5-1 %
	- Extracto de levadura	0,1-1 %
	- Triptona	0,1-1 %
45	- Paranitrofenilmaltopiranosidos α o β	0,12-0,25 %

7.b. El reactivo:

	- Alcohol de 96°	10 mL
--	------------------	-------

50 8. Producción de β -galactosidasa: Un medio en el que se pone de manifiesto la producción de β -galactosidasa junto a un reactivo específico para detectara que comprenden:

8.a. El medio:

55	- Extracto de levadura	0,1-1 %
	- Triptona	0,1-1 %
	- Paranitrofenil β -galactopiranosidos	0,1-0,2 %

60

ES 2 164 537 B1

- 8.b. El reactivo:
- NaCO_3 0,2-0,4%
9. Utilización de citrato: Un medio en el que se pone de manifiesto la utilización de citrato, que comprende:
- Citrato trisódico 0,5%
 - Sulfato de magnesio. 7 H_2O 0,1-0,2%
 - Fosfato monosódico 0,005-0,01%
 - Nitrato amónico 0,02-0,07%
 - Cloruro potásico 0,1-0,12%
 - Indicador de pH con zona de viraje entre 6 y 8 0,001%
10. Utilización de propionato: Un medio en el que se pone de manifiesto la utilización de propionato, que comprende:
- Propionato sódico 0,2-1%
 - Sulfato de magnesio. 7 H_2O 0,1-0,2%
 - Fosfato monosódico 0,005-0,01%
 - Nitrato amónico 0,02-0,07%
 - Cloruro potásico 0,1-0,12%
 - Indicador de pH 6-8 0,001%
11. Desaminación de fenilalanina: Un medio y un reactivo con los que se pone de manifiesto la desaminación de fenilalanina, que comprenden:
- 11.a. El medio:
- Extracto de levadura 0,3-0,5%
 - DL-fenilalanina 0,18-0,22%
 - Hidrógeno fosfatodisódico 0,05-0,1%
 - Cloruro sódico 0,2-0,5%
- 11.b. El reactivo:
- Cloruro férrico 10%
12. Reducción de nitratos: Un medio y reactivos en los que se pone de manifiesto la reducción de nitratos, que comprenden:
- 12.a. El medio:
- Peptona 0,3-0,7%
 - Extracto de carne 0,1-0,4%
 - Nitrato potásico 0,05-0,2%
- 12.b. Los reactivos:
- A:
- Acido sulfanílico 0,8%
 - Acido acético glacial 5 Normal
- B:
- Dimetil α -naftilamina 5 mL
 - Acido acético glacial 5 Normal
13. Crecimiento a pH 6,8: Un medio en el que se pone de manifiesto el crecimiento a pH 6,8, que comprende:
- Extracto de carne 0,2-0,3%
 - Extracto de levadura 0,1-0,4%
 - Tampón fosfato a pH=6,8 0,02%
 - Peptona 0,4-0,5%

ES 2 164 537 B1

14. Crecimiento a pH 5,7: Un medio en el que se pone de manifiesto el crecimiento a pH 5,7, que comprende:

5	- Peptona	1 %
	- Glucosa	1-2 %
	- Fosfato monosódico	0,2-0,3 %
	- Fosfato disódico	Hasta pH 5,7

15. Crecimiento a pH 5: Un medio en el que se pone de manifiesto el crecimiento a pH 5, que comprende:

10	- Peptona	1 %
	- Glucosa	1-2 %
	- Fosfato monosódico	0,3-0,5 %
15	- Fosfato disódico	Hasta pH 5

16. Crecimiento a pH 8: Un medio en el que se pone de manifiesto el crecimiento a pH 8, que comprende:

20	- Peptona	1 %
	- Glucosa	1-2 %
	- Fosfato disódico	0,3-0,5 %
	- Fosfato monosódico	Hasta pH 8

17. Crecimiento a 2, 5, 7 y 10 % de NaCl: Un medio en el que se pone de manifiesto el crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl, que comprende:

25	- Extracto de carne	0,2-0,3 %
	- Peptona	0,4-0,5 %
30	- NaCl	2,5,7 ó 10 %

18. Crecimiento en presencia de lisozima: Un medio en el que se pone de manifiesto el crecimiento en presencia de lisozima, que comprende:

35	- Extracto de carne	0,2-0,3 %
	- Peptona	0,4-0,5 %
	- Lisozima	1000 ui/mL

19. Crecimiento a 10, 40 y 65i C: Un medio en el que se pone de manifiesto el crecimiento en diferentes temperaturas de incubación, que comprende:

40	- Extracto de carne	0,2-0,3 %
	- Peptona	0,4-0,5 %
45	- NaCl	0,1-0,2 %

20. Producción de oxidasa: Un medio y un reactivo con los que se pone de manifiesto la producción de oxidasa, que comprende:

20.a. El medio:

50	- Nitrato amónico	0,05-0,1 %
	- Extracto de levadura	0,05-0,07 %
	- Glucosa	0,5-0,7 %
55	- Sulfato de magnesio	0,01-0,05 %
	- Fosfato disódico	0,02-0,1 %

20.b. El reactivo:

60	- NNNNTetrametilparafenilendiaminadihidroclorhidrato	0,1 %
----	--	-------

ES 2 164 537 B1

21. Producción de ureasa: Un medio en el que se pone de manifiesto la producción de ureasa, que comprende:

5	- Glucosa	0,2-1 %
	- Fuente de nitrógeno orgánica o inorgánica	
	- Sales minerales	<0,1 %
	- Vitaminas	<0,05 %
	- Urea	1,5-2,5 %
10	- Un indicador de pH con una zona de viraje entre pH 6 y 8	

Todos estos medios se han de incubar a la temperatura óptima del crecimiento de la cepa objeto de estudio, si bien para los termófilos cuyo rango de temperaturas de crecimiento incluya temperaturas menores de 40°C es preferible incubarlos a esas temperaturas.

15 En general, para facilitar el crecimiento de los denominados “fastidiosos” puede añadirse a todos los medios una solución que contenga vitaminas del grupo B, pantotenato y ácido nicotínico.

20 Asimismo se puede añadir soluciones de sales minerales en cantidades traza que aporten potasio, fósforo, magnesio, calcio, cloruros, sodio, sulfatos, cobre, manganeso, zinc, cobalto, molibdeno y/o boro.

Por último se indica que los kits para llevar a cabo el procedimiento de la invención pueden presentarse en placas Petri, tubos, microtubos, microplacas o cualquier otro soporte miniaturizado o no.

25 A continuación, la invención es ilustrada por el siguiente ejemplo no limitativo.

Ejemplo 1

30 Se procede al aislamiento de colonias a partir de una muestra de suelo utilizando el método estándar de diluciones seriadas sobre un medio que contenga glucosa y extracto de levadura. Por el método estándar de tinción Gram se revela la presencia de Bacilos Gram positivos y la tinción de esporas (método Wirtz) revela la presencia de un bacilo Gram positivo esporulado. Se siembra una colonia aislada en una placa que contenga el mismo medio de cultivo anteriormente mencionado. A continuación se procede a la suspensión de una o varias colonias de este cultivo en agua estéril hasta obtener una concentración celular aproximada de 10^8 células/ml. Se siembran 100µl de esta suspensión y se inoculan todos los tubos de la batería objeto de la patente. Se procede a la lectura de los resultados, basándonos en los siguientes criterios

Producción de ácido a partir de azúcares (los especificados en la patente):

40 positivo: amarillo negativo: azul o verde

Crecimiento en distintas concentraciones de cloruro sódico (2, 5 y 7%):

positivo: turbio negativo: transparente

45 Crecimiento a distintos pH

positivo: turbio negativo: transparente

Crecimiento a 10, 40 y 65°C

50 positivo: turbio negativo: transparente

Utilización de citrato y propionato: Siembra en zig-zag

positivo: azul negativo: amarillo

55 Caseinasa (hidrólisis de caseína): Siembra en estría recta por el medio de la lengüeta

positivo: halo transparente negativo: ausencia de halo

Fenilalanina desaminasa: siembra en zig-zag. Revelar al cabo de 48h con el reactivo correspondiente.

60 positivo: azul verdoso negativo: amarillodorado

ES 2 164 537 B1

Reducción de Nitratos: revelar al cabo de 48h con los reactivos de los nitratos.

positivo: rojo negativo: incoloro

5 Voges-Proskauer (producción de acetoina): antes de revelar medir el pH con pHmetro.

positivo: rosa negativo: incoloro

Gelatinasa

10 positivo: liquefacción del medio de cultivo negativo: ausencia de liquefacción

Amilasas:

positivo: halo de lisis alrededor de las colonias al añadir lugol o alcohol de 96°

15 negativo: ausencia de halo

Beta-galactosidasa:

positivo: color amarillo negativo: incoloro

20 Crecimiento en presencia de lisozima:

positivo: turbidez negativo: ausencia de turbidez

Ureasa:

25 positivo: rojo negativo: amarillo

Crecimiento anaerobio en caldo de tioglicolato:

positivo: crecen hasta el fondo negativo: crecen sólo en la superficie

30 Catalasa: añadir agua oxigenada después de 48 de incubación

positivo: burbujas negativo: ausencia de burbujas

Oxidasa:

35 positivo: morado negativo: incoloro

Finalmente se procede al análisis de los resultados e identificación de las especies de acuerdo con las tablas oficiales que figuran en el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática de 1986.

40 Por ejemplo, una cepa de *Bacillus subtilis* presenta las siguientes características en estos medios:

- Catalasa: positivo

- Crecimiento en anaerobiosis en caldo de tioglicolato: negativo

45

- Voges-Proskauer: positivo

- Acido de glucosa, xilosa, arabinosa y manitol: positivo

50 - Gas de glucosa: negativo

- Caseinasa: positivo

- Gelatinasa: positivo

55

- Amilasas: positivo

- Citrato: positivo

60 - Propionato: negativo

- Fenilalanina desaminasa: negativo

ES 2 164 537 B1

- Reducción de nitrato: positivo
- Crecimiento a pH 6,8 y 5,7: positivos
- 5 - Crecimiento a pH 5 y 8: débil o negativo
- Crecimiento en cloruro sódico: 2, 5 y 7%: positivos
- 10 - Crecimiento a 10, 40: positivo
- Crecimiento a 65°C: negativo
- Beta-galactosidasa: positivo
- 15 - Oxidasa: positiva
- Crecimiento en lisozima: positiva
- 20 - Ureasa: negativa

Mientras que una cepa de *Bacillus circulans* presenta las siguientes características en estos medios:

- Catalasa: positivo
- 25 - Crecimiento en anaerobiosis en caldo de tioglicolato: negativo
- Voges-Proskauer: negativo
- 30 - Acido de glucosa, xilosa, arabinosa y manitol: positivo
- Gas de glucosa: negativo
- Caseinasa: positivo
- 35 - Gelatinasa: positivo
- Amilasas: positivo
- 40 - Citrato: positivo
- Propionato: negativo
- Fenilalanina desaminasa: negativo
- 45 - Reducción de nitrato: positivo
- Crecimiento a pH 6,8 y 5,7: positivos
- 50 - Crecimiento a pH 5 y 8: débil o negativo
- Crecimiento en cloruro sódico: 2, 5 y 7%: positivos
- Crecimiento a 10, 40°C: positivo
- 55 - Crecimiento a 65°C: negativo
- Beta-galactosidasa: negativa
- 60 - Oxidasa: positiva
- Crecimiento en lisozima: positiva

ES 2 164 537 B1

- Ureasa: negativa

De acuerdo con estos resultados estas dos especies se diferencian en varias pruebas que por tanto
5 permiten la identificación de cada una de las especies. Esto mismo ocurre en el resto de las especies de
la base de datos.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Kit para la identificación de bacilos gram positivos esporulados aerobios o anaerobios facultativos de la familia Bacillaceae, presentes en muestras clínicas o veterinarias, de alimentos tanto de origen vegetal como animal, de agua, suelo, atmósferas y, en general, de cualquier tipo de muestras, **caracterizado** porque incluye, en combinación, la realización de las siguientes pruebas:

- Catalasa;
- 10 - Crecimiento en anaerobiosis en caldo de tioglicolato;
- Test de Voges-Proskauer;
- Producción de ácido a partir de D-Glucosa, L-Arabinosa, D-xylosa, D-manitol;
- 15 - Hidrólisis de caseína;
- Hidrólisis de gelatina;
- 20 - Hidrólisis de almidón;
- β -galactosidasa;
- Utilización de citrato y propionato;
- 25 - Desaminación de fenilalanina;
- Reducción de nitratos;
- 30 - Crecimiento a pH 6.8;
- Crecimiento a pH 5.7;
- Crecimiento a pH 5;
- 35 - Crecimiento a pH 8;
- Crecimiento a 2, 5, 7 y 10 % de NaCl;
- 40 - Crecimiento en presencia de lisozima;
- Crecimiento a 10i C, 40i C y 65i C;
- Oxidasa;
- 45 - Ureasa,

2. Procedimiento para la identificación de bacilos gram positivos esporulados aerobios o anaerobios facultativos de la familia Bacillaceae, mediante el kit descrito en la reivindicación 1, que comprende las etapas de:

- (a) aislar las bacterias en un medio sólido en placas adecuado para su crecimiento a la temperatura y pH adecuados para cada cepa a aislar;
- 55 (b) incubar el medio resultante;
- (c) realizar una tinción de Gram y una tinción de esporas y
- (d) sembrar, a partir de este medio, una colonia o suspensión de bacilos Gram positivos esporulados en los medios de cultivo adecuados para la realización de las pruebas deseadas; y
- 60 (e) identificar la cepa aislada comparando los resultados de dichas pruebas con los de una base de datos patrones,

ES 2 164 537 B1

caracterizado porque los citados medios de cultivo y reactivos identificadores son los específicos para cada prueba.

5 3. Procedimiento, según la reivindicación 2, **caracterizado** porque cuando los citados medios de cultivo son sólidos o semisólidos, se incorporara en los mismos 0,7 -2% de agar.

4. Procedimiento, según la reivindicación 2, **caracterizado** porque en el conjunto de medios se utilizan sales minerales que aporten potasio, fósforo, magnesio, calcio, cloruros, sodio, sulfatos, cobre, manganeso, zinc, cobalto, molibdeno y/o boro.

10 5. Procedimiento, según la reivindicación 2, **caracterizado** porque en el conjunto de medios se utilizan vitaminas del grupo B, pantotenato y ácido nicotínico.

15 6. Procedimiento según las reivindicaciones 2 a 5, **caracterizado** porque los conjuntos de medios de cultivo se presentan en placas de Petri, tubos, microtubos, o cualquier soporte miniaturizado o no.

20

25

30

35

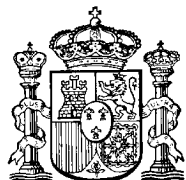
40

45

50

55

60



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C12Q 1/04

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	SNEATH et al. "Bergey's manual of Systematic Bacteriology", Baltimore (USA). Williams & Wilkings, 1986. Volumen 2, páginas 1114-1138.	1,2
Y	COLLINS C.H. et al. "Microbiological Methods", London. Butterworths, 1987. Páginas 98-100,105-113.	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 n.º:

Fecha de realización del informe

11.01.2002

Examinador

A. Collados Martín Posadillo

Página

1/1