

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
3 de Enero de 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 02/00921 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C12Q 1/04 //
(C12Q 1/04, C12R 1:05, 1:19, 1:22, 1:37, 1:385, 1:42)

RODRIGUEZ MARTINEZ, Claudio [CU/CU]; Edificio 2, Apto. 3, Comunidad Científica Bejucal, Provincia La Habana (CU). **QUESADA MUÑOZ, Vivian de Jesús** [CU/CU]; Calle 22 No. 1104 entre 17 y Final, Quivicán, Provincia La Habana (CU).

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/CU01/00004

(22) Fecha de presentación internacional:
29 de Junio de 2001 (29.06.2001)

(74) Mandatario: **MORENO SAMPER, Olga, Lidia**; Lex, S.A., Ave. 1ra No. 1001, Esq. 10, Miramar, Playa, Ciudad Habana 11300 (CU).

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(81) Estados designados (*nacional*): BR, CA, JP, MX, RU, US.

(30) Datos relativos a la prioridad:
160/2000 29 de Junio de 2000 (29.06.2000) CU

(84) Estados designados (*regional*): patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(71) Solicitante (*para todos los Estados designados salvo US*): **CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS** [CU/CU]; Carretera Beltrán Km 1 1/2, Bejucal, Provincia La Habana 6048 (CU).

Publicada:
— con informe de búsqueda internacional
— antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (*para US solamente*): **TSO-RAEVA, Anna** [RU/CU]; Edificio 3, Apto. 4, Comunidad Científica Bejucal, Provincia La Habana (CU).

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: NUTRITIONAL MIXTURE AND METHOD FOR EARLY IDENTIFICATION AND COUNT OF GRAM-NEGATIVE ORGANISMS

(54) Título: MEZCLA NUTRITIVA Y PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y RECuento TEMPRANO DE ORGANISMOS GRAM-NEGATIVOS

(57) Abstract: The invention relates to the field of microbiology, more particularly to a nutritional mixture and to a method for early identification and count of gram-negative microorganisms. Five different colors, three-colored fluorescent emissions, three-colored halos and opaque precipitation zones around the colonies appear in the culture medium depending on the microorganism in question. This makes it possible to establish differentiation with a high degree of sensitivity and specificity. The mixture comprises specific ratios of protein fractions that are rich in free or combined tryptophan, organic and/or inorganic salts, substances that provide color or fluorescence, growth inhibitors of gram-positive organisms, in addition to cellulose and hemicellulose and other components which provide the solid structure of the culture medium.

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con la microbiología, en concreto con una mezcla nutritiva y con un procedimiento para la identificación y el recuento temprano de microorganismos Gram negativos. En el medio de cultivo aparecen 5 colores diferentes, emisiones fluorescentes de 3 colores, halos de 3 colores y zonas de precipitación opaca alrededor de las colonias dependiendo del microorganismo de que se trate, todo lo cual permite la diferenciación con un alto grado de sensibilidad y especificidad. La mezcla comprende relaciones específicas de fracciones proteicas ricas en triptófano, libre o combinado, sales orgánicas y/o inorgánicas, sustancias que proporcionan color o fluorescencia, inhibidores de crecimiento de microorganismos Gram positivos, así como celulosa y hemicelulosa y otros componentes que proporcionan la estructura sólida al medio de cultivo.



WO 02/00921 A1

MEZCLA NUTRITIVA Y PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y RECuento TEMPRANO DE ORGANISMOS GRAM-NEGATIVOS

Sector Técnico

- 5 La presente invención se relaciona con la Microbiología y particularmente con una mezcla nutritiva y un método para la identificación y el recuento diferenciado y temprano de organismos Gram-negativos.

En el análisis de calidad microbiológica de diferentes productos (agua, alimentos, etc.) se utilizan ampliamente numerosas técnicas para la detección y recuento de microorganismos
10 indicadores, como por ejemplo *E. coli* y organismos coliformes. Sin embargo, continúan las investigaciones con el objetivo de lograr los procedimientos más simples y efectivos.

Generalmente, se conocen muy pocas características bioquímicas que pueden ser atribuidas solamente a un género de bacterias Gram-negativas específico, por ello se necesita el empleo diferentes conjuntos de pruebas apropiadas para lograr un diagnóstico certero.

- 15 Actualmente existe una amplia gama de medios de cultivo para la detección y diferenciación de diversos grupos de bacterias Gram-negativas, algunos de ellos son cualitativos y otros cuantitativos.

El medio Agar Violeta Rojo Bilis incorpora sales biliares y cristal violeta para la inhibición de bacterias Gram-positivas (Soria Melquizo, F. Manual Difco. Décima edición. 1984;
20 Manual MERCK de Medios de Cultivo. 1990; Manual de Medios de Cultivo OXOID. 1995). Este contiene, además, la lactosa e indicador de pH – rojo neutro. Los organismos coliformes, que crecen en el medio, fermentan la lactosa y el rojo neutro le proporciona el color rojo intenso a la colonia y al medio alrededor. Para una diferenciación segura de *E. coli* y coliformes se necesitan las pruebas confirmatorias adicionales, como por ejemplo
25 siembra en el Caldo Verde Brillante con lactosa o estriado en el Agar Eosina Azul de Metileno (Soria Melquizo, F. Manual Difco. Décima edición. 1984; Manual MERCK de Medios de Cultivo. 1990; Manual de Medios de Cultivo OXOID. 1995). También los resultados de las pruebas no se conocen hasta después de 48 h de incubación de la muestra.

Por otra parte existe un grupo de medios de cultivo agarizados para la detección de
30 *Salmonella* que utilizan, como mínimo, dos características bioquímicas de este género que se manifiestan por presencia o ausencia de color en el medio o en la colonia. Entre ellos se puede mencionar Agar Desoxicolato Citrato, Agar Entérico Hektoen, Agar S. S., Agar XLD, Agar de Kristensen y Agar Verde Brillante (Soria Melquizo, F. Manual Difco.

Décima edición. 1984; Manual MERCK de Medios de Cultivo. 1990; Manual de Medios de Cultivo OXOID. 1995).

Estos medios contienen generalmente inhibidores de las bacterias Gram-positivas y de algunas Gram-negativas, por ejemplo, sales biliares, sodio citrato y verde brillante. La
5 detección de *Salmonella* aquí se basa en la habilidad de fermentar uno o más carbohidratos y de producir el gas sulfhídrico en presencia de tiosulfato de sodio y una de las sales de hierro. Estos medios de cultivo en la práctica no son muy específicos ya que varias especies (*Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Citrobacter freundii*) pueden desarrollar colonias incoloras con el centro negro características de *Salmonella*. Además, la producción de H₂S por las
10 cepas de *Salmonella* no ocurre siempre, pues varios factores, tales como el pH del medio y la concentración de oxígeno alrededor de las colonias, pueden influir en esta manifestación bioquímica.

Alain Rambach, en 1993, patentó un medio para la identificación de *Salmonella* (Patente No. US 5 194 374), que incluye el empleo de un sustrato cromogénico que desarrolla el
15 color azul como resultado de la hidrólisis realizada por la enzima β -galactosidasa y la degradación del propilenglicol. La prueba bioquímica principal que se utiliza en este medio para la detección de *Salmonella* consiste en la fermentación de propilenglicol que se visualiza mediante el indicador de pH rojo neutro.

El producto permite sólo identificar las bacterias coliformes y *Salmonella* no *typhi* de
20 *Proteus* y otras bacterias Gram-negativas. Además, en la práctica alrededor del 9 % de las cepas de *Salmonella* pueden poseer la enzima β -galactosidasa y alrededor de 30 % no fermentan el propilenglicol. (Kaluzewski y Tomczuk, Med. Dosw. Mikrobiol., 1995, 47: 155-168)

Roth y colaboradores recibieron la aprobación de la Patente No. US 5 393 662, mediante la
25 cual proveen un medio y un método para la identificación y recuento de *E. coli* y coliformes con el empleo de sustratos con los grupos cromóforos diferentes. Este medio no permite la

la enzima β -galactosidasa. El medio a su vez incluye nutrientes, un compuesto fluorogénico o cromogénico para la enzima β -galactosidasa, ácido glucurónico o una de sus sales e indicador de pH. Este medio de cultivo contiene, además, las sustancias inhibidoras del crecimiento de los géneros y las especies diferentes de *Salmonella* (verde brillante y desoxicolato de sodio), lo que limita su habilidad de detectar otros organismos Gram-negativos e imposibilita su utilización para el recuento. El medio de cultivo necesita la adición del glucuronato de sodio en forma de suplemento después de esterilización. Según Denis y colaboradores, la especificidad de este medio de cultivo es de 93,3 %, mientras que del otro medio tradicional para la detección de *Salmonella* (Agar Enterico Hektoen) es de 85,3 % (Denis, et al, Revue francaise des laboratoires, Décembre 1994, No. 271).

Rambach solicitó patente para un medio de cultivo y el método para la detección de las cepas enterohemorrágicas de *E. coli* (Solicitud de Patente WO 97/39103). La invención comprende un medio de cultivo selectivo para la diferenciación *E. coli*, particularmente de los serotipos O157 y/o O11, que contiene un substrato cromogénico para la enzima α -galactosidasa. Para aumentar la capacidad diferencial del método se le han añadido otros sustratos cromogénicos, para β -glucosidasa que caracteriza a un gran número de bacterias coliformes y para β -glucuronidasa que caracteriza *E. coli* de serogrupos diferentes de O157 y O11. Sin embargo, este medio de cultivo no permite la diferenciación de otras bacterias Gram-negativas y, por otra parte, se reporta que algunas cepas de *E. coli* y *Citrobacter* pueden dar resultados falsos-positivos (Wallace and Jones, J. Appl. Bacteriol., 1996, 81: 663-668).

Roth y colaboradores, en marzo de 1998 recibieron la aprobación de la patente No. US 5,726,031. En la patente se describe un medio de ensayo y un método cuantitativo para la identificación y diferenciación de material biológico en una muestra a ensayar, y consiste en emplear un substrato cromogénico específico para uno de los materiales biológicos que brinda una coloración a ese material, un segundo substrato cromogénico que es específico a un segundo tipo de material biológico y le brinda un segundo color diferente al primero, y un tercer material biológico a ensayar que es sensible a degradar uno de los dos substratos. El primer y segundo material biológico son capaces de degradar un azúcar, y el tercer material biológico no degrada ese azúcar. En la composición se incluye un indicador de pH, que cambia el color del medio al ser degradado el azúcar alrededor de la colonia teñida de los colores que aportan los substratos cromogénicos.

Los ingredientes fundamentales son el 6-cloro-3-indolil galactósido, 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido, sorbitol y fenol rojo. Otros componentes son las sales biliares, lauril sulfato de sodio, desoxicolato de sodio, eter de poliglicol y antibióticos derivados de la acriflavina.

- 5 Se necesita un inductor de las reacciones enzimáticas, en este caso, el isopropil-.beta.-D-thiogalactopiranosido.

Se incluyen agares, pectinas, carrageninas, alginatos, xantina, entre otros agentes gelificantes y peptonas. Este prototipo puede ser considerado el más cercano a la presente invención y presenta un grupo de inconvenientes:

- 10 - El medio permite la identificación y enumeración de *E. coli*, *E. coli* O157:H7 y coliformes, pero la identificación certera de *Salmonella* es difícil y para algunas cepas imposible, ya que esta se puede presentar blanca, al igual que otras bacterias Gram-negativas, tales como *Proteus*, y en el caso de coexistir varias especies, es difícil diferenciar la presencia de la zona amarilla que caracteriza a la mayoría de las
- 15 *Salmonellas*, ya que ésta se produce por la acidificación del medio.
- No se pueden diferenciar *Salmonella. typhi* de *Salmonella no typhi*.
- Los coliformes no pueden ser diferenciados en el medio, y se precisa del empleo de otros medios diagnósticos adicionales para la ulterior identificación de patógenos de gran importancia, tales como *Klebsiella*.
- 20 - El medio no permite la identificación y recuento de otros Gram-negativos no coliformes, tales como *Pseudomonas*.
- El método empleado para la identificación y recuento precisa de 24 a 48 horas para los microorganismos reivindicados, lo que no lo diferencia de los métodos de cultivo tradicionales.
- 25 - El empleo del sodio dodecilsulfato, acriflavina y/o antibióticos en la formulación la hace más compleja, de mayor costo y menor estabilidad, sobre todo por la presencia de antibióticos que necesitan ser adicionados como suplementos, pues son termolábiles y no pueden ser adicionados a la formulación deshidratada en polvo.
- Los ingredientes favorecedores del crecimiento en este medio no son suficientes para
- 30 permitir, por si solos, el desarrollo temprano (antes de 24 horas) de las reacciones que permiten la identificación de los microorganismos, necesitando incluso un inductor para la enzima β -galactosidasa, como IPTG.

- El método prevé que las reacciones tengan lugar hasta 40°C, inferior a los 44°C establecidos en los métodos tradicionales, lo que requiere establecer un nuevo parámetro en el equipo que se utiliza de rutina.
- La temperatura de 40°C para incubar no está en los procedimientos de rutina de análisis microbiológico, por lo que requeriría de una extensa validación y aprobación como método oficial.

Divulgación de la Invención

El objetivo de la presente invención consiste en proveer una mezcla nutritiva y un procedimiento para la identificación y recuento temprano de organismos Gram-negativos.

- 10 La novedad de la invención está en que por primera vez se provee una mezcla nutritiva para la identificación y recuento temprano de organismos Gram-negativos y un procedimiento que la utiliza para lograr la identificación y la diferenciación de los microorganismos de interés, basada en la aparición de al menos 5 colores diferentes a la luz visible en las colonias, emisiones fluorescentes de 3 colores, halos de 3 colores diferentes, aparición de
- 15 una zona de precipitación alrededor de las mismas, y/o la combinación de éstas características con los cambios de color del medio.

- Elementos novedosos son aportados, a partir de proporcionar cantidades del aminoácido esencial triptófano que interviene en un número considerable de reacciones metabólicas, que sirven de base a la identificación. Dichas cantidades son suministradas, teniendo en cuenta
- 20 la relación de estas con las sales orgánicas e inorgánicas y las sustancias que proporcionan la aparición de color o fluorescencia, de forma tal que las reacciones observadas sean nítidas y aparezcan de manera temprana.

- Elementos nuevos e inesperados se han evidenciado, cuando determinados organismos de interés toman coloraciones no descritas previamente o emiten fluorescencia de colores no reportados como característicos, o presentan halos de colores no descritos, como el caso de
- 25 *Enterobacter* (fluorescencia amarillenta y centro verde grisáceo), *Citrobacter freundii* (violeta oscuro con halo azul), *Salmonella* no *typhi* (centro y fluorescencia amarilla después de 24 horas), *Salmonella typhi* (zona de precipitado opaco alrededor de la colonia).

- Las relaciones entre los componentes de la mezcla fueron establecidas de manera experimental, y constituyen elementos que garantizan una mezcla de componentes no
- 30 descrita anteriormente en cuanto a sus proporciones, o la composición cualitativa de los elementos incluidos.

A continuación se presentan las ventajas que ofrece la presente invención.

- Toda la identificación y diferenciación de los organismos de interés se realiza sólo con la mezcla preparada, y no se requieren pruebas adicionales o el uso de otros medios.
- Al no poseer inhibidores de bacterias Gram-negativas, la composición permite el crecimiento de éstas, y la identificación de las especies más importantes desde el punto de vista clínico o sanitario, tales como *E. coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, y además, el recuento de *E. coli* y coliformes.
- La identificación de los diferentes organismos es muy segura, pues se realiza combinando varias reacciones que ocurren en paralelo, basadas en las especificidades del metabolismo de dichos organismos, y que se producen gracias a la presencia de combinaciones de componentes de la mezcla en proporciones adecuadas. Algunas de estas se reportan por primera vez y constituyen hallazgos, como en el caso de *Enterobacter* (*E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *E. cloacae*), que aparecen con un color de la colonias de rosa a rojo y centro verde grisáceo y *Salmonella no typhi*, que aparece como una colonia de color rojo a roja con el centro amarillo, ambos géneros con fluorescencia amarillenta (después de 24 horas de incubación), lo que permite identificarlas sin riesgo de equivocación.
- La composición permite la identificación y recuento temprano de un amplio espectro de organismos Gram-negativos, logrando diferenciar las *E. coli*, *Salmonella typhi* de *no typhi*, algunos de los coliformes de mayor interés y otros Gram-negativos no coliformes como *Pseudomonas*, todos en un solo procedimiento, en una sola placa y en un período máximo de 22 horas.
- La identificación se realiza fundamentalmente por la combinación de la aparición de 5 colores diferentes de las colonias, de 3 fluorescencias de diferentes colores, la aparición de halos de 3 colores diferentes y de una zona de precipitado opaco alrededor de las colonias, y los cambios de color del medio pueden jugar un papel secundario, o incluso no jugarlo para identificar determinados géneros como en el caso de *Shigella sonnei*, *E. coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa*, lo que disminuye el riesgo de una falsa identificación en presencia de muestras contaminadas con diferentes gérmenes.
- La composición es muy sencilla de preparar, no necesita de esterilización en autoclave, ni la adición de suplementos que aumentan el riesgo de contaminación de la muestra.

- Al prescindir de la esterilización, se conservan mejor los nutrientes y favorecedores del crecimiento y se mantiene más estable el pH de la composición.
- Los nutrientes y favorecedores incorporados en la mezcla, sobre todo los ricos en triptófano, se encuentran en proporciones y cantidades absolutas tales en la
5 composición, que garantizan la ocurrencia de las reacciones cromáticas y bioquímicas tempranamente, en la mayoría de los casos antes de las 22 horas
- Los componentes sólidos que conforman las capas de la composición, son de tal naturaleza y composición, que permiten que las emanaciones de luz fluorescente se concentren en la colonia y no difundan al resto de la placa, lo que permite el
10 recuento seguro de esos organismos.
- La selección de los inhibidores del crecimiento de los organismos Gram-positivos, su contenido absoluto y la relación con los demás componentes, permiten el crecimiento adecuado de los organismos de interés, a la vez que se logra la total inhibición (ausencia de crecimiento) de esos organismos Gram-positivos.
- 15 - La amplia gama de sustancias, precursores o sustratos para las reacciones enzimáticas, permiten que, al adicionar una tercera capa con indicadores o reveladores de reacciones, a la composición en una porción de las placas, puedan ocurrir otras reacciones que permitan la ulterior identificación de otros organismos Gram-negativos.
- 20 - La especificidad diagnóstica de la composición resultó del 100 % para los organismos ensayados y la sensibilidad analítica alcanzó 10^{-6} UFC/mL a partir de una suspensión estandarizada al 50 % de transmitancia.
- El balance entre nutrientes e inhibidores, permite la identificación temprana y el crecimiento exuberante de los organismos de interés, incluso de aquellos que
25 generalmente crecen después de 24 horas, como *Salmonella*.
- Los resultados pueden ser fácilmente interpretados por personal no especializado, ya que no se basa la identificación o la diferenciación morfológicas de los organismos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se relaciona con una mezcla nutritiva para la identificación y
30 recuento temprano de organismos Gram-negativos, la cual contiene los siguientes componentes esenciales:

- una mezcla de fracciones proteicas ricas en triptófano o triptófano libre, la cual se encuentra en cantidades entre 22 a 46 % de la mezcla total (peso/peso);

- una mezcla de sales orgánicas y/o inorgánicas seleccionadas que se encuentra en un cantidades entre 15 y 20 % de la mezcla total (peso/peso);
- una mezcla de sustancias que proporcionan la aparición de color y fluorescencia, la que se encuentra en cantidades entre 0,3 a 37 % de la mezcla total (peso/peso);
- 5 - sustancias inhibidoras del crecimiento de los organismos Gram positivos, las que se encuentra en cantidades entre 2 a 4,5 % de la mezcla total (peso/peso);
- y una mezcla para dar la estructura sólida al medio, que comprende cantidades entre 20 y 50 % de la mezcla total (peso/peso).

La proporción de cada uno de los componentes de la mezcla varía, dentro de los rangos
10 predeterminados, en dependencia del medio nutritivo que se desee preparar.

En la mezcla nutritiva de la invención, la mezcla de fracciones proteicas ricas en triptófano contiene dicho aminoácido en cantidades que oscilan entre 0,25 a 3,8 % de dicha mezcla (peso/peso);

Asimismo, dicha mezcla nutritiva contiene sales orgánicas y/o inorgánicas las cuales son
15 seleccionadas entre NaCl, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, Na_2CO_3 y piruvato de sodio y sus mezclas, seleccionándose en realizaciones preferidas de la invención NaCl y Na_2CO_3 . Dicha mezcla contiene las siguientes cantidades (peso/peso) de sales orgánicas y/o inorgánicas con respecto a la mezcla total:

- NaCl entre 7 y 18 %;
- 20 - K_2HPO_4 entre 6 y 11 %;
- KH_2PO_4 entre 2 y 5 %;
- $(NH_4)_2SO_4$ entre 1 y 4 %;
- Na_2CO_3 entre 0,1 y 0,4 %; y
- piruvato de sodio entre 0,7 y 3 %.

25 La mezcla nutritiva de la invención también comprende una mezcla de sustancias que proporcionan la aparición de color o fluorescencia entre las que se encuentran X-GAL, MUG, sorbitol y rojo neutro, seleccionándose entre éstas preferiblemente X-GAL y MUG. Estas sustancias se encuentran en las siguientes cantidades (peso/peso) con respecto a la mezcla total:

- 30 - X-GAL entre 0,16 y 0,36 %;
- MUG entre 0,16 y 0,18 %;
- sorbitol entre 15 y 36,5 %; y
- rojo neutro entre 0,09 y 0,11 %.

Por otra parte, la mezcla nutritiva de la invención incluye sustancias inhibidoras del crecimiento de los organismos Gram-positivos, las cuales pueden ser el desoxicolato de sodio o las sales biliares.

5 Finalmente la mezcla nutritiva de la invención contiene una mezcla sustancias que le dan la estructura sólida al medio de cultivo donde crecen los microorganismos a analizar, la cual puede estar constituida por las siguientes combinaciones de sustancias y en las siguientes cantidades (peso/peso) con respecto a la mezcla total:

- agarosa y agarpectina en cantidades entre 19 y 48 % en combinación con nitrato de celulosa en cantidades entre 0,1 y 0,4 %; ó
- 10 - celulosa y hemicelulosa de 1,4 a 3 % en combinación con nitrato de celulosa de 0,1 a 0,4 %; ó
- agarosa y agarpectina solamente en cantidades entre 19 y 48 %.

La mezcla nutritiva de la invención una vez preparada presenta un pH entre 6,6 y 7,2.

Otro aspecto de la invención es que la misma proporciona un procedimiento para la
15 identificación y el recuento temprano de dichos organismos Gram-negativos, el cual se basa en la aparición de 5 colores diferentes, de emisiones fluorescentes de 3 colores y de halos de 3 colores en las colonias, el cambio del color del medio y la aparición de una zona de precipitado alrededor de dichas colonias, así como las combinaciones de las características anteriormente mencionadas.

20 Mediante el procedimiento de la invención la mezcla nutritiva que se describe, una vez solidificada y contactada con los organismos o las muestras que los contienen, es incubada por un período de 12 a 22 horas y a temperatura de 30 a 45 °C, a partir del cual es posible la identificación de los microorganismos a simple vista, mientras que para la detección de la fluorescencia en necesario emplear luz ultravioleta de 360 a 366 nm.

25 La identificación de los diferentes microorganismos Gram-negativos, empleando la mezcla y el procedimiento de la invención es como sigue:

Shigella sonnei – Se identifica por la aparición de colonias de color verde azul, fluorescencia azul y medio naranja;

30 *Shigella flexneri* - Se identifica por la aparición de colonias de color rosa pálido, halo amarilloso y medio naranja;

Enterobacter (*E. aerogenes*, *E. cloacae*, *E. agglomerans*) – Se identifica por la aparición de colonias de color rosa a rojo con centro verde grisáceo, fluorescencia amarilla y medio de color rojo;

- Escherichia coli*, excepto O157:H7 – Se identifica por la aparición de colonias de color violeta claro, fluorescencia azul y medio de color rojo;
- Escherichia coli* O157:H7 – Se identifica por la aparición de colonias de color verde azul y medio naranja;
- 5 *Citribacter freundii* – Se identifica por la aparición de colonias de color violeta oscuro con halo azul y medio de color rojo;
- Klebsiella pneumoniae* – Se identifica por la aparición de colonias de color violeta claro y medio de color rojo;
- Salmonella typhi* – Se identifica por la aparición de colonias de color rojo y medio
- 10 de color rojo con zona de precipitado opaco;
- Salmonella* “no typhi” – Se identifica por la aparición de colonias de color rojo y medio de color rojo, con aparición, después de 24 horas de incubación, de color del centro y fluorescencia amarillos;
- Pseudomonas aeruginosa* – Se identifica por la aparición de colonias de color rosa
- 15 pálido, fluorescencia verdosa antes de 24 horas de incubación y medio naranja; colonias de color pardo verdoso, fluorescencia verdosa y halo de color verdoso después de 24 horas de incubación;
- Proteus*, *Providencia*, *Alcaligenes* y otros Gram-negativos – Se identifican por la aparición de colonias incoloras o transparentes y medio naranja.
- 20 En una realización particular de la presente invención, cuando se emplea la mezcla de sustancias que proporcionan la aparición de color o fluorescencia compuesta sólo por X-GAL y MUG, la identificación de coliformes totales se realiza por el color azul verdoso de las colonias y específicamente de *E. coli* además por la fluorescencia azul.
- Para la conformación de la mezcla nutritiva de la invención se realizan las operaciones
- 25 siguientes:
- Las sustancias que aportan las fracciones proteicas ricas en triptófano y/o triptófano libre en cantidad de 22 a 46 %, se pesan en un frasco cónico (éste debe tener el volumen 2 veces mayor que la cantidad de la mezcla nutritiva a preparar), teniendo en cuenta que la mezcla nutritiva debe contener entre 0,25 y 3,8 % de este aminoácido respecto a su peso seco.
- 30 Seguidamente se pesa el conjunto de sales orgánicas e inorgánicas y se añade a la mezcla anterior, en cantidad de 15 a 20 % con respecto al peso seco de la mezcla nutritiva.

Dichas sales orgánicas o inorgánicas son seleccionadas en las siguientes cantidades relativas a la mezcla nutritiva total: NaCl de 7 a 18 %, K_2HPO_4 de 6 a 11 %, KH_2PO_4 de 2 a 5 %, $(NH_4)_2SO_4$ de 1 a 4 %, Na_2CO_3 de 0,1 a 0,4 % y Piruvato de sodio de 0,7 a 3 %.

5 Luego se pesan y se adicionan los inhibidores de los organismos Gram-positivos en cantidad de 2 a 4,5 %, entre los que se emplean el desoxicolato de sodio y las sales biliares.

Separadamente, en la balanza analítica, se pesa la premezcla de las sustancias que proporcionan la aparición de color o fluorescencia, en cantidad de 0,3 a 37 %. La premezcla de estas sustancias puede contener sorbitol en cantidades de 15 a 36,5 %, MUG de 0,16 a 0,18 %, X-GAL de 0,16 a 0,36 % y rojo neutro de 0,09 a 0,11 %, con respecto al peso seco
10 de la mezcla nutritiva.

Todos los componentes antes mencionados se unen con agua destilada o desionizada y se mezclan bien para lograr una solución homogénea con la concentración de solutos de 3,5 a 6,5 % y el pH de 6,6 a 7,2.

Finalmente la solución preparada se une con la mezcla de agarosa y agarpectina y/o se
15 vierte sobre estructuras de las mezclas de derivados de celulosa y hemicelulosa.

Si a la solución preparada se le adiciona la mezcla primera, la suspensión se agita y se deja remojar por al menos 15 min. Luego se calienta hasta ebullición, se enfría hasta aproximadamente 45°C y se distribuye en los envases finales del ensayo, dejándolos en reposo a temperatura ambiente durante 20- 30 minutos. Si ocurre acumulación de humedad,
20 antes de proceder a la inoculación se debe secar los envases en condiciones asépticas.

En caso de utilizar la mezcla de celulosa y hemicelulosa, primeramente esta se esteriliza (con vapor húmedo a 121°C por 15 minutos o con óxido de etileno o mediante irradiación), posteriormente se coloca en los envases finales de ensayo y se le adiciona la solución anteriormente preparada en cantidad de 2 a 4 mL por cada envase.

25 En ambos casos pueden ser colocadas otras capas formadas por nitrato de celulosa y/o otros derivados de la celulosa, tales como el acetato de celulosa, tanto durante, como después de realización de la siembra, para proporcionar a los organismos a detectar el efecto de concentración sobre una estructura sólida para el desarrollo de sus colonias, o para revelar una reacción específica.

30 Las muestras de interés pueden ser inoculadas por diferentes métodos de estría o de diluciones, e incubadas a temperatura de 33 a 45 °C, por al menos 6 horas para la detección de *E. coli*, preferiblemente entre 12 horas y 22 horas, y entre 18 y 22 horas para la diferenciación de otros microorganismos Gram-negativos.

La lectura de los resultados se realiza observando el color de la colonia aislada, el color del medio de cultivo y la presencia de un precipitado opaco o halo alrededor de dicha colonia, la presencia y color de emisiones fluorescentes y puede emplearse además la morfología colonial.

- 5 Las colonias aisladas de diferentes bacterias Gram-negativas se observan del siguiente modo (tabla 1):

Tabla 1. Características de las colonias y del medio.

Microorganismo	Color de la colonia	Bordes de la colonia	Color del medio	Precipitado o halo	Fluorescencia
<i>Escherichia coli</i> , excepto verotoxigénica	violeta claro	redondos	rojo	-	+ azul
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	verde azul	redondos	naranja	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	verde azul	irregulares	naranja	-	+ azul
<i>Shigella flexneri</i>	rosa pálido	redondos	naranja	(halo amarilloso)	azul en ocasiones
<i>Enterobacter spp.</i>	rojo con centro verde grisáceo	redondos	rojo	-	+ amarilla
<i>Citrobacter freundii</i>	violeta oscuro	redondos	rojo	halo azul	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	violeta claro	redondos	rojo	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	rojo	redondos	rojo	precipitado opaco	-
<i>Salmonella</i> no <i>typhi</i>	rojo (rojo con centro amarillo)	redondos	rojo	-	(+ amarilla)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	rosa pálido a [pardo verdoso]	irregulares	naranja	(halo verdoso)	+ verdosa
<i>Proteus</i> , <i>Providencia</i> y otros Gram-negativos	incolora		naranja	-	-

() Características que aparecen después de 24 horas de incubación

10

Las diferentes cepas de bacterias Gram-negativas desarrollan las colonias de tamaño hasta 5 mm, según el tiempo de incubación.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

15 Ejemplo No. 1

La composición de la mezcla nutritiva para la diferenciación de diferentes cepas de bacterias Gram-negativas (tabla 2) resultó ser:

Tabla 2: Composición de la mezcla.

INGREDIENTE	% peso seco
Composición proteica obtenida por extracción de levaduras con un contenido de triptófano de 0,6 a 0,8 %	6,8
Digerido de proteínas animales con un alto contenido de caseína y un contenido de triptófano de 0,8 a 1,2 %	6,8
Composición libre de proteínas y rica en fracciones proteicas de origen animal con un contenido de triptófano de 0,5 a 0,7 %	8,6
Triptófano	2,5
Cloruro de sodio	9,2
Carbonato de sodio	0,2
Fosfato monopotásico	3,1
Fosfato dipotásico	7,5
Piruvato de sodio	1,0
Desoxicolato de sodio	2,1
Sorbitol	20,7
MUG	0,1
X-GAL	0,1
Rojo neutro	0,06
Mezcla de agarosa y agarpectina	31,24

pH $7,0 \pm 0,2$

48 g de esta mezcla se suspendieron en 1 L de agua destilada o desionizada.

El ensayo se realizó comprobando el comportamiento de diferentes cepas de enterobacterias

5 respecto a las pruebas bioquímicas predeterminadas.

Los resultados obtenidos (tabla 3) fueron los siguientes:

Tabla 3. Resultado del crecimiento en la mezcla.

Microorganismo	Color (Medio)	Color (Colonia)	UFC/mL (dil. 10^{-6})	Fluoresc.	Caract. colonias
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 35150	rosado	azul verdoso	siembra directa	-	regulares convexas
<i>E. coli</i> ATCC 25922	rosado	violeta con halo azul	$344 \pm 60,8$	+ azul	regulares convexas
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12473	rosado	incoloras a rosadas	$205 \pm 13,4$	-	regulares mucoides
<i>Sh. sonnei</i> ATCC 25931	naranja	azul verdoso	$367 \pm 17,0$	+ azul	irregulares planas
<i>Sh. flexneri</i> ATCC 12022	naranja	rosadas pálidas	$136 \pm 29,7$	-	regulares convexas
<i>A. hidrofila</i>	naranja	azul verdoso	$255 \pm 4,2$	-	regulares aplanadas
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	rosado	Rojas	$324 \pm 19,8$	-	regulares convexas
<i>P. vulgaris</i> ATCC 13315	rosado	incoloras a rosadas	$272 \pm 17,7$	-	regulares convexas
<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 27853	rosado	Rosadas	$130 \pm 4,2$	+ (verde)	irregulares convexas

Después de incubar 24 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, se le colocó en las tapas de los envases utilizados, una capa delgada de celulosa impregnada con el reactivo de Kovacs. En los contenedores con los microorganismos productores de indol a partir del triptófano (*E. coli*, *P. vulgaris* y *Aeromonas hydrophila*) el color de la capa de celulosa se tornó rosada en un intervalo de 30 minutos.

Ejemplo No. 2

Se preparó la mezcla nutritiva similar a lo descrito en el Ejemplo 1, pero el contenido de los componentes del conjunto de fracciones proteicas ricas en triptófano fue el siguiente (tabla 4):

10 Tabla 4. Composición de la mezcla descrita en el ejemplo 2.

INGREDIENTE	% peso seco
Composición proteica obtenida por extracción de levaduras con un contenido de triptófano de 0,6 a 0,8 %	11,54
Digerido de proteínas animales con un alto contenido de caseína y un contenido de triptófano de 0,8 a 1,2 %	11,54
Composición libre de proteínas y rica en fracciones proteicas de origen animal con un contenido de triptófano de 0,5 a 0,7 %	4,62

La siembra de diferentes organismos de colección ATCC se realizó mediante el método de agotamiento del inóculo por estriado.

15 La lectura de los resultados se realizó a las 6, 11, 19 y 24 horas de incubación y los mismos se muestran a continuación (tablas 5, 6, 7 y 8 respectivamente):

Tabla 5. Crecimiento a las 6 horas de incubación.

Microorganismo	Observaciones
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	Se observa el crecimiento en el primer cuadrante, color rosado de las colonias en masa
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Se observa el crecimiento en el primer cuadrante, color violeta de las colonias en masa. Se observa la fluorescencia en el lugar del crecimiento.
<i>Kl. pneumoniae</i> ATCC 13883	No se observa crecimiento
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	No se observa crecimiento
<i>S. typhi</i> ATCC 19430	No se observa crecimiento

Tabla 6. Crecimiento a las 11 horas de incubación.

Microorganismo	Observaciones
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	Se observa el crecimiento en todos los cuadrantes , color de las colonias rojo
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Se observa el crecimiento en varios segmentos, color rojo de las colonias en masa, con manchas azules. Se observa la fluorescencia más intensa que con 6 h.
<i>Kl. pneumoniae</i> ATCC 13883	Se observa un crecimiento pobre. Colonias de color violeta.
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	Se observan las colonias de color rojo
<i>S. typhi</i> ATCC 19430	Se observa el crecimiento en el primer cuadrante, color rojo de las colonias

5 Tabla 7. Crecimiento a las 19 horas de incubación.

Microorganismo	Observaciones
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	Colonias aisladas de color rojo con el centro verde
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Colonias de color violeta claro y fluorescencia azul
<i>Kl. pneumoniae</i> ATCC 13883	Colonias de color violeta claro
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	Colonias aisladas de color rojo
<i>S. typhi</i> ATCC 19430	Color de las colonias rojo con una zona de precipitado opaco

Tabla 8, Crecimiento a las 24 horas de incubación.

Microorganismo	Observaciones
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	Puntos verdes en el centro de las colonias. Color más intenso que a las 19 h.
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Colonias aisladas de color violeta claro
<i>Kl. pneumoniae</i> ATCC 13883	Colonias que mantienen el color violeta.
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	Colonias aisladas son rojas.
<i>S. typhi</i> ATCC 19430	Colonias rojas con el precipitado opaco.

- 10 Un hecho que llamó atención fue que se observó la formación del precipitado opaco alrededor de las colonias de *S. typhi*, lo que brinda una característica adicional para la diferenciación de la misma de otras cepas de *Salmonella*.

La misma mezcla nutritiva (identificada en lo adelante como exp) se inoculó con las diluciones 10^{-6} a partir de las suspensiones (estandarizadas a 50 % de transmitancia) de

- 15 cepas de los microorganismos seleccionados.

Los microorganismos se ensayaron en paralelo en el Caldo EC con MUG adicionándole el agar (13g/L) y X-GAL (0,1 g/L), siendo esta la mezcla de referencia (C).

La lectura de los resultados de la siembra se realizó con 6, 12, 19, 24 y 40 horas de incubación (tablas 9, 10, 11, 12 y 13 respectivamente).

Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Tabla 9. Crecimiento a las 6 horas de incubación.

Microorganismo	Observaciones
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	No se observa crecimiento
<i>E. coli</i> ATCC 25922	No se observa crecimiento
<i>Kl. pneumoniae</i> ATCC 13883	No se observa crecimiento
<i>E. cloacae</i> ATCC 23355	No se observa crecimiento
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	No se observa crecimiento
<i>S. typhi</i> ATCC 19430	No se observa crecimiento

5

Tabla 10. Crecimiento a las 12 horas de incubación.

Microorganismo	Var	Color (Medio)	Color (Colonia)	UFC
<i>Escherichia coli</i> ATCC	exp	No se observa crecimiento		
	C			
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	exp	Rojo	rojo	9,5
	C	Amarillo	azul	22
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 23355	exp	Rojo	rojo	9
	C	Amarillo	azul	19
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	exp	No se observa crecimiento		
	C			
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	exp	Rojo	rojo	11
	C	Amarillo	incolora	1
<i>Salmonella typhi</i> ATCC	exp	No se observa crecimiento		
	C			

exp. : experimental

C: control

Tabla 11. Crecimiento a las 19 horas de incubación.

Microorganismo	Var	Color del medio	Color de la colonia	UFC
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	exp	Rojo	violeta	$5 \pm 3,5$
	C	Amarillo	azul	$30 \pm 2,5$
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	exp	Rojo	rojo/c. verde	$20 \pm 16,3$
	C	Amarillo	azul	$26 \pm 2,1$
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 23355	exp	Rojo	rojo/c. grisáceo	$20 \pm 4,9$
	C	Amarillo	azul	$21 \pm 4,2$
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	Exp	Rojo	violeta	$11 \pm 0,3$
	C	Amarillo	azul	$6 \pm 2,8$

<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	exp	Rojo	rojo	56 ± 9,2
	C	Amarillo	incolora	4 ± 0,7
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430	exp	Rojo	rojo	34 ± 33,9
	C	Amarillo	incolora	25 ± 17,6

c. : centro

exp. : experimental

C: control

- 5 Sorprendentemente, a diferencia de otros organismos coliformes, *E. aerogenes* y *E. cloacae* presentan una coloración diferenciada en el centro y en los bordes de las colonias.

A las 24 horas de incubación.

- El número de colonias no ha cambiado el color azul en los centros de las colonias se ve más
10 intenso. En algunas colonias de *Salmonella* no *typhi*, se observan centros y fluorescencia amarillas.

A las 40 horas de incubación.

Desaparece el color rojo y predomina el color azul en coliformes y amarillo en *Salmonella*.

15 Ejemplo No. 3

Se realizó el estudio de la influencia de diferentes activadores del crecimiento de organismos coliformes, de diferentes inhibidores y diferentes combinaciones de las fracciones proteicas ricas en triptófano mediante las curvas de crecimiento de dos cepas:

Escherichia coli ATCC 10536

- 20 *Streptococcus faecalis* ATCC 29212

En paralelo se inoculó el Caldo EC con MUG (Difco).

Las variantes experimentales (MN) de las variables fueron las siguientes (tabla 12):

Tabla 12. Composición de las variantes de las mezclas descritas en el ejemplo 3.

Ingrediente	% de peso seco				
	MN1	MN2	MN3	MN4	MN5
Composición proteica obtenida por extracción de levaduras	18,5	17	12,5	17,3	11
Digerido de proteínas animales con un alto contenido de caseína y	18,5	17	12,5	17,3	16,5
Composición libre de proteínas y rica en fracciones proteicas de origen animal	7,4	15	17,8	6,9	16,5
Desoxicolato de sodio	3,6	3,3	0	3,5	0

Sales biliares	0	0	4,5	0	4,4
Piruvato de sodio	0	1,7	0	0	0
Sulfato de amonio	0	0	0	3,5	0
Sorbitol	35	29	35	34,5	34,4
Cloruro de sodio	17	17	17,7	17,2	17,2

Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 1 y 2.

- Como se observa en la Figura 1, sólo la mezcla nutritiva MN3, promueve en menor medida el crecimiento de *E. coli*, mientras que la variante MN2 a las 3 horas, promueve al máximo su crecimiento. A las 6 horas, prácticamente no hay diferencias en la promoción del crecimiento, a excepción de la mezcla MN3.

En la Figura 2 se observa que en todas las mezclas propuestas en la presente invención *Streptococcus faecalis* se encuentra inhibido en comparación con el diagnosticador de referencia.

10 Ejemplo No. 4

En este ensayo se utilizó la siguiente formulación de la mezcla (tabla 13):

Tabla 13. Mezcla correspondiente al ejemplo 4.

INGREDIENTE	% peso seco
Composición proteica obtenida por extracción de levaduras con un contenido de triptófano de 0,6 a 0,8 %	8,3
Digerido de proteínas animales con un alto contenido de caseína y un contenido de triptófano de 0,8 a 1,2 %	16,62
Composición libre de proteínas y rica en fracciones proteicas de origen animal con un contenido de triptófano de 0,5 a 0,7 %	16,62
Cloruro de sodio	10,4
Carbonato de sodio	0,1
Piruvato de sodio	2,1
Sales biliares	2,7
Sorbitol	15,6
MUG	0,2
X-GAL	0,3
Rojo neutro	0,06
Mezcla de agarosa y agarpectina	27

pH $7,0 \pm 0,2$

- 15 El método de siembra utilizado fue de inundación de superficie.

Condiciones de incubación: 24 horas a 35 °C.

Se sembraron diluciones 10^{-6} de las cepas de los microorganismos coliformes, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, y la dilución 10^{-1} de *Streptococcus faecalis* ATCC 29212.

En paralelo se inoculó el medio Caldo EC con MUG (Difco) con adición de agar (13,0 g/L), el cual fue denominado como “control” (C).

Los resultados obtenidos fueron los siguientes (tabla 14):

Tabla 14. Resultados del crecimiento en las mezclas experimental y control .

Microorganismo	Var	Color (Medio)	Color (Colonia)	Fluoresc.	UFC/mL
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (dil. 10^{-5})	exp	Rojo	roja/c. Azul	+	$361 \pm 23,4$
	C	amarillo	Blanca	+	$313 \pm 44,6$
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 (dil. 10^{-5})	exp	rojo	roja/c. Verde	-	$284 \pm 33,4$
	C	amarillo	blanca	-	$137 \pm 18,3$

5 exp: mezcla descrita en la presente invención

C: formulación control

No existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre la variante experimental y el Caldo EC (Difco) en cuanto al desarrollo de colonias de *Escherichia coli* ATCC 25922, aunque el tamaño de las colonias en la mezcla nutritiva experimental es ligeramente mayor. La cantidad de colonias de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 es mayor en la variante experimental, no obstante no existe diferencia significativa entre ambas ($p \approx 0,06$).

De manera inesperada, *E. aerogenes* pudo ser identificado por su coloración diferenciada en el centro y en los bordes de la colonia y por su fluorescencia amarilla.

15 Por otra parte *Streptococcus faecalis* ATCC 29212 fue inhibido completamente en todas las variantes estudiadas (el microorganismo se incubó hasta 72 horas).

Seguidamente se sembraron 10 mL de la muestra de agua potable estancada en las mismas variantes (tabla 15).

Tabla 15. Detección de crecimiento en muestra de agua potable.

Microorganismo	Var	Color (Medio)	Color (Colonia)	Fluoresc.	UFC/mL
Agua potable estancada	exp	rojo	rojo /c verdoso	-	$44 \pm 4,6$
	C	amarillo	verde grisáceo	-	$16 \pm 4,2$

exp: mezcla descrita en la presente invención

20 C: formulación control

c: centro

Se realizó el recuento solamente de las colonias con las características presuntivas de coliformes. Las pruebas bioquímicas realizadas (mostradas a continuación) confirmaron que las colonias aisladas pertenecían al género *Enterobacter*.

	Prueba	Resultado
5	Utilización del citrato	+
	Descarboxilación de la lisina	+
	Descarboxilación de la ornitina	+
	Descarboxilación de la arginina	-
	Agar Hierro Kligler	A/A Gas + H ₂ S-
10	Ureasa	-
	Movilidad	+
	Producción de indol	-
	Rojo de metilo	-
	Voges-Proskauer	+
15	Existe diferencia significativa ($p < 0,05$) a favor de la variante experimental de la mezcla nutritiva y el Caldo EC con MUG (Difco) con adición de agar (13g/L) y X-GAL (1,0 g/L).	

Ejemplo No. 5

Se preparó la misma mezcla nutritiva que en el Ejemplo No. 4, pero la cantidad total de las fracciones proteicas ricas en triptófano se disminuyó hasta: 40,4; 37,7 y 34,8 %, peso seco (V1, V2 y V3, respectivamente).

Se prepararon tres variantes con la mezcla con agarosa y agarpectina y las mismas sin la mezcla. En las primeras tres se sembró la dilución 10^{-6} de dos microorganismos: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 por el método de inundación de superficie.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Crecimiento de diferentes organismos en la mezcla experimental.

Microorganismo	Var	Color del medio	Color de la colonia	UFC/mL
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (dilución 10^{-5})	V1	rojo	roja/c. Azul	$20 \pm 4,6$
	V2	rojo	roja/c. Azul	$22 \pm 4,0$
	V3	rojo	roja/c. Azul	$15 \pm 2,6$
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 (dilución 10^{-5})	V1	rojo	Roja	$46 \pm 13,0$
	V2	rojo	Roja	$47 \pm 8,7$
	V3	rojo	Roja	$36 \pm 15,0$

No existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las variantes en cuanto al desarrollo de colonias de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

Paralelamente las tres variantes sin la mezcla de agarosa y agarpectina, se utilizaron para las curvas de crecimiento de los microorganismos Gram-negativos (control positivo) y Gram-positivos (control negativo). Como mezcla control, se inoculó el Caldo EC con MUG de la firma Difco.

Sorprendentemente se observó que con 6 horas de incubación, el crecimiento (absorbancia) de las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 en las tres variantes experimentales es significativamente mayor ($p < 0,05$) que en el medio de referencia utilizado (Caldo EC con MUG), mientras que la inhibición de la cepa de *Streptococcus faecalis* ATCC 29212 (control negativo) es significativamente mayor en las mismas variantes correspondientes a la presente invención (Figuras 3-6 presentadas en los anexos).

15 Ejemplo No. 6

Se preparó la mezcla con los ingredientes de la variante 2 del ejemplo No. 5, con la diferencia de que las concentraciones de rojo neutro y de MUG se elevaron a la doble y la mezcla de agarosa y agarpectina se sustituyó por la mezcla de celulosa y hemicelulosa, en forma de disco absorbente, que le proporcionan a los organismos a detectar una estructura sólida para el desarrollo de sus colonias (exp). Todos los ingredientes mencionados conforman la primera capa de la mezcla nutritiva.

Se inoculó por el método de filtración 1 mL de las diluciones 10^{-6} de los microorganismos representantes de varios géneros de enterobacterias, la dilución 10^{-5} de la cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y la dilución 10^{-1} de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (control negativo). Para filtrar se empleó un soporte de nitrato de celulosa el cual se colocó como otra capa de la mezcla nutritiva.

En paralelo se inoculó el Agar Violeta Rojo Bilis por el método de inundación de superficie (c).

Los resultados de la lectura con 18 h de incubación se muestran a continuación en la tabla 18.

El tratamiento estadístico arrojó que no existe diferencia significativa ($p < 0,05$) en cuanto a recuperación de las cepas *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Shigella sonnei* y *Enterobacter aerogenes* en la mezcla

nutritiva experimental y Agar Violeta Rojo Bilis. Mientras que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) en cuanto a recuperación de las cepas *Escherichia coli* O157:H7 y *Shigella flexneri* a favor la primera. *Staphylococcus aureus* fue inhibido completamente (incubación hasta 48 h) en la dilución baja (10^{-1}).

- 5 Posteriormente, se realizó un estudio comparativo de recuperación de diferentes bacterias Gram-negativas en la misma composición de la mezcla nutritiva y en paralelo en el m-Caldo Endo (Difco). Ambos se inocularon por el método de filtración, obteniendo los resultados descritos en la tabla 17.

Tabla 17. Crecimiento de diferentes cepas en la mezcla descrita en el ejemplo 6.

Microorganismo	Var	Color (Medio)	Color (Colonia)	Fluoresc.	UFC
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	exp	rojo	violeta claro	+azul	$170 \pm 7,8$
	C	rojo	rojo	-	$167 \pm 23,3$
<i>Escherichia coli</i> 0157 H:7 ATCC 35150	exp	naranja	azul verdoso	-	$192 \pm 11,5$
	C	rojo	rojo	-	$103 \pm 18,7$
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC13048	exp	rojo	roja/c. verde	+ amarilla	$272 \pm 37,5$
	C	rojo	rojo	-	$99 \pm 76,8$
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	exp	rojo	Rojo	-	$26 \pm 11,1$
	C	sin cambio	Incolora	-	$24 \pm 23,6$
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	exp	rojo	violeta oscuro con halo azul	-	$205 \pm 6,43$
	C	rojo	rojo	-	$166 \pm 13,7$
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	exp	rojo	violeta oscuro	-	$115 \pm 40,3$
	C	rojo	rojo	-	$277 \pm 98,5$
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	exp	naranja	azul verdoso	+ azul	$159 \pm 28,6$
	C	sin cambio	Incolora	-	$92 \pm 13,6$
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	exp	naranja	incolora a rosada pálida	-	$181 \pm 52,9$
	C	sin cambio	Incolora	-	$9 \pm 1,5$

10 exp: mezcla descrita en la invención

C: medio control

c: centro

Tabla 18. Crecimiento de *E. coli* y *E. coli* O157:H7.

Microorganismo	Var	Color (Medio)	Color (Colonia)	Fluoresc.	UFC
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	exp	rojo	violeta claro	+ azul	185 ± 10,7
	Endo	rojo	rojo oscura con brillo metálico verdoso	-	170 ± 7,8
<i>Escherichia coli</i> O157 H:7 ATCC 35150	exp	naranja	azul verdoso	-	158 ± 8,5
	Endo	rojo	rojo oscuro con brillo metálico verdoso	-	192 ± 11,5
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	exp	rojo	rojo/c. verde	+ amarilla	215 ± 47,1
	Endo	rojo	rojo con brillo metálico ligero	-	272 ± 37,5
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	exp	rojo	Rojo	-	17,7 ± 6,4
	Endo	rojo	Rojo	-	26 ± 11,1
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	exp	rojo	violeta oscuro con halo azul	-	156 ± 48,8
	Endo	rojo	rojo con centro oscuro	-	205 ± 6,43
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	exp	rojo	violeta oscuro	-	114 ± 88,9
	Endo	rojo	Rojo oscuro	-	115 ± 40,3

exp: mezcla descrita en la invención

C: medio control

5 c.: centro

La diferenciación de diferentes representantes del grupo de coliformes es evidente en la mezcla nutritiva, sin embargo, en el m-Caldo Endo las colonias de *Enterobacter aerogenes* tienden a confundirse con algunas colonias de *E. coli* con menor brillo.

- 10 Inesperadamente se detectó la formación de un halo azul alrededor de las colonias de *Citrobacter freundii* en esta composición de la mezcla nutritiva.

Los resultados obtenidos arrojaron que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) en la recuperación de las cepas *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 13883, y *S. typhimurim* ATCC 14028 a favor de la mezcla, mientras que para los microorganismos

15 restantes no existe diferencia significativa. Estos resultados se pueden apreciar en la Fig. 7 que se muestra en los anexos.

Ejemplo No. 7

Se inocularon en paralelo la mezcla nutritiva con la misma composición de la variante V2 del Ejemplo No. 5 y el Agar S.S.

El objetivo de este ensayo fue comparar la especificidad de la mezcla nutritiva sujeto de la presente invención y el Agar S.S para la detección de *Salmonella* a partir de una mezcla de microorganismos.

El inóculo se preparó de siguiente modo:

Disolviendo 1 colonia en 10 mL de solución salina estéril se prepararon las suspensiones primarias de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Serratia marcescens* ATCC 8100, *Enterobacter cloacae* ATCC 23355, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835.

A cada suspensión se le realizaron diluciones decimales hasta 10^{-4} . Luego a un tubo con 9 mL de solución salina estéril se añadió 1 mL de la dilución 10^{-4} de cada microorganismo y se mezcló con ayuda de un agitador Vortex.

Un mL de esta mezcla se inoculó en 10 mL de Caldo Selenito y se incubó durante 24 horas a 43°C.

Una asada del Caldo Selenito se sembró en las placas de Petri con la mezcla nutritiva según la invención y Agar S.S y se incubaron a 43°C.

La lectura de los resultados se realizó con 24 horas de incubación.

En los contenedores con la mezcla nutritiva se observaron tres tipos de colonias:

1. Colonias azules con el halo azul (*Citrobacter freundii*, presuntamente)
2. Colonias rojas con el centro amarillo (*Salmonella*, presuntamente)
3. Colonias medianas transparentes con el centro rosado y fluorescencia verdosa (*Pseudomonas aeruginosa*, presuntamente).

En el Agar S.S se observaron 4 tipos de colonias:

1. Colonias blancas grandes con el centro negro (*Salmonella* o *Citrobacter*)
2. Colonias transparentes medianas con el centro negro (*Salmonella* o *Citrobacter*)
3. Colonias grandes rosadas (Coliformes)
4. Colonias pequeñas rosadas (Coliformes).

Las pruebas bioquímicas arrojaron los resultados siguientes (tabla 19):

Tabla 19. Pruebas bioquímicas de confirmación.

Pruebas	Mezcla propuesta en la invención			Agar S.S			
	1	2	3	1	2	3	4
Citrato	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	-	+	+	+	-
Lisina	-	+	+	-	+	+	+
Kligler	A/A++	K/A++	K/K--	K/A++	K/A++	K/A+ -	K/K--
Urea	-	-	-	-	-	+	-
Ramnosa	+	+	-	+	+	+	-
H ₂ S	+	+	-	+	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-
Movilidad	+	+	+	+	+	-	+

Los resultados de la identificación presuntiva en la mezcla nutritiva objeto de la invención se habían confirmado utilizando la prueba serológica con antisuero polivalente para

5 *Salmonella*.

En el Agar S.S se confirmaron como *Salmonella* solamente las colonias medianas transparentes (son lisina descarboxilasa +).

Ejemplo 8.

La mezcla nutritiva se preparó según la composición descrita en la tabla 20.

10 Tabla 20. Composición de la mezcla correspondiente al ejemplo 8.

INGREDIENTE	% peso seco
Mezcla de fracciones proteicas ricas en triptófano	36,85
Cloruro de sodio	16
Carbonato de sodio	0,33
Sales biliares	4,2
MUG	0,16
X-GAL	0,16
Mezcla de agarosa y agaropectina	42,3

Se evaluó la funcionalidad de la mezcla nutritiva en el diagnóstico de *E. coli* y coliformes en muestras de orina (donde la infección por *E. coli* y coliformes constituyen cerca del 90 % de las sepsis urinarias). Posteriormente se realizó la confirmación por pruebas bioquímicas de

15 los patógenos causantes de sepsis urinaria.

A continuación se expone una tabla resumen (tabla 21) con los valores de las incidencias de los patógenos identificados.

Tabla 21. Incidencia de los patógenos identificados por pruebas bioquímicas

Microorganismo	No. de muestras positivas	Incidencia, %
<i>Escherichia coli</i>	154	72,6
<i>Citrobacter sp.</i>	9	4,2
<i>Proteus sp.</i>	16	7,6
<i>Pseudomonas sp</i>	4	1,9
<i>Providencia sp</i>	1	0,5
<i>Klebsiella sp.</i>	12	5,7
<i>Serratia sp.</i>	3	1,4
<i>Gram positivos</i>	5	2,4
<i>Acinetobacter</i>	2	0,9
<i>Enterobacter sp</i>	6	2,8
Total	212	100

Se determinó la sensibilidad diagnóstica y la especificidad diagnóstica de la mezcla experimental. Durante la evaluación no se encontraron falsos negativos después de la identificación por lo que la especificidad diagnóstica resultó ser del 100 %. Se observó fluorescencia en una cepa de *Klebsiella* considerándose esta como un falso positivo por lo que la sensibilidad diagnóstica resultó ser del 98,04 %.

Breve Descripción de las Figuras:

Figura 1: Resultados del crecimiento de *E. coli* ATCC 10536. Se observa que sólo la mezcla nutritiva MN3, promueve en menor medida el crecimiento de *E. coli*, mientras que la variante MN2 a las 3 horas, promueve al máximo su crecimiento. A las 6 horas, prácticamente no hay diferencias en la promoción del crecimiento, a excepción de la mezcla MN3.

Figura 2: Crecimiento de *Streptococcus faecalis* ATCC 29212. Se muestra que en todas las composiciones propuestas el *Streptococcus faecalis* se encuentra inhibido en comparación con el diagnosticador de referencia.

Figura 3: Crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 en las composiciones V1, V2 y V3, y en el medio de referencia.

Figura 4: Crecimiento de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 en las composiciones V1, V2 y V3 y en el medio de referencia

Figura 5: Crecimiento de *Salmonella typhimurium* ATCC 14029 en las composiciones V1, V2 y V3 y en el medio de referencia.

Figura 6: Crecimiento de *Streptococcus faecalis* ATCC 29212 en las composiciones V1, V2 y V3 y en el medio de referencia

Figura 7: Comportamiento de diferentes microorganismos en la mezcla experimental (FCE) y en la composición de referencia.

REIVINDICACIONES

1. Una mezcla nutritiva para la identificación y recuento temprano de organismos Gram-negativos caracterizada porque contiene:
 - 5 - una mezcla de fracciones proteicas ricas en triptófano o triptófano libre, la cual se encuentra en cantidades entre el 22 y el 46 % de la mezcla total (peso/peso);
 - una mezcla de sales orgánicas y/o inorgánicas seleccionadas que se encuentra en cantidades entre el 15 y el 20 % de la mezcla total (peso/peso);
 - una mezcla de sustancias que proporcionan la aparición de color y fluorescencia, la
10 que se encuentra en cantidades entre el 0,3 y el 37 % de la mezcla total (peso/peso);
 - sustancias inhibidoras del crecimiento de los organismos Gram-positivos, las que se encuentran en cantidades entre el 2 y el 4,5 % de la mezcla total (peso/peso); y
 - una mezcla para dar la estructura sólida al medio, que comprende cantidades entre el 20 y el 50 % de la mezcla total (peso/peso).
- 15 2. Una mezcla nutritiva según la reivindicación 1, caracterizada porque la mezcla de fracciones proteicas ricas en triptófano contiene dicho aminoácido en cantidades entre el 0,25 y el 3,8 % de dicha mezcla (peso/peso).
3. Una mezcla nutritiva según la reivindicación 1, caracterizada porque la mezcla de sales orgánicas y/o inorgánicas contiene sales seleccionadas entre NaCl, K₂HPO₄,
20 KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, Na₂CO₃ y piruvato de sodio y sus mezclas, seleccionándose preferiblemente NaCl y Na₂CO₃.
4. Una mezcla nutritiva según la reivindicación 3, caracterizada porque la mezcla de sales orgánicas y/o inorgánicas contiene las siguientes cantidades (peso/peso) con respecto a la mezcla total:
 - 25 - NaCl entre el 7 y el 18 %;
 - K₂HPO₄ entre el 6 y el 11 %;
 - KH₂PO₄ entre el 2 y el 5 %;
 - (NH₄)₂SO₄ entre el 1 y el 4 %;
 - Na₂CO₃ entre el 0,1 y el 0,4 %; y
 - 30 - piruvato de sodio entre el 0,7 y el 3 %.
5. Una mezcla nutritiva según la reivindicación 1, caracterizada porque la mezcla de sustancias que proporcionan la aparición de color o fluorescencia está constituida

por sustancias seleccionadas entre X-GAL, MUG, sorbitol y rojo neutro, seleccionándose entre éstas preferiblemente X-GAL y MUG.

- 5 6. Una mezcla nutritiva según la reivindicación 5, caracterizada porque las sustancias que proporcionan la aparición de color o fluorescencia se encuentran en las siguientes cantidades (peso/peso) con respecto a la mezcla total:
 - X-GAL entre el 0,16 y el 0,36 %;
 - MUG entre el 0,16 y el 0,18 %;
 - sorbitol entre el 15 y el 36,5 %; y
 - rojo neutro entre el 0,09 y el 0,11 %.
- 10 7. Una mezcla nutritiva, según la reivindicación 1, caracterizada porque las sustancias inhibidoras del crecimiento de los organismos Gram-positivos pueden ser el desoxicolato de sodio o las sales biliares.
- 15 8. Una mezcla nutritiva, según la reivindicación 1, caracterizada porque la mezcla sustancias que dan la estructura sólida al medio de cultivo comprende las siguientes combinaciones y cantidades (peso/peso) con respecto a la mezcla total:
 - agarosa y agarpectina en cantidades entre el 19 y el 48 % con nitrato de celulosa en cantidades entre el 0,1 y el 0,4 %; ó
 - celulosa y hemicelulosa en cantidades entre el 1,4 y el 3 % con nitrato de celulosa en cantidades entre el 0,1 y el 0,4 %; ó
 - 20 - agarosa y agarpectina solamente, en cantidades entre el 19 y el 48 %.
9. Una mezcla nutritiva según las reivindicaciones de la 1 a la 8, caracterizada por presentar un pH entre 6,6 y 7,2.
- 25 10. Un procedimiento para la identificación y recuento temprano de organismos Gram-negativos, caracterizado porque la mezcla nutritiva de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9 una vez solidificada y contactada con los organismos o las muestras que los contienen, es incubada por un período de 12 a 22 horas y a temperatura de 30 a 45 °C, a partir del cual es posible la identificación de los microorganismos a simple vista, mientras que para la detección de la fluorescencia en necesario emplear luz ultravioleta de 360 a 366 nm.
- 30 11. Un procedimiento según la reivindicación 10 caracterizado porque la identificación de los microorganismos es posible por la aparición de cinco colores diferentes en las colonias, por emisiones fluorescentes de tres colores, por aparición halos de tres colores, por el cambio de coloración del medio, y por la aparición de una zona de

precipitado alrededor de las colonias, así como combinaciones de estas características.

12. Un procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque la identificación de los organismos a detectar es como sigue:

5 *Shigella sonnei* – Aparición de colonias de color verde azul, fluorescencia azul y medio naranja;

Shigella flexneri - Aparición de colonias de color rosa pálido, halo amarilloso y medio naranja;

10 *Enterobacter* (*E. aerogenes*, *E. cloacae*, *E. agglomerans*) – Aparición de colonias de color rosa a rojo con centro verde grisáceo, fluorescencia amarilla y medio de color rojo;

Escherichia coli, excepto O157:H7 – Aparición de colonias de color violeta claro, fluorescencia azul y medio de color rojo;

15 *Escherichia coli* O157:H7 – Aparición de colonias de color verde azul y medio naranja;

Citribacter freundii – Aparición de colonias de color violeta oscuro con halo azul y medio de color rojo;

Klebsiella pneumoniae – Aparición de colonias de color violeta claro y medio de color rojo;

20 *Salmonella typhi* – Aparición de colonias de color rojo y medio de color rojo con zona de precipitado opaco;

Salmonella “no typhi” – Aparición de colonias de color rojo y medio de color rojo, con aparición, después de 24 horas de incubación, de color del centro y fluorescencia amarillos;

25 *Pseudomonas aeruginosa* – Aparición de colonias de color rosa pálido, fluorescencia verdosa antes de 24 horas de incubación y medio naranja; colonias de color pardo verdoso, fluorescencia verdosa y halo de color verdoso después de 24 horas de incubación; y

30 *Proteus*, *Providencia*, *Alcaligenes* y otros Gram-negativos – Aparición de colonias incoloras o transparentes y medio naranja.

13. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque al emplear la mezcla de sustancias que proporcionan la aparición de color o fluorescencia compuesta sólo por X-GAL y MUG, la identificación de coliformes totales se realiza por el color

azul verdoso de las colonias y específicamente de *E. coli* además por la fluorescencia azul

Figura 1

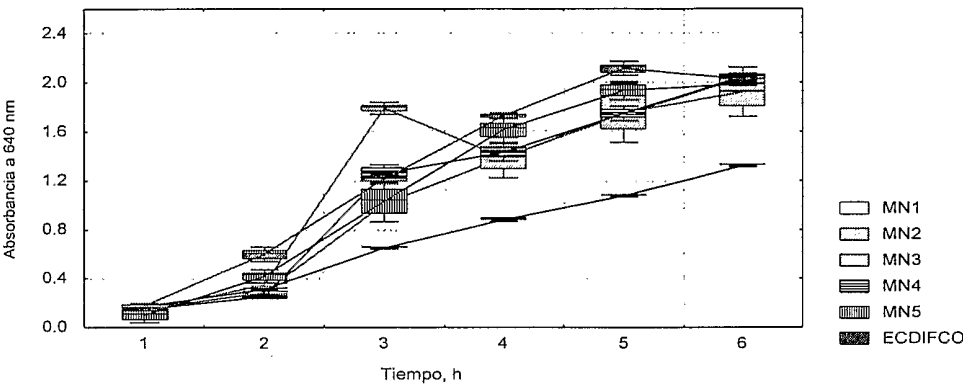


Figura 2

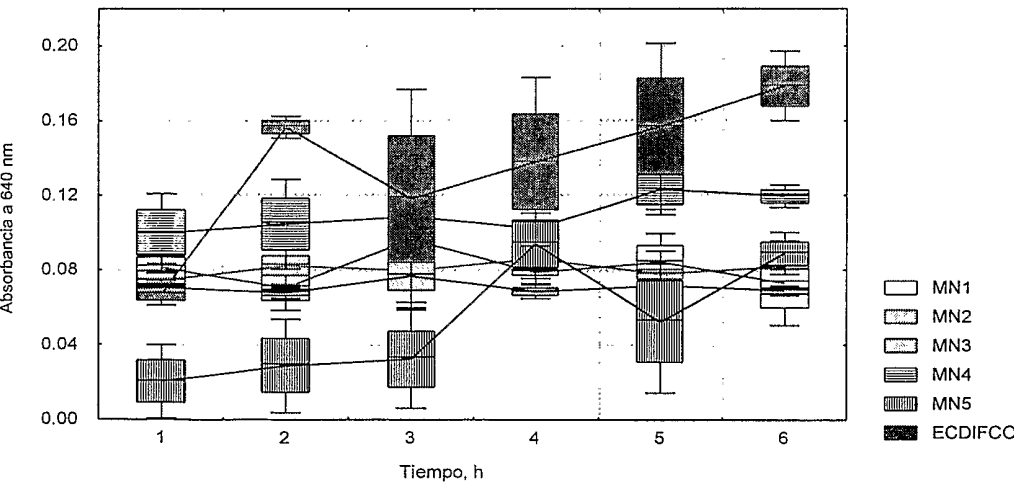


Figura 3

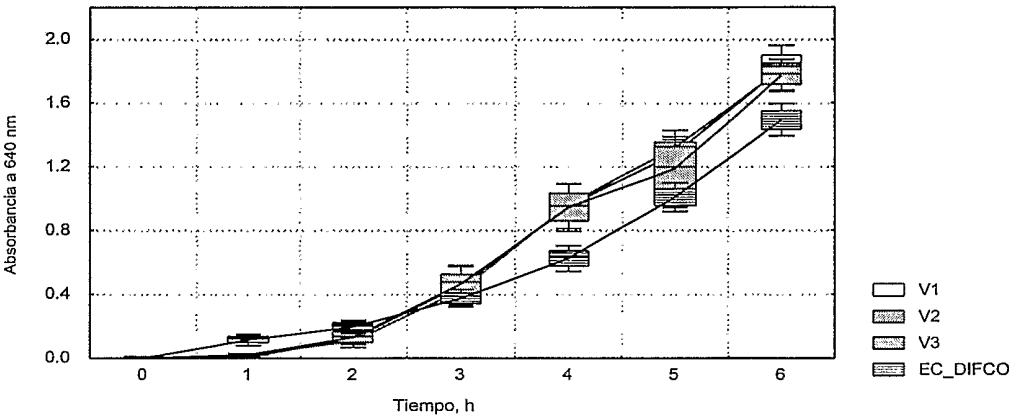


Figura 4

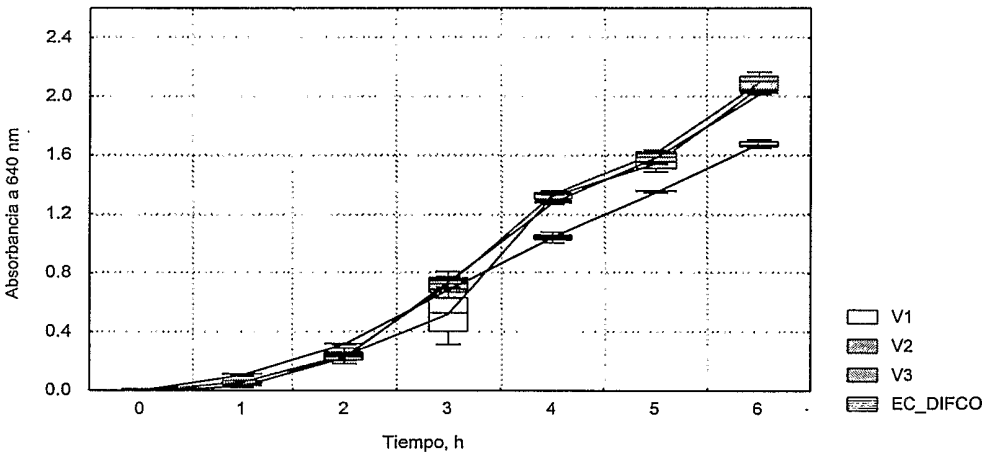


Figura 5

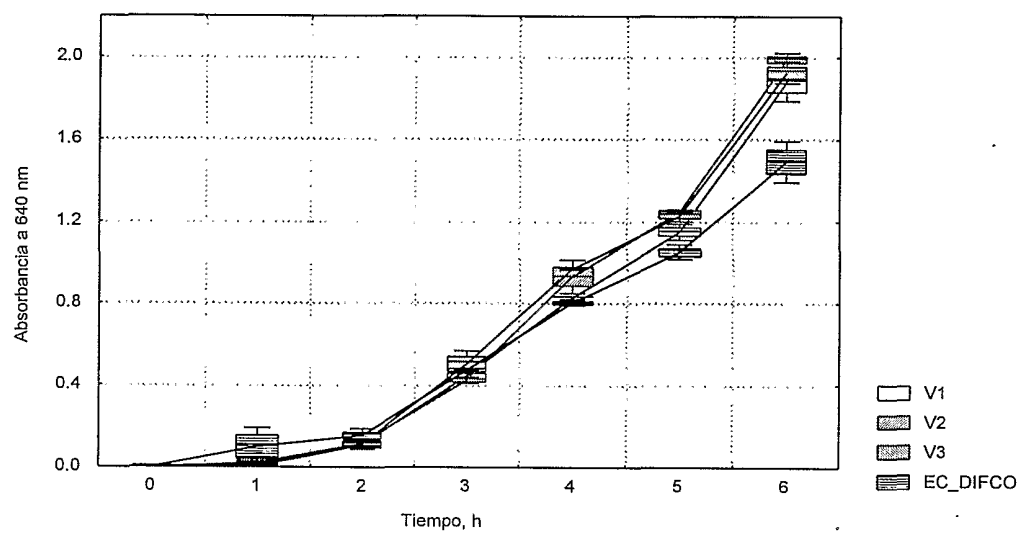


Figura 6

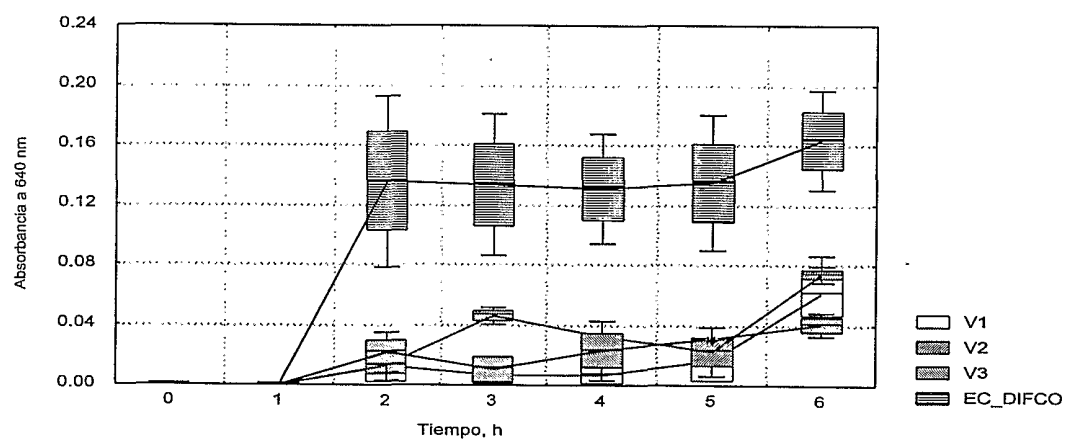
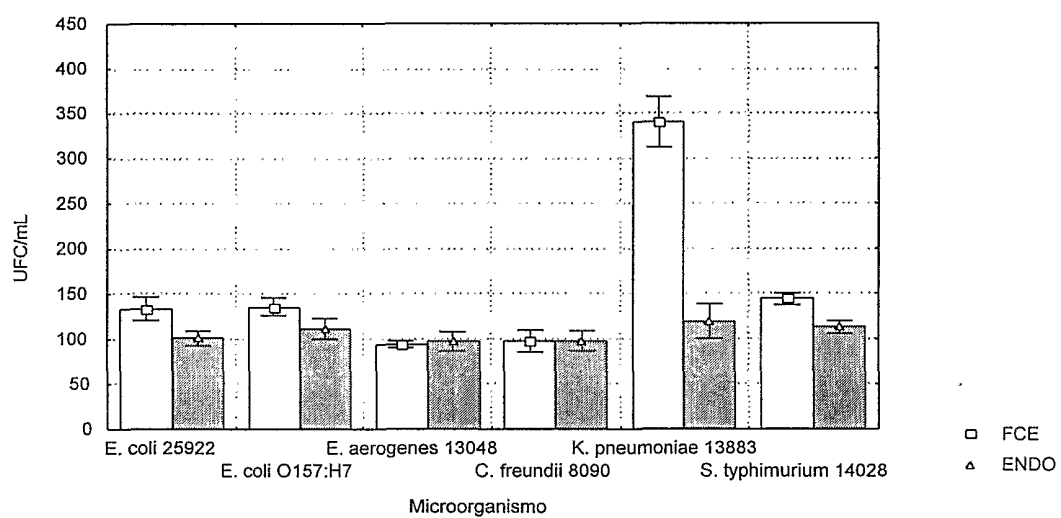


Figura 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/CU 01/00004

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/04 //(C12Q1/04,C12R1:05,1:19,1:22,1:37,1:385,1:42)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EP0-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE MEDLINE [Online] 1990 CHANG G ET AL: "Tryptophan and galactoside (TAG) media: simple and specific ways to enumerate E. coli and total coliforms in water and food" XP002901967 Abstracts (1990). Recuperado "on line" de la Base de Datos MEDLINE, en STN; Abstract no Q-12, American Society for Microbiology Resumen de la Base de Datos abstract ---	1,5
A	ES 2 079 319 A (GARCIA AGUAYO JOSE MARIA) 1 January 1996 (1996-01-01) column 2, line 15 - line 20 --- -/--	10-12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 October 2001

Date of mailing of the international search report

26. 11. 2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Inma Galindez

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/CU 01/00004

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 30543 A (ORION-YHTYMA OY) 3 October 1996 (1996-10-03) claims 1,3-5,7,9,10,13 ---	1,7,8, 10,12,17
A	US 5 194 374 A (RAMBACH ALAIN) 16 March 1993 (1993-03-16) claims 1,5-8 -----	1,7,8, 10-12,17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/CU 01/00004

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES 2079319	A	01-01-1996	ES 2079319 A1	01-01-1996
WO 9630543	A	03-10-1996	FI 951431 A	25-09-1996
			AU 5006096 A	16-10-1996
			EP 0760866 A1	12-03-1997
			WO 9630543 A1	03-10-1996
			JP 2831474 B2	02-12-1998
			JP 9511917 T	02-12-1997
			NO 964957 A	21-11-1996
			PL 317322 A1	01-04-1997
			US 5786167 A	28-07-1998
US 5194374	A	16-03-1993	FR 2646440 A1	02-11-1990
			AT 107963 T	15-07-1994
			DE 69010268 D1	04-08-1994
			DE 69010268 T2	12-01-1995
			DK 395532 T3	25-07-1994
			EP 0395532 A1	31-10-1990
			ES 2056401 T3	01-10-1994
			FR 2649410 A2	11-01-1991
			JP 2995632 B2	27-12-1999
			JP 3067599 A	22-03-1991
			US 5098832 A	24-03-1992

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU 01/00004

A. CLASIFICACION DE LA INVENCION

IPC 7 C12Q1/04 //(C12Q1/04,C12R1:05,1:19,1:22,1:37,1:385,1:42)

Según la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o la clasificación nacional y la IPC

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

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

IPC 7 C12Q C12N

Otra documentación consultada además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

EP0-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
A	Base de Datos MEDLINE [Online] 1990 CHANG G ET AL: "Tryptophan and galactoside (TAG) media: simple and specific ways to enumerate E. coli and total coliforms in water and food" XP002901967 Resumen (1990). Recuperado "on line" de la Base de Datos MEDLINE, en STN; Resumen no Q-12, American Society for Microbiology Resumen de la Base de Datos Resumen	1,5
A	ES 2 079 319 A (GARCIA AGUAYO JOSE MARIA) 1 Enero 1996 (1996-01-01) columna 2, línea 15 - línea 20 --- -/--	10-12

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales.

☒ Véase el Anexo de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

- "A" documento que define el estado general de la técnica que no se considera como particularmente pertinente
- "E" documento anterior, publicado en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma
- "L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)
- "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio
- "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

- "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención
- "X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente
- "Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia
- "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional

19 Octubre 2001

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

26. 11. 2001

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

SPTO

Funcionario autorizado

Facsímil N°

Teléfono N°

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU 01/00004

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
A	WO 96 30543 A (ORION-YHTYMA OY) 3 Octubre 1996 (1996-10-03) reivindicaciones 1,3-5,7,9,10,13 ---	1,7,8, 10,12,17
A	US 5 194 374 A (RAMBACH ALAIN) 16 March 1993 (1993-03-16) reivindicaciones 1,5-8 -----	1,7,8, 10-12,17

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/CU 01/00004

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
ES 2079319 A	01-01-1996	ES 2079319 A1	01-01-1996
WO 9630543 A	03-10-1996	FI 951431 A	25-09-1996
		AU 5006096 A	16-10-1996
		EP 0760866 A1	12-03-1997
		WO 9630543 A1	03-10-1996
		JP 2831474 B2	02-12-1998
		JP 9511917 T	02-12-1997
		NO 964957 A	21-11-1996
		PL 317322 A1	01-04-1997
		US 5786167 A	28-07-1998
US 5194374 A	16-03-1993	FR 2646440 A1	02-11-1990
		AT 107963 T	15-07-1994
		DE 69010268 D1	04-08-1994
		DE 69010268 T2	12-01-1995
		DK 395532 T3	25-07-1994
		EP 0395532 A1	31-10-1990
		ES 2056401 T3	01-10-1994
		FR 2649410 A2	11-01-1991
		JP 2995632 B2	27-12-1999
		JP 3067599 A	22-03-1991
		US 5098832 A	24-03-1992