



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 272 817**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02804610 .0**

86 Fecha de presentación : **12.12.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1453969**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **08.09.2004**

54 Título: **Procedimiento de detección de microorganismos.**

30 Prioridad: **13.12.2001 FR 01 16106**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.05.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.05.2007**

73 Titular/es: **Alain Rambach**  
**73 bld. Montparnasse**  
**F-75006 Paris, FR**

72 Inventor/es: **Rambach, Alain**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 272 817 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).

# ES 2 272 817 T3

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de detección de microorganismos.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar unos microorganismos presentes en una muestra, en el que se inocula con dicha muestra un medio de cultivo, conteniendo dicho medio de cultivo preferentemente unos agentes cromógenos que liberan unos cromóforos en presencia de los microorganismos diana o de unos agentes fluorógenos, encontrándose dicho medio de cultivo en un recipiente que presenta un fondo coloreado, la detección es facilitada por el contraste entre el fondo coloreado del recipiente y las colonias aisladas.

10 Es indispensable una detección rápida de microorganismos presentes en unas muestras biológicas, alimenticias, o en el medio hospitalario, con el fin de definir lo más rápidamente posible las medidas a tomar en caso de contaminación.

15 Parece también importante poder diferenciar los diferentes contaminantes, con el fin de poder proceder a unas desinfecciones adecuadas.

Existen unos procedimientos, como el PCR, que es rápido y específico, pero que precisa el empleo de aparatos como los termocicladores, que no se puede utilizar siempre en el medio hospitalario. Por otra parte, este método puede 20 requerir una preparación de las muestras a ensayar, lo que no es siempre fácil de realizar.

Se han descrito unos procedimientos basados en el cultivo de los microorganismos contaminantes en unos medios adecuados, y en su identificación mediante la adición de agentes cromógenos que liberan un cromóforo después de la acción de una enzima específica del microorganismo.

25 Así, las solicitudes de patente WO 00/53799, WO 00/46345, WO 97/39103, WO 95/04156, WO 94/09152, US-A-6 087 156, WO 98/48042 y US-A-6130057 describen unos medios de cultivo para identificar los estafilococos, las bacterias anaerobias o los coliformes enterohemorrágicos, las salmonelas u otros microorganismos tales como los *Candida*.

30 De todas formas, siendo los medios utilizados relativamente transparentes, a veces puede ser difícil determinar los colores de los cromóforos liberados, debido a la falta de un contraste suficiente. Así la utilización del medio C descrito en la solicitud de patente WO 95/04156 permite una buena discriminación de las diferentes levaduras *Candida*, pero los colores obtenidos son claros, lo que puede ser problemático para ciertos usuarios.

35 Así mismo, el procedimiento descrito en la solicitud WO 00/46345 para identificar los estafilococos puede necesitar la adición de un agente de contraste en el medio de cultivo, por ejemplo un opacificante.

Una necesidad de este tipo de contraste se hace también sentir para unos medios para detectar las salmonelas, tal como el Rambach Agar vendido por la sociedad Chromagar (Paris, Francia).

40 Se ha propuesto en particular añadir kaolín para opacificar los medios, en particular para detectar *E. Coli*, con ayuda del fenilglucurónido. De todas formas, la adición de este tipo de componente, además de que aumenta los costes de fabricación del medio, puede plantear numerosos problemas para la fabricación industrial de los medios de detección (en particular problemas de precipitaciones).

El documento EP 0103915 describe un procedimiento para la detección visual de una intensidad coloreada de un líquido en una serie de recipientes con diferentes concentraciones de colorantes, pudiendo dichos recipientes ser coloreados.

50 La presente invención propone responder al problema planteado por la falta de contraste observado entre las colonias aisladas y el medio de cultivo, en particular cuando estas colonias están coloreadas debido a la presencia de unos agentes cromógenos en el medio de cultivo.

55 Así, la presente invención se refiere a un procedimiento para detectar unos microorganismos presentes en una muestra que comprende las etapas que consisten en:

- 60 a) preparar un medio de cultivo adaptado a dichos microorganismos diana,
- b) verter dicho medio en un recipiente que presente un fondo coloreado,
- c) inocular el medio de cultivo sólido de a) con dicha muestra o un inoculum derivado de la muestra e incubar,
- 65 d) detectar la presencia de dichos microorganismos en dicho medio de cultivo utilizando el contraste entre el color de fondo del recipiente y las colonias aisladas.

## ES 2 272 817 T3

En un modo de realización preferido, la invención se refiere a un procedimiento para detectar unos microorganismos presentes en una muestra mediante la liberación enzimática de cromóforos a partir de unos agentes cromógenos presentes en un medio de cultivo adaptado a dichos microorganismos que comprende las etapas que consisten en:

- a) preparar un medio de cultivo adecuado que contenga los agentes cromógenos apropiados para la detección de los microorganismos diana,
- b) verter dicho medio en un recipiente que presente un fondo coloreado,
- c) inocular el medio de cultivo sólido de a) con dicha muestra o un inoculum derivado de la muestra, e incubar,
- d) detectar la presencia de los microorganismos presentes en dicha muestra, en dicho medio de cultivo, utilizando el contraste asociado al color de fondo del recipiente respecto a la coloración debida a los cromóforos liberados.

En otro modo de realización, el medio de cultivo contiene unos productos que le dan una coloración (por ejemplo, el McConkey Agar...).

En otro modo de realización, el medio de cultivo contiene unos agentes fluorógenos que liberan unos fluoróforos en presencia de unos microorganismos diana. En particular se puede utilizar el 4-metilumbelliferil, como fluoróforo, por ejemplo unido a una galactosidasa (4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-galactosidasa).

En un modo de realización preferido, el recipiente según la invención tiene forma redonda y en particular de una caja de Petri, de un diámetro que va de 40 mm a 210 mm. Preferentemente, el diámetro del recipiente según la invención es igual a 47 mm, 55mm, 90 mm, 100 mm ó 200 mm.

En un modo de realización preferido de la invención, la superficie del recipiente es tal que es posible inocular el medio de cultivo contenido en el recipiente de tal manera que se obtiene el crecimiento de colonias aisladas. Así, la superficie del recipiente según la invención es preferentemente superior a aproximadamente 15-17 cm<sup>2</sup>.

En un modo de realización de la presente invención, dicho recipiente presenta un fondo coloreado opaco. En otro modo de realización, dicho recipiente presenta un fondo coloreado transparente. Preferentemente, dicho recipiente presenta un fondo de un color escogido entre los colores azul, rojo, amarillo, negro o blanco opaco.

En un modo de realización de la invención, dichos cromóforos u otros productos coloreados son liberados por hidrólisis debido a la acción de una enzima específica del microorganismo sobre los agentes cromógenos presentes en el medio de cultivo, y dicho(s) agente(s) cromógeno(s) es(son) escogido(s) entre los sustratos de las enzimas asociados al metabolismo de los azúcares, y en particular en el grupo constituido por los sustratos de la  $\beta$ -glucosidasa, unos sustratos de la  $\beta$ -galactosidasa, y unos sustratos de la  $\beta$ -glucuronidasa, y unos sustratos de la fosfatasa.

Preferentemente, dicho(s) cromóforo(s) es(son) escogido(s) en el grupo constituido por unos derivados indoxilo, halógenoindoxilo (bromoindoxilo, cloroindoxilo, fluoroindoxilo, iodoindoxilo, dicloroindoxilo, clorobromoindoxilo, tricloroindoxilo), metilindoxilo, y la hidroxiquinolina, en particular entre los siguientes derivados: 6-cloroindoxilo, 5-bromoindoxilo, 3-bromoindoxilo, 6-fluoroindoxilo, 5-iodoindoxilo, 4,6-dicloroindoxilo, 6,7-dicloroindoxilo, 5-bromo-4-cloroindoxilo, 5-bromo-6cloroindoxilo, 4,6,7-tricloroindoxilo, N-metilindoxilo o 8-hidroxiquinolina.

Con el fin de poder limitar el crecimiento de los microorganismos que no se buscan, es ventajoso que el medio de cultivo contenga también unos factores selectivos para los microorganismos buscados.

En un modo de realización particular, el medio de cultivo contiene también una concentración elevada de sacarosa o de glucosa.

El procedimiento de la invención es utilizado ventajosamente cuando el microorganismo diana es de la especie *Candida*, en particular con el *Chromagar Candida* descrito en el documento WO 95/04156. Se utiliza entonces un recipiente coloreado, transparente u opaco, dependiendo el color de la naturaleza de la levadura más buscada.

El procedimiento de la invención está también particularmente adaptado cuando dicho microorganismo diana es de la especie *Staphylococcus* y se escoge entonces preferentemente dicho recipiente para que presente un fondo coloreado opaco, preferentemente blanco opaco.

Se puede también utilizar el procedimiento cuando dicho microorganismo diana es de la especie *Vibrio*, de la especie de los coliformes y en particular de las bacterias *E. coli* enterohemorrágicas.

Se utilizan en particular las enseñanzas de las solicitudes de patente WO 00/53799, WO 00/46345, WO 97/39103, WO 95/04156, WO 94/09152, para definir los colores de los microorganismos en función de la naturaleza de los medios obtenidos.

## ES 2 272 817 T3

La invención se refiere también a un kit de detección de microorganismos, constituido por la combinación de un recipiente que presenta un fondo coloreado con un medio de cultivo que contiene preferentemente unos agentes cromógenos que liberan unos cromóforos en presencia de dichos microorganismos diana.

5 La invención tiene también por objeto la utilización de un recipiente que presenta un fondo coloreado como soporte en el que se vierte un medio de cultivo que contiene preferentemente unos agentes cromógenos que liberan unos cromóforos después de la acción de unas enzimas específicas presentes en unas cepas de microorganismos.

10 El color de los recipientes utilizados (en general cajas de Petri) es ventajosamente escogido de tal manera que presenta un contraste útil con las colonias de microorganismos, o los cromógenos utilizados. El contraste útil es definido como un contraste que ayuda a la discriminación de los colores de las colonias, con respecto al fondo de la caja. Así, cuando el medio de cultivo no contiene cromógenos, las colonias son generalmente claras y el fondo del recipiente es mas bien oscuro.

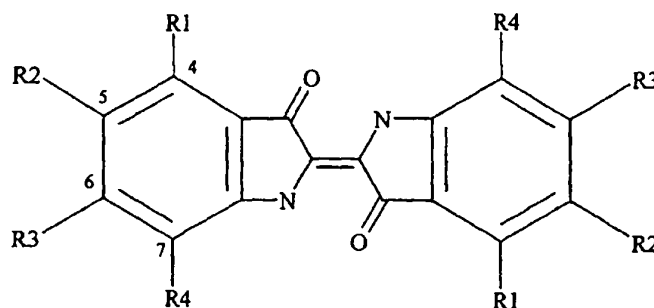
15 El color de fondo de la caja es también escogido en función del color de los cromóforos liberados. Así, el cromógeno azul 5-bromo-4-cloro-3-indoxil presenta una absorción a 615 nm, que se puede fácilmente diferenciar cuando se utilizan cajas rojas (aproximadamente 515 nm). Para los cromógenos que producen unas colonias malva, roja, o púrpura, se utilizan unas cajas con un color tal que la longitud de onda está alejada, por ejemplo unas cajas amarillas. Cuando se obtienen unas colonias de color claro, se utilizan unas cajas de color oscuro y/o opacas

Cromógeno	Color	Absorción max (nm)	Color de la caja (ejemplo)
5-Bromo-4-Cloro-3-indoxil	Azul	615	Rojo
5-Bromo-6-cloro-3-indoxil	Rojo púrpura (Magenta)	565	Amarillo
6-cloro-3-indoxil	Gris púrpura (Salmón)	540	Blanco opaco, o color oscuro

35 Los cromóforos utilizables para la realización de la presente invención tienen entonces la siguiente fórmula general, y son obtenidos por oxidación de un agente cromógeno unido a un sustrato enzimático. Estos cromóforos son insolubles, lo que provoca la formación de un precipitado coloreado. Se observa que los cromóforos pueden ser obtenidos después de la acción de las glicosidasas, pero también después de la acción de las fosfatasa.

40 Se puede obtener una lista de agentes cromógenos del documento US nº 6.130.057.

Fórmula de cromóforos utilizables en el marco de la invención:



R1	R2	R3	R4	Color
H	H	H	H	Azul
Cl	Br	H	H	Azul
H	Br	Cl	H	Magenta
H	H	Cl	H	Salmón
H	I	H	H	Púrpura
H	Br	H	H	Azul

## ES 2 272 817 T3

Otra ventaja del procedimiento y del kit según la invención es la posibilidad de localizar fácilmente las cajas que comprenden ciertos agentes. En efecto, los medios que contienen unos agentes cromógenos son incoloros antes de la reacción de los microorganismos y liberación de los cromóforos. Su acondicionamiento en unas cajas de color se ha mostrado por lo tanto útil para guardar y volver a encontrar fácilmente los medios de interés, siendo escogido el color de la caja en función de los y correlacionada con los cromógenos presentes en el medio, y a los colores esperados en presencia de microorganismos.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para detectar unos microorganismos presentes en una muestra que comprende las etapas que consisten en:
- a) preparar un medio de cultivo adaptado a dichos microorganismos diana,
  - b) verter dicho medio en un recipiente que presenta un fondo coloreado,
  - 10 c) inocular el medio de cultivo sólido de a) con dicha muestra o un inoculum derivado de la muestra e incubar,
  - d) detectar la presencia de dichos microorganismos en dicho medio de cultivo utilizando el contraste entre el color de fondo del recipiente y las colonias aisladas.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho medio de cultivo contiene unos agentes fluorógenos que liberan unos fluoróforos en presencia de dichos organismos diana.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho medio de cultivo contiene unos agentes cromógenos apropiados para la detección de unos microorganismos diana, mediante la liberación enzimática de cromóforos a partir de dichos agentes cromógenos.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque dicho recipiente presenta un fondo de un color coloreado opaco.
- 25 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque dicho recipiente presenta un fondo coloreado transparente.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque dicho recipiente presenta un fondo de un color escogido entre los colores azul, rojo, amarillo, negro, o blanco opaco.
- 30 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 3 a 6, **caracterizado** porque dichos cromóforos son liberados por hidrólisis debido a la acción de una enzima específica del microorganismo sobre los agentes cromógenos presentes en el medio de cultivo.
- 35 8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** porque el(los) dicho(s) agente(s) cromógeno(s) es (son) escogido(s) entre los sustratos de las enzimas asociados al metabolismo de los azúcares, y en particular en el grupo constituido por unos sustratos de la  $\beta$ -glucosidasa, de unos sustratos de la  $\beta$ -galactosidasa, y de unos sustratos de la  $\beta$ -glucuronidasa.
- 40 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 3 a 8, **caracterizado** porque dicho(s) cromóforo(s) es (son) escogido(s) en el grupo constituido por los derivados indoxilo, halógenoindoxilo (bromoindoxilo, cloroindoxilo, fluoroindoxilo, yodoindoxilo, dicloroindoxilo, clorobromoindoxilo, tricloroindoxilo), metilindoxilo, y la hidroxiquinolina, en particular entre los siguientes derivados: 6-cloroindoxilo, 5-bromoindoxilo, 3-bromo indoxilo, 6-fluoroindoxilo, 5 iodoindoxilo, 4,6-dicloroindoxilo, 6,7 dicloroindoxilo, 5-bromo-4 cloroindoxilo, 5-bromo-6-cloroindoxilo, 4,6,7-triclotroindoxilo, N-metil-indoxilo ó 8-hidroxiquinolina.
- 45 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque el medio de cultivo contiene también unos factores selectivos para los microorganismos buscados.
- 50 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque el microorganismo diana es de la especie *Candida*.
- 55 12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4 y 7 a 10, **caracterizado** porque dicho organismo diana es de la especie *Staphylococcus* y que dicho recipiente presenta un fondo coloreado opaco, preferentemente blanco opaco.
13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque dicho microorganismo diana es de la especie *Vibrio*.
- 60 14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque dicho microorganismo diana es de la especie de los coliformes y en particular de las bacterias *E. coli* enterohemorrágicas.
- 65 15. Kit para la detección de microorganismos, constituido por la combinación de un recipiente que presenta un fondo coloreado y de un medio de cultivo, siendo escogido el color de dicho recipiente tal que presenta un contraste útil con el color de las colonias aisladas.

## ES 2 272 817 T3

16. Kit según la reivindicación 15, **caracterizado** porque dicho medio de cultivo contiene unos agentes fluorógenos que liberan unos fluoróforos en presencia de dichos microorganismos diana.

5 17. Kit según la reivindicación 15, **caracterizado** porque dicho medio de cultivo contiene unos agentes cromógenos que liberan unos cromóforos en presencia de dichos microorganismos diana, siendo escogido el color de dicho recipiente de tal manera que presente un contraste útil con el color de los cromóforos liberados.

10 18. Utilización de un recipiente que presenta un fondo coloreado como soporte en el que se vierte un medio de cultivo apropiado para el crecimiento de microorganismos, permitiendo el color de fondo del recipiente un contraste con las colonias de dichos microorganismos.

19. Utilización según la reivindicación 18, **caracterizada** porque dicho medio de cultivo contiene unos agentes fluorógenos que liberan unos fluoróforos en presencia de dichos microorganismos diana.

15 20. Utilización según la reivindicación 18, **caracterizada** porque dicho medio de cultivo contiene unos agentes cromógenos que liberan unos cromóforos después de la acción de las enzimas específicas presentes en unas cepas de microorganismos, siendo escogido el color de dicho recipiente de tal manera que presenta un contraste útil con el color de los cromóforos liberados.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65