



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 266 309**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/04** (2006.01)

**C12Q 1/44** (2006.01)

**C12Q 1/10** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12Q 1/34** (2006.01)

**C12Q 1/37** (2006.01)

**C12Q 1/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01996622 .5**

86 Fecha de presentación : **16.11.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1334206**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **13.08.2003**

54

Título: **Procedimiento y medio de detección/identificación de microorganismos con actividad esterasa y/u osidasa y/o peptidasa y/o sulfatasa y/o fosfatasa.**

30

Prioridad: **17.11.2000 FR 00 14879**

73

Titular/es: **BIO MERIEUX  
Chemin de l'Orme  
69280 Marcy l'Etoile, FR**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.03.2007**

72

Inventor/es: **Gilbert, Sandra;  
Roger-Dalbert, Céline y  
Orenga, Sylvain**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.03.2007**

74

Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 266 309 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento y medio de detección/identificación de microorganismos con actividad esterasa y/u osidasa y/o peptidasa y/o sulfatasa y/o fosfatasa.

El campo de la invención es el del análisis microbiológico por vía bioquímica, y en particular de la detección e identificación de cepas bacterianas mediante inoculación de medios de reacción, en particular de los medios nutritivos. Estos últimos comprenden sustratos cromógenos o fluorógenos susceptibles de reaccionar con las enzimas específicas para las cepas buscadas, produciendo una coloración o una fluorescencia de cada colonia en cuestión.

En el campo de la presente invención, es particularmente ventajosa la detección/identificación de microorganismos patógenos o indicadores de calidad, ya sea en un entorno médico o industrial, y más particularmente microorganismos con actividad enzimática de tipo esterasa, osidasa, peptidasa, sulfatasa o fosfatasa, por ejemplo las bacterias o levaduras del género *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Candida* y más particularmente aún a especies *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*.

Las cepas de *Escherichia coli* destacan frecuentemente por la revelación de una actividad enzimática de tipo osidasa tal como la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa o  $\beta$ -galactosidasa.

De la misma manera, el género *Listeria* se detecta destacando la actividad de  $\beta$ -glucosidasa.

Se puede utilizar asimismo una actividad de aminopeptidasa para destacar un grupo, un género o una especie de microorganismos. La actividad de alanina-aminopeptidasa, por ejemplo, permite diferenciar las bacterias Gram-negativas de las bacterias Gram-positivas.

El género *Salmonella*, responsable en el ser humano de diversas infecciones (fiebre tifoidea, intoxicación alimentaria), posee esterasas no específicas capaces de hidrolizar sustratos sintéticos cromógenos, por ejemplo indigogénicos.

La detección/identificación de salmonellas, y más generalmente de bacterias con actividad esterasa, se realiza clásicamente sobre medios agar-agar o líquidos de aislamiento, que permiten la detección/identificación de las colonias de bacterias sospechosas con actividad de esterasa, especialmente las salmonellas. La inoculación de tales medios se realiza mediante baño de dicho medio en la muestra analizada, o mediante contacto de la muestra con el medio.

Las bacterias con actividad esterasas, osidasas, peptidasas, sulfatasas o también fosfatadas, poseen en su genotipo enzimático esterasas, osidasas, peptidasas, sulfatasas o fosfatadas que rompen los enlaces diana de los sustratos presentes en el medio, y liberan así la parte cromófora o fluorófora activada de dichos sustratos. Esto da como resultado una coloración o fluorescencia que revela la hidrólisis, y por lo tanto la presencia de bacterias o de colonias de bacterias dianas.

Para poder realizar estos ensayos habituales a gran escala, es necesario que los medios de detección/identificación sean estables y permitan simplificar al máximo los procedimientos de detección/identificación correspondientes, limitando las manipulaciones. Además, es importante que los procedimientos ofrezcan una alta sensibilidad (intensidad de coloración), así como una especificidad de primer orden. La velocidad de revelación de las colonias sospechosas es asimismo un parámetro fundamental de estos tipos de medios y de procedimientos de detección/identificación de bacterias que presentan las actividades enzimáticas susodichas.

Sin embargo, se sabe que los sustratos de enzimas tales como las esterasas, osidasas, peptidasas, sulfatasas o fosfatadas poseen problemas de compatibilidad con los medios de cultivo para microorganismos, y en particular para las bacterias que poseen estas actividades. Además, tales sustratos no son estables en el tiempo, lo que induce a una disminución de la sensibilidad frente a dicha actividad enzimática al prolongarse el tiempo de conservación.

En este contexto, se conocen, a través del artículo científico titulado “*Synthèse de substrats indigogéniques. Mise en évidence de l'activité estérasique des salmonelles*”: A. Agban et al., *Eur. J. Med. Chem.* (1990) 25, 697-699, medios de cultivo de agar-agar que comprenden sustratos indigogénicos, a saber, especialmente, el pelargonato (C9) de bromo-5-indoxilo, y una sal biliar, a saber el desoxicolato de sodio. Tales medios de cultivo sufren los mismos inconvenientes que aquellos citados aquí abajo con referencia al documento FR-2.697.028.

La patente FR-2.697.028 publica un medio de cultivo para destacar la presencia de salmonellas que comprende un sustrato de esterasa cromógena constituida de un éster del ácido caprílico con un resto indol (caprilato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo), así como un detergente elegido entre las sales biliares (desoxicolato de sodio). Este cromógeno y esta sal biliar están contenidos en un medio nutritivo que permite el crecimiento de las salmonellas. Según la enseñanza del documento FR-2.697.028, la sal biliar se añade directamente al medio de selección en el que ya está incluido el sustrato de esterasa.

Otro inconveniente relacionado con el uso de sales biliares deriva del hecho de que son materias primas de origen animal, lo que implica indirectamente una cierta variabilidad de la calidad.

## ES 2 266 309 T3

Además, se pueden perfeccionar los resultados en términos de actividad biológica.

Este medio de cultivo no ofrece todas las garantías deseadas en términos de estabilidad del sustrato de esterasa. Además, se encuentra que este último no es completamente miscible con el medio de cultivo. Está claro que esto perjudica a la calidad de los resultados obtenidos desde el punto de vista de la sensibilidad, de la rapidez y de la estabilidad.

Se debe de observar asimismo que el medio de cultivo según el documento FR-2.697.023 se presenta en forma de polvo. Esto obliga al usuario a ejecutar una operación de reconstitución previa del medio líquido o agar-agar. Esta restricción resulta de la falta de estabilidad de los sustratos de esterasa usados. Además, el medio agar-agar preparado según la enseñanza del documento FR-2.697.028 no es translúcido. Esto probablemente compromete la lectura de las coloraciones asociadas con las eventuales colonias de bacterias diana.

La solicitud de patente PCT WO-92/17607 se refiere a un medio de detección para salmonellas que contiene TERGITOL-4<sup>®</sup> (hidrogenosulfato de 7-etil-2-metil-4-undecanoato, o su sal sódica). Se supone que este aditivo mejora la selectividad del medio de detección por salmonellas diana. La concentración de TERGITOL-4<sup>®</sup> puede variar de 2 hasta 30 ml/l en el medio de cultivo a base de agar gelosa/xilosa/lisina. Según este documento, la detección de salmonellas se basa únicamente en un principio de crecimiento selectivo por competición.

La solicitud PCT WO-99/41409 se refiere a sustratos de esterasa cromógenos para la detección de salmonellas. Esta solicitud PCT corresponde al documento COOKE VENITIA M. ETAL; APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 65, n° 2 de febrero de 1999 (1990-02) páginas 807-812.

En este documento, se propone usar un compuesto cromógeno que reacciona con una esterasa/lipasa específica para el género *Salmonella*, y que tiene una afinidad por los ésteres de ácidos grasos de C8. El compuesto cromógeno en cuestión comprende un anión y un catión de la fórmula: [4-[2-(4-octanoiloxi-3,5-dimetoxifenil)-vinil]-quinolinio-1-(propan-3-il)carboxilato]<sup>+</sup>.-[bromuro o cloruro]. Más precisamente, los sustratos usados son, por ejemplo, ésteres de C8 del catión carboxilato.

Además, el procedimiento según el documento WO-99/41409 describe el uso de un éster de ácido graso con sorbitan (particularmente: ácido monoláurico: TWEEN<sup>®</sup> 20). Estos productos se usan como detergentes a razón de 2 g por litro de medio.

Además, el sustrato específico según la enseñanza de esta Solicitud PCT se puede introducir en el medio de cultivo nutritivo en mezcla con metanol, etanol o N,N-dimetilformamida (DMF). El detergente eventual no se introduce junto con el sustrato y el disolvente, sino separadamente.

Independientemente de cuál sea el caso, los medios publicados en el documento WO-99/41409 no se presentan con el objeto de proporcionar una mejora de la estabilidad de los sustratos enzimáticos contenidos en el medio de detección.

Se conocen asimismo, a través de distintos documentos, medios de cultivos que contienen varios sustratos para la detección de una sola actividad enzimática, así como también medios de cultivo que contienen varios sustratos que permiten detectar actividades enzimáticas distintas.

El documento WO-95/04157 describe, por ejemplo, medios de cultivo que contienen distintos sustratos cromógenos de osidasas, tales como 5-bromo-4-cloro-3-indoxilgalactósido, 5-bromo-4-cloro-3-indoxilglucurónido, 5-bromo-4-cloro-3-indoxilglucósido o también 6-cloro-3-indoxilgalactósido. Tales medios se usan para diferenciar especialmente las bacterias de la especie *Escherichia coli* de otras coliformes.

Este documento describe asimismo un medio que contiene sustratos cromógenos específicos para distintas enzimas, tales como osidasas y fosfatasa. Estos sustratos son, por ejemplo, 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-N-acetil-glucosaminida y fosfato de 5-bromo-6-cloro-3-indoxilo. Tal medio permite especialmente diferenciar *Candida albicans* de las demás levaduras del género *Candida*.

El documento WO-00/53799 describe un medio cromógeno de detección de bacterias *Staphylococcus aureus*. Este medio contiene dos sustratos cromógenos en combinación, especialmente 5-bromo-4-cloro-3-indoxilglucósido y fosfato de 5-bromo-6-cloro-3-indoxilo. El interés principal de tal medio es evitar los falsos positivos o los falsos negativos, así como diferenciar las *S. aureus* de las demás especies o de los demás géneros tales como los *Streptococcus*.

Sin embargo, nada indica en los documentos WO-95/04157 y WO-00/53799 que los medios descritos hayan sido desarrollados a fin de mejorar la estabilidad de los sustratos enzimáticos que estos contienen.

Los ésteres de sorbitan con ácidos grasos (ESAG) son tensioactivos conocidos, ampliamente usados en las preparaciones alimentarias y farmacéuticas especialmente. A título ilustrativo, se puede citar el artículo de DICKINSON *et al.*: "J Colloid interface Sci. 15 de abril de 1999; 212(2): 466-473", que se refiere a la estabilización de emulsiones que contienen caseinato de sodio y monolaurato de sorbitan polioxitileno que contiene 20 unidades de óxido de etileno (TWEEN 20). Las emulsiones en cuestión son emulsiones de aceite en agua (30% en volumen de n-tetradecano a pH

## ES 2 266 309 T3

6,8). Este campo técnico está relativamente lejos del de la detección de bacterias con actividad enzimática específica mediante reacción coloreada en medio de cultivo selectivo.

5 En el artículo de GRAM *et al.* “*Clin. Chem. Oct. 1985; 31(10):1683-8*”, se refiere al uso de monooleato de sorbitan polioxietilenado (TWEEN 80) en un medio de ensayo de la antitrombina-III, conteniendo este medio asimismo polietilenglicol, una disolución de trombina y sustratos peptídicos cromógenos sintéticos. Los aditivos usados se presentan para permitir el aumento de la concentración de trombina activa, a fin de garantizar el buen funcionamiento del análisis. Nuevamente, hay que constatar que este tipo de preocupaciones técnicas son muy distintas a las propias del medio de detección de bacterias con actividad enzimática específica, con la ayuda de medios de cultivo selectivos que  
10 contienen sustratos cromógenos.

En tal ámbito técnico, uno de los objetivos esenciales de la presente invención es suministrar un medio de detección/identificación de bacterias con una actividad enzimática elegida entre las actividades esterases y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas, que este constituido de tal manera que se optimice la sensibilidad del análisis, es decir, que la intensidad de la coloración o fluorescencia que revelan la presencia de bacterias diana sea lo más fuerte posible.  
15

Otro objetivo esencial de la presente invención es suministrar un medio de detección/identificación de microorganismos, especialmente de bacterias o de levaduras, con actividad enzimática elegida entre las actividades esterases y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas, que sea perfectamente translúcido antes de la inoculación con la muestra a analizar.  
20

Otro objetivo esencial de la invención es suministrar un medio de detección/identificación de microorganismos, especialmente de bacterias o levaduras con actividad enzimática elegida entre las actividades esterases y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas, que contenga al menos un sustrato enzimático cromógeno o fluorógeno, elegido entre los sustratos de esterases y/o los sustratos de osidasas y/o los sustratos de peptidasas y/o los sustratos de sulfatasas y/o los sustratos de fosfatasas, y que sea estable durante el almacenamiento (intensidad de la coloración o de la fluorescencia de revelación mantenida a un nivel máximo al menos durante varias semanas).  
25

Otro objetivo esencial de la invención es suministrar un medio de detección/identificación de microorganismos, especialmente de bacterias o levaduras con actividad enzimática elegida entre las actividades esterases y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas, que no se esté en forma de polvo seco que se ha de regenerar mediante un líquido o de agar-agar, sino que exista directamente en formas listas para su uso.  
30

Otro objetivo esencial de la invención es suministrar un medio de detección/identificación de microorganismos, especialmente de bacterias o levaduras con actividad enzimática elegida entre las actividades esterases y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas, que sea económico, especialmente por el hecho de que comprende cantidades reducidas de sustrato(s) enzimáticos cromógenos o fluorógenos, el o los cuales tienen la particularidad de ser caros.  
35

Otro objetivo esencial de la invención es suministrar un procedimiento de obtención de detección/identificación susodicho que sea sencillo a usar y económico.  
40

Otro objetivo esencial de la presente invención es suministrar un procedimiento de detección/identificación de cepas con actividad enzimática elegida entre las actividades esterases y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas, que sea fácil de llevar a cabo (ensayos rutinario), que sea económico (cantidad de reactivo, manipulación, etiquetado, velocidad, etc.), que sea fiable, sensible, específico y reproducible.  
45

Otro objetivo esencial de la presente invención es proponer el uso de un nuevo aditivo estabilizador en medios de detección/identificación de microorganismos, especialmente bacterias o levaduras, con actividad enzimática elegida entre las actividades esterases y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas, mediante revelación que resulta de una reacción de hidrólisis que libera un colorante o un producto fluorescente.  
50

Estos objetivos, entre otros, se alcanzan mediante la presente invención, que se refiere en primer lugar a un medio de detección/identificación de microorganismos según la reivindicación 1.  
55

Un medio de detección/identificación de microorganismos, y especialmente de bacterias y/o levaduras con actividad enzimática elegida entre las actividades esterases y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas, según la invención, se puede obtener a partir de los medios presentados en los documentos WO-95/04157 y WO-00/53799, descritos anteriormente.  
60

El medio según la invención tiene la ventaja de ser un medio “listo para uso”, que se presenta en forma líquida o semilíquida (gel) sin que haya problemas en cuanto a su estabilidad. En efecto, los sustratos de esterases y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas, presentes en este medio y, sin embargo, conocidos por su tendencia a degradarse relativamente rápido, se estabilizan gracias a la presencia del aditivo estabilizador-emulsionante ESAG, AG o ESAG/AG.  
65

## ES 2 266 309 T3

Este aditivo, eventualmente asociado al disolvente S, induce otra ventaja, que es la de permitir una excelente disolución de los sustratos esterasas y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas, tradicionalmente renuentes a disolverse. Esto permite obtener medios de detección/identificación translúcidos antes de la inoculación. Así, la lectura de los resultados coloreados o fluorescentes es más fácil.

5

Este aditivo ESAG, AG o ESAG/AG es relativamente barato, y permite una simplificación de realización y una disminución de la cantidad de los sustratos utilizados (estabilización). Da como resultado un ahorro económico seguro.

10

Finalmente, los medios según la invención dan lugar a una mejor actividad biológica de los sustratos antes citados, lo que se traduce en una coloración más intensa de las colonias diana, y en una mejor especificidad.

15

Es meritorio haber seleccionado esta clase particular de agentes estabilizadores-emulsionantes, en particular para los ESAG, que proporciona de manera sorprendente e inesperada propiedades de estabilidad, translucidez, actividad biológica, sensibilidad, fiabilidad y especificidad, bien aceptadas en el análisis microbiológico por vía bioquímica según la invención.

20

Según una característica importante de la invención, el medio de detección/identificación al que se refiere se obtiene mezclando al menos una disolución madre del sustrato en el disolvente S y ESAG o AG o una mezcla ESAG/AG, añadido en al menos una parte de los constituyentes del medio de cultivo.

25

Conforme a la invención, parece importante solubilizar el sustrato de esterasas y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas en el disolvente S, en presencia de uno o varios ESAG, AG o mezcla de ESAG/AG que responde a la definición dada anteriormente. Después, esta mezcla de sustrato ESAG, AG, ESAG/AG y disolvente S se incorpora en al menos una parte del medio de cultivo, que está presente, preferentemente, en forma de agar agar sobreenfriada. Se pudo constatar que esta característica de operación permite una optimización de los resultados ventajosos producidos por medios según la invención.

30

Preferentemente, el ESAG se selecciona de entre el grupo constituido por:

35

- Monolaurato de sorbitán polietoxilado que comprende 20 unidades de óxido de etileno (O.E.), -TWEEN® 20-;
- Monopalmitato de sorbitán polietoxilado (20 O.E.), TWEEN® 40-;
- Monoestearato de sorbitán polietoxilado (20 O.E.), -TWEEN® 60-;
- Triestearato de sorbitán polietoxilado (20 O.E.), -TWEEN® 65-;
- Monooleato de sorbitán polietoxilado (20 O.E.), -TWEEN® 80-;
- Sesquioleato de sorbitán polietoxilado (20 O.E.), -TWEEN® 83-;
- Trioleato de sorbitán polietoxilado (20 O.E.), -TWEEN® 85-;
- y sus mezclas;

45

50

y el AG se selecciona de entre el grupo constituido por ácidos grasos saturados o insaturados de C4-C20, preferentemente ácidos grasos saturados o insaturados de C6-C11, y más preferentemente ácidos grasos de C8-C9, y sus mezclas.

55

Los productos particularmente seleccionados, según la invención, son ésteres de sorbitán ampliamente usados en la industria alimentaria y en la industria cosmética como emulsionantes no iónicos, pero hasta hoy en día nunca se utilizaron en medios de detección/identificación microbiológicas, como estabilizadores para sustratos de esterasas y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas.

60

Los “balances Hidrófilo-Lipófilo” (HLB) de los ESAG mencionados son, respectivamente: 8,6; 6,7; 4,7; 2,1; 4,3; 3,7; 1,8.

65

Según una variante interesante de la invención, el o los agentes estabilizadores-emulsionantes descritos anteriormente, en particular el o los ESAG, se pueden asociar con al menos un coagente sinérgico, preferentemente al menos un tensioactivo aniónico, y preferentemente el hidrogenosulfato de 7-etil-2-metil-4-undecilo o sus sales, y más particularmente sus sales de sodio (TERGITOL-4®).

El uso de tal coagente sinérgico facilita destacar la actividad enzimática en las bacterias diana. Se trata de un excelente complemento del o de los agentes estabilizadores-emulsionantes, y en particular ESAG. Permite mejorar la selectividad y la detección de las actividades esterasas y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas de los microorganismos diana, sin perjudicar la expresión de otras actividades enzimáticas que podrían eventualmente

## ES 2 266 309 T3

ser usadas para destacar microorganismos diana en cuestión. Sin querer estar unidos a la teoría, se supone que el coagente sinérgico TERGITOL-4<sup>®</sup> tiene una acción que favorece la penetración de los sustratos esterasas y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas cromógenos o fluorógenos, o la excreción de las enzimas a través de las membranas de las células de los microorganismos diana, optimizando así el acceso de estos sustratos frente a enzimas de las cuales se busca la actividad. Esto permite reducir la cantidad de sustrato usado, y proporciona una ventaja económica segura.

De manera aún más preferida, la asociación TWEEN<sup>®</sup> y TERGITOL-4<sup>®</sup> parece muy productiva en el medio de detección/identificación según la invención.

El sustrato cromógeno o fluorógeno, constituido de una parte diana para la enzima y de una parte cromófora o fluorófora, se elige ventajosamente entre los sustratos cuya parte diana se selecciona de entre el grupo que consta especialmente de:

- glicósidos, constituidos por unidades de mono-, di- y/o polisacáridos, unidos en  $\alpha$  o  $\beta$  a la función hidroxilo de la parte cromófora o fluorófora;
- $\alpha$ -aminoácidos o péptidos;
- ácidos orgánicos, tales como  $-\text{O}-\text{CO}(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ , en los que n está comprendido entre 0 y 20; y
- un sulfato, fosfato, pirofosfato, pirofosfato o fosfodiéster;

y cuya parte cromófora o fluorófora se selecciona de entre el grupo que consta especialmente de:

- quinonas/antraquinonas y derivados, especialmente dihidroxiantraquinona (alizarina);
- amino- o hidroxycumarinas y derivados;
- fluoresceínas y derivados; e
- indoxilos y derivados.

Como ejemplos de sustratos de esterasas, se pueden citar los sustratos de ésteres cromógenos derivados de indol, y especialmente nonanoato de 5-bromo-3-indolilo, nonanoato de 6-cloro-3-indolilo o decanoato de 5-bromo-3-indolilo.

A título de ejemplo de sustrato de esterasas cromógeno derivado de antraquinona, se puede citar el octanoato de 2-alizarina.

Como ejemplos de sustratos de osidasas, se pueden citar los sustratos de osidasas cromógenos derivados de indol, y especialmente 6-cloro-3-indol- $\beta$ -galactósido, 5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -N-acetilglucosaminida, o 5-bromo-6-cloro- $\alpha$ -glucósido.

A título de ejemplo de sustrato de osidasas cromógeno derivado de antraquinona, se puede citar el 2-alizarin- $\beta$ -glucurónido.

Como sustratos de osidasas fluorógenos, se pueden citar los sustratos derivados de hidroxycumarina, y especialmente 4-metilumbeliferona- $\beta$ -glucósido.

Como sustratos de peptidasas cromógenas, se pueden citar los sustratos derivados de indol.

Los sustratos de peptidasas fluorógenas son especialmente los sustratos derivados de hidroxycumarina, tales como el alanil-amino-metilcumarina.

Como sustratos de sulfatasas, se pueden citar los sustratos cromógenos derivados de indol, en particular sulfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo. Los sustratos de sulfatasas fluorógenas son, por ejemplo, sulfato de 4-metilumbeliferona.

De manera equivalente, entre los sustratos de fosfatasas se pueden citar sustratos cromógenos derivados de indol tales como fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo. Los sustratos de fosfatasas fluorógenos son, por ejemplo, fosfato de 4-metilumbeliferona.

El disolvente S es un auxiliar para solubilizar el sustrato enzimático de interés, en particular un sustrato cromógeno. Complementa asimismo la acción del agente estabilizador emulsionante ESAG, AG o ESAG/AG. Por lo tanto, se trata, preferentemente, de un constituyente del medio según la invención.

## ES 2 266 309 T3

Según una disposición ventajosa de esta última, el disolvente S se selecciona de entre el grupo constituido por:

- alcoholes, preferentemente metanol, etanol, metoxietanol,
- 5 - amidas, preferentemente dimetilformamida (DMF),
- disolventes azufrados, preferentemente dimetilsulfóxido (DMSO),
- disolventes acuosos, preferentemente agua, agua tamponada,
- 10 - y sus mezclas.

En la práctica, los disolventes preferidos usados son metanol, DMF y DMSO.

15 En el plano ponderal, se encuentra muy ventajosa, según la invención, que la proporción de éster de sorbitán con ácido(s) grasos (ESAG): disolvente (D) esté comprendida entre 20:80 y 80:20, preferentemente entre 30:70 y 70:30, y más preferentemente aún corresponde a 40:60 ó 60:40.

20 Desde el punto de vista del sustrato cromógeno o fluorógeno, las cantidades usadas son tales que su concentración en el medio se define según lo siguiente (en mg/l):

25	preferentemente	$1 \leq [\text{sustrato}] \leq 2000,$
	aún más preferentemente	$5 \leq [\text{sustrato}] \leq 1500,$
		$25 \leq [\text{sustrato}] \leq 1000.$

30 Refiriéndose al sustrato en la disolución ESAG y del disolvente S, las cantidades usadas son tales que su concentración en el medio se define según lo siguiente (en g/l):

35	preferentemente	$0,5 \leq [\text{sustrato en la disolución madre}] \leq 2000,$
	aún más preferentemente	$1 \leq [\text{sustrato en la disolución madre}] \leq 1000,$
		$2 \leq [\text{sustrato en la disolución madre}] \leq 200,$

40 Con respecto al medio de cultivo presente en el medio detección/identificación, se puede especificar que se selecciona de entre el grupo constituido por:

- medios selectivos de tipo: Mac Conkey, Columbia ANC, PALCAM, y Sabouraud Gentamicina-cloranfenicol, preferentemente el medio Mac Conkey,
- 45 - medios no selectivos de tipo Columbia +/- sangre, soja de Tripcasa, Gelosa nutritiva, Sabouraud, preferentemente el medio Columbia.

50 En la práctica, el experto en la materia elegirá el medio de cultivo en función de las bacterias diana, según criterios perfectamente conocidos y al alcance del experto en la materia.

Sin que sea limitativo, parece que el medio según la invención está particularmente adaptado para la detección/identificación de microorganismos de interés médico o industrial, y especialmente los del tipo *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* o *Candida*.

55 En el caso de la detección de bacterias de tipo *Salmonella*, se elegirá, por ejemplo, el medio de Mac Conkey como medio de cultivo.

60 Por otra parte, el medio según la invención puede contener otros aditivos eventuales, tales como, por ejemplo, uno o varios otros sustratos enzimáticos, por ejemplo cromógenos o fluorógenos, peptonas, uno o varios factores de crecimiento, hidratos de carbono, uno o varios agentes selectivos, tampones, y uno o varios agentes gelificantes.

65 El medio según la invención se puede presentar en forma de líquido o de gel "listo para uso", es decir, listo para la inoculación en un tubo, matraz o en cápsulas de Petri.

El medio según la invención se puede conservar varias semanas a 4°C en recipientes, y en forma líquida o de gel.

## ES 2 266 309 T3

Según otro de sus aspectos, la presente invención tiene asimismo como objetivo un procedimiento de obtención del medio tal como se define anteriormente, caracterizado porque consiste sustancialmente en:

- 5 - preparar al menos una disolución madre del sustrato de esterazas y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas, cromógeno o fluorógeno, en el disolvente S, y al menos un ESAG, AG o mezcla ESAG/AG,
- añadir esta disolución y eventualmente otros aditivos al medio de cultivo, y
- 10 - homogeneizar el conjunto.

La preparación de la disolución madre se efectúa de manera separada, incorporando sucesivamente el sustrato, el disolvente S y el ESAG, AG o mezcla de ESAG/AG, eventualmente coaditivos. Los productos y las cantidades usados son tales como se definen anteriormente.

Después de homogeneizar, la disolución madre se añade al medio de cultivo de agar-agar sobreenfriado, que se ha regenerado previamente en agua. Se puede tratar asimismo de un medio líquido no agar-agar, como por ejemplo un caldo nutritivo.

- 20 Después de mezclar el medio de cultivo y la disolución madre, se obtiene el medio de detección líquido o de agar-agar, listo para la inoculación.

Según otro de sus aspectos, la invención tiene asimismo por objeto un procedimiento de detección/identificación de cepas con actividad esterazas y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas, que consiste en:

- 25 - inocular el medio de detección/identificación tal como se define anteriormente, ya sea como un producto como tal o como un producto obtenido mediante el procedimiento descrito anteriormente, conteniendo la muestra las bacterias diana a analizar;
- 30 - incubar el medio inoculado en condiciones apropiadas conocidas por el experto en la materia; y
- leer/interpretar las coloraciones o fluorescencias de las colonias que se hayan desarrollado después de la incubación, por ejemplo, en un horno a 37°C; destacando estas coloraciones la hidrólisis del sustrato de esterazas y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas, cromógeno o fluorógeno, por las bacterias diana.
- 35

Finalmente, la invención se refiere asimismo al uso de éster(es) de sorbitán y de ácido(s) graso(s) (ESAG), de ácidos grasos (AG) o de una mezcla de ESAG/AG, como agente estabilizador-emulsionante de medio (líquido o agar-agar) de detección/identificación de microorganismos, especialmente de bacterias o de levaduras, con actividad enzimática elegida entre las actividades esterazas y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas, comprendiendo este medio especialmente un medio de reacción y al menos un sustrato de esterazas y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas, cromógeno o fluorógeno, salvo los sustratos que comprenden un carboxilato de 4-[2-(4-octanoiloxi-3,5-dimetoxifenil)-vinil]-quinolinio-1-(propan-3-ilo) y un anión, eventualmente en asociación con al menos un disolvente S del sustrato de esterazas y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas, cromógeno o fluorógeno, presente en el medio.

Los ejemplos siguientes permitirán comprender mejor la invención, y permitirá evaluar todas las ventajas, así como sus diversas variantes de realización y de utilización.

### 50 Ejemplos

#### Ejemplo 1

55 *Ensayo de solubilidad de un sustrato de esterasa a base de indoxilo, nonanoato de 5-bromo-3-indolilo (sustrato de esterasa cromógena), en un medio de agar-agar*

Se preparan distintas disoluciones madre de sustrato en metanol, en presencia de sales biliares n°3 (bioMérieux). Después, se añaden distintos volúmenes de estas disoluciones en un medio de agar-agar sobreenfriado, es decir, el medio Mac Conkey (regenerado en agua a una concentración de 50 g/l).

60 El protocolo y la observación del aspecto de los medios se dan en la tabla 1 siguiente.

65

# ES 2 266 309 T3

TABLA 1

5	Medio	1	2	3	4	5
	Concentración de sustrato de la disolución madre	100 g/l	50 g/l	25 g/l	12,5 g/l	6,25 g/l
10	Concentración final de sustrato del medio	500 mg/l				
	Concentración de sales biliares de la disolución madre	5 g/l			2,5 g/l	
15	Concentración total de sales biliar del medio	7,5 g/l			4 g/l	
20	Concentración de metanol del medio	0,5%	1%	2%	4%	8%
25	Observación del medio vertido en placas	Precipitado en forma de granos gruesos	Precipitado en forma de granos más pequeños que en el medio 1	Precipitado ligero: medio lechoso	Medio lechoso	Medio lechoso

30 Los medios más ópticamente homogéneos son los medios 3, 4 y 5, medios en los que la concentración de metanol es la más elevada. Sin embargo, el aspecto de estos medios es “lechoso”: por lo tanto, parece que el sustrato de esterasa está en forma de emulsión.

## Ejemplo 2

### 35 *Mejora de la solubilidad del sustrato de esterasa por adición de Tween®20 (ESAG)*

30 Se preparan dos disoluciones madre de sustrato distintos en el disolvente S/metanol, una en presencia de sales biliares nº3, y la otra en presencia de sales biliares nº3 y Tween®20 [monolaurato de sorbitán polietoxilado, que comprende 20 unidades de óxido de etileno (O.E)]. Después, se añade un volumen que corresponde a una concentración final de 500 mg/l de sustrato a un medio de cultivo de agar-agar sobreenfriado: el medio Mac Conkey. El protocolo y la observación del aspecto de los medios se muestran en la tabla 2 siguiente.

TABLA 2

45	Medio	1	2
	Concentración de sustrato de la disolución madre	100 g/l	40 g/l
50	Concentración final de sustrato del medio	500 mg/l	500 mg/l
	Concentración de sales biliares de la disolución madre	5 g/l	5 g/l
55	Concentración total de sales biliares del medio	6,5 g/l	6,5 g/l
	Concentración de Tween® 20 añadido a la disolución madre de sustrato	0%	60%
60	Concentración de Tween® 20 añadido al medio	0%	2,5%
	Observación del medio vertido en placas	Medio lechoso	Medio translúcido

65 El medio 2 presenta una mejor homogeneidad óptica que el medio 1. O bien el sustrato de esterasa está completamente disuelto, o bien está en forma de una emulsión cuyas partículas micelares ya no son visibles al ojo.

## ES 2 266 309 T3

### Ejemplo 3

*Ensayo biológico de los dos medios descritos en el ejemplo anterior*

5 Se inocularon microorganismos, que proceden de la colección del Solicitante, en cada uno de los dos medios anteriormente descritos, por aislamiento en tres cuadrantes, a partir de una suspensión de McFarland 0,5. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas. Las colonias formadas se examinaron visualmente después de 24 y 48 horas de incubación. Se anotaron la coloración de estas colonias así como la intensidad de esta coloración. Los resultados se presentan en la tabla 3 siguiente.

10

TABLA 3

Cepas	Tiempo de incubación	medio 1		medio 2	
		color	intensidad	color	intensidad
<i>Salmonella typhimurium</i> 10	24 h	gris	1,5	gris	3
	48 h	gris	1,5	gris	3,5
<i>Salmonella paratyphi</i> A 152	24 h	gris	1	gris	3
	48 h	gris	1,5	gris	3,5
<i>Proteus vulgaris</i> 15	24 h	-	-	-	-
	48h	-	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i> 13	24 h	gris	1,5	gris	3
	48 h	gris	1	gris	4

Intensidad de coloración: escala arbitraria; -: ausencia de coloración y de intensidad

40 El medio que contiene Tween® 20 permite por lo tanto obtener coloraciones más intensas para las cepas de microorganismos que presentan una actividad de esterasa. Por lo tanto, el sustrato se usa más ampliamente, bien porque se disuelve mejor o bien porque está más disponible. A la vista de la diferencia de intensidad entre los dos medios, parece posible, en presencia de Tween® 20, reducir la concentración de sustrato usado y por lo tanto reducir el coste generado por el uso de este tipo de sustrato.

45

### Ejemplo 4

*Ensayo de este modo de disolución para otro derivado de indoxilo (sustrato de esterasa cromógeno) sobre especies bacterianas Gram positivas y Gram negativas, y sobre levaduras*

50

Se preparó una disolución madre al 40 g/l de octanoato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (*sustrato de esterasa cromógeno*) en una mezcla metanol (40%) y Tween® 20 (60%). Después, se añadió un volumen que corresponde a una concentración final de 500 mg/l de sustrato en un medio de agar-agar sobreenfriado: un medio tipo Columbia. Este medio se vertió en cápsulas de Petri.

55

Se inocularon microorganismos, que proceden de la colección del Solicitante, mediante aislamiento en tres cuadrantes, a partir de una suspensión de McFarland 0,5. Después, las cápsulas se incubaron a 37°C durante 48 horas. Las colonias formadas se examinaron visualmente después de 24 y 48 horas de incubación. Se anotó la coloración de estas colonias, así como la intensidad de esta coloración. Los resultados se presentan en la tabla 4 siguiente.

60

65

## ES 2 266 309 T3

TABLA 4

	Tiempo de incubación	Medio 1	
		color	intensidad
5 cepas			
<i>Listeria monocytogenes</i> 023	24 h 48 h	turquesa turquesa	2,5 2,5
10 <i>Listeria innocua</i> 029	24 h 48 h	- turquesa	- 0,5
15 <i>Staphylococcus aureus</i> 276	24 h 48 h	turquesa turquesa	2,5 3
<i>Candida albicans</i> 033	24 h 48 h	turquesa turquesa	0,5 3
20 <i>Staphylococcus epidermidis</i> 009	24 h 48 h	turquesa turquesa	2 2
25 <i>Salmonella spp.</i> 017	24 h 48 h	turquesa turquesa	2 3
<i>Proteus vulgaris</i> 015	24 h 48 h	- -	- -
30	Intensidad de coloración: escala arbitraria; -: ausencia de coloración y de intensidad		

Por lo tanto, en presencia de Tween 20, es posible destacar la expresión de una actividad de esterasa en todos los microorganismos que la poseen, independientemente del grupo al que pertenecen. Por otra parte, este modo de uso es independiente del derivado de indoxilo (sustrato de esterasa cromógeno) estudiado.

### Ejemplo 5

*Sustitución del metanol por otros disolventes en presencia de Tween 20 y en ausencia o en presencia de sales bilares*

Se sustituyó el metanol usado en los ejemplos anteriores por dos otros disolventes, dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilformamida (DMF). Se ensayaron los tres disolventes en presencia de Tween 20, y en presencia o en ausencia de sales bilares a una concentración final en el medio de 6,5 g/l. La tabla 5 siguiente muestra la composición de los seis medios ensayados.

TABLA 5

Medio	1	2	3	4	5	6
Disolvente S de la disolución madre (SM)	metanol	DMSO	DMF	metanol	DMSO	DMF
% de disolvente S en la SM	40%					
% de Tween ® 20 añadido a la SM de sustrato	60%					
Concentración de sales bilares del medio	6,5 g/l			0 g/l		
Concentración final de sustrato del medio	500 mg/l					

La actividad del sustrato se verificó de la misma manera que en el ejemplo anterior, es decir, en presencia de microorganismos inoculados en un medio de agar-agar Mac Conkey que contiene el sustrato de esterasa disuelto en uno de los disolventes citados anteriormente. Los resultados se presentan en la tabla 6 siguiente.

ES 2 266 309 T3

TABLA 6

Medio		1		2		3		4		5		6	
Cepas	TI	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I
<i>Salmonella typhimurium</i> 10	24 48	gris gris	2 2,5	gris gris	2 2,5	gris gris	2 2,5	gris gris	2 2,5	gris gris	2 2,5	gris gris	2 2,5
<i>Salmonella arizonae</i> 15	24 48	gris gris	2 2,5	gris gris	2,5 3	gris gris	2 2,5	gris gris	2 2,5	gris gris	2,5 3	gris gris	2 2,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 15	24 48	gris gris	2 2,5	gris gris	2 4	gris gris	1 3,5	gris gris	2 3	gris gris	2 4	gris gris	1 4
<i>Proteus vulgaris</i> 15	24 48	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
<i>Serratia marcescens</i> 38	24 48	gris gris	2,5 2,5	gris gris	2 2	gris gris	2 2	gris gris	2,5 2,5	gris gris	2 2	gris gris	2 2

I: Intensidad de coloración (escala arbitraria); C: color; TI: tiempo de incubación en horas; -: incoloro

Por lo tanto, es posible usar disolventes distintos para disolver el sustrato de esterasa cuando el Tween 20 está presente. Por otra parte, la adición de sales biliares no aporta nada, ya sea en términos de solubilidad o en términos de resultados biológicos, independientemente del disolvente ensayado. Conclusión, el modo de disolución más sencillo es la mezcla de un disolvente y de Tween® 20 sin aportación suplementaria de sales biliares.

Ejemplo 6

Ensayo de distintas relaciones de disolvente S/Tween 20

Se prepararon distintas disoluciones madre de sustrato en DMSO en presencia de Tween® 20. Cada disolución madre corresponde a una relación DMSO/Tween® 20 distinta. Después, se añade un volumen correspondiente a una concentración final de 500 mg/l de sustrato en un medio de agar-agar sobreenfriado: el medio Mac Conkey. La tabla 7 siguiente muestra la composición de los seis medios ensayados.

TABLA 7

Medio	1	2	3	4	5	6
% de DMSO en la disolución madre	10%	20%	30%	40%	50%	60%
% de Tween® 20 añadido a la disolución madre de sustrato	90%	80%	70%	60%	50%	40%

Se inocularon microorganismos, que proceden de la colección del Solicitante, sobre cada uno de los seis medios descritos anteriormente, por aislamiento en tres cuadrantes, a partir de una suspensión McFarland 0,5. Se incubaron las cápsulas a 37°C durante 48 horas. Las colonias formadas se examinaron visualmente después de 24 y 48 horas de incubación. Se anotó la coloración de estas colonias, así como la intensidad de esta coloración. Los resultados se presentan en la tabla 8 siguiente.

TABLA 8

Medio		1		2		3		4		5		6	
Cepas	TI	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I
<i>Salmonella typhimurium</i> 10	24 48	gris gris	2,5 3	gris gris	2,5 3	gris gris	2 2,5	gris gris	3 3,5	gris gris	3 3	gris gris	3 3,5
<i>Salmonella arizonae</i> 15	24 48	gris gris	2,5 2,5	gris gris	2,5 2,5	gris gris	3 3	gris gris	3,5 3,5	gris gris	3 3	gris gris	3,5 3,5
<i>Serratia marcescens</i> 045	24 48	gris gris	3 4	gris gris	3 4	gris gris	3 4	gris gris	4 4	gris gris	3,5 4	gris gris	3,5 4
<i>Hafnia alvei</i> 025	24 48	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 165	24 48	gris gris	2 2	gris gris	2 2	gris gris	3 2	gris gris	3 3	gris gris	3 3	gris gris	3 3
<i>Salmonella paratyphi</i> A 006	24 48	gris gris	1,5 2	gris gris	1,5 2	gris gris	2 2	gris gris	3 3	gris gris	2,5 3	gris gris	3 3
<i>Salmonella typhi</i> 118	24 48	gris gris	2 2	gris gris	2 2	gris gris	2 2	gris gris	3 3	gris gris	2 2	gris gris	3 3

I: Intensidad de coloración (escala arbitraria); C: color; TI: tiempo de incubación en horas; -: incoloro

## ES 2 266 309 T3

Las seis relaciones ensayadas permiten obtener una buena solubilidad de los sustratos, y destacar la hidrólisis del sustrato con intensidades de coloración muy buenas. Las intensidades de coloración máximas se obtienen entre las relaciones 40% de DMSO/60% de Tween® 20 y 60% de DMSO/40% de Tween® 20.

### 5 Ejemplo 7

*Ensayo del procedimiento de solubilización en un sustrato de esterasa que tiene una parte marcador distinto de un indoxilo*

10 El sustrato ensayado es el octanoato 1,2-dihidroxiantraquinona (octanoato de 2-alizarina). Se preparan distintas disoluciones madre de sustrato usando como disolvente DMF o DMSO o metanol o metoxietanol, y, en todos los casos, en presencia de Tween® 20. La tabla 9 siguiente muestra el aspecto de las disoluciones madre en función de su composición.

15 **TABLA 9**

Disolvente de la disolución madre	Metanol	DMSO	DMF	Metoxietanol
% de disolvente en la disolución madre	40%			
% de Tween® 20 añadido a la disolución madre de sustrato	60%			
Aspecto de la disolución madre	precipitado	precipitado	Disolución total	Disolución total

30 Después, se añade un volumen que corresponde a una concentración final de 100 mg/l de sustrato en un medio de agar-agar sobreenfriado: el medio Mac Conkey. Se añade asimismo citrato de hierro a una concentración final de 50 mg/l al medio, a fin de permitir la revelación de la actividad de esterasa en presencia de un sustrato a base de alizarina. Sólo se ensayó una de las disoluciones madre que presenta una disolución total del sustrato (disolución madre en DMF). Se inocularon microorganismos, que proceden de la colección del Solicitante, sobre cada uno de los dos medios anteriormente descritos, mediante aislamiento en tres cuadrantes, a partir de una suspensión McFarland 0,5. Las cápsulas se incubaron a 37°C durante 48 horas. Las colonias formadas se examinaron visualmente después de 24 y 48 horas de incubación. Se anotaron la coloración de estas colonias, así como la intensidad de esta coloración. Los resultados se presentan en la tabla 10.

40 **TABLA 10**

Cepas	Tiempo de incubación	Medio con DMF	
		color	intensidad
<i>Salmonella typhimurium</i> 10	24 h	malva	1
	48 h	malva	2
<i>Salmonella enteritidis</i> 036	24 h	malva	1
	48 h	malva	3
<i>Salmonella arizonae</i> 018	24 h	malva	1
	48 h	malva	2
<i>Escherichia coli</i> 002	24 h	-	-
	48 h	-	-
<i>Serratia marcescens</i> 045	24 h	malva	3,5
	48 h	malva	3,5
<i>Staphylococcus aureus</i> 033	24 h	malva	3
	48 h	malva	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 165	24 h	malva	2
	48 h	malva	2

## ES 2 266 309 T3

TABLA 10 (continuación)

		Tiempo de incubación	Medio con DMF	
5	Cepas		color	intensidad
	<i>Salmonella gallinarum</i>	24 h	malva	0,5
	500	48 h	malva	3
10	I: Intensidad de coloración: escala arbitraria; -: ausencia de coloración y de intensidad			

Por lo tanto, este modo de disolución no es específico de los ésteres de indoxilo, pero se puede usar especialmente con otras familias de sustratos enzimáticos.

### Ejemplo 8

*Ensayo de distintos ESAG derivados de Tween® 20 para determinar la solubilización de un sustrato de esterasa, el nonanoato de 5-bromo-3-indolilo*

Se preparan distintas disoluciones madre de sustrato en DMSO, en presencia de Tween® 20 o Tween® 80 (monooleato de sorbitán polietoxilado), o Tween® 60 (monoestearato de sorbitán polietoxilado), o Tween® 65 (triestearato de sorbitán polietoxilado). Después, se añade un volumen que corresponde a una concentración final de 500 mg/l de sustrato en un medio de agar-agar sobreenfriado: el medio Mac Conkey. La tabla 11 muestra la composición de los medios ensayados.

TABLA 11

	Medio	1	2	3	4
	% de DMSO en la disolución madre	40%	40%	40%	40%
	% de Tween 20 añadido a la disolución madre de sustrato	60%	-	-	-
35	% de Tween 60 añadido a la disolución madre de sustrato	-	60%	-	-
	% de Tween 65 añadido a la disolución madre de sustrato	-	-	60%	-
40	% de Tween 80 añadido a la disolución madre de sustrato	-	-	-	60%

Se inocularon microorganismos, que proceden de la colección del Solicitante, en cada uno de los seis medios descritos anteriormente, mediante aislamiento en tres cuadrantes, a partir de una suspensión Mc Farland 0,5. Se incubaron las cápsulas a 37°C durante 48 horas. Las colonias formadas se examinaron visualmente después de 24 y 48 horas de incubación. Se anotó la coloración de estas colonias, así como la intensidad de esta coloración. Los resultados se presentan en la tabla 12.

TABLA 12

	Medio	1		2		3		4	
	TI	C	I	C	I	C	I	C	I
	<b>Cepas</b>								
	<i>Salmonella typhimurium</i>	24	gris	2,5	gris	2	-	-	gris 2
55	10	48	gris	3	gris	2	-	-	gris 2
	<i>Salmonella arizonae</i>	24	gris	2,5	gris	1	-	-	gris 1
	15	48	gris	3	gris	2	-	-	gris 3
	<i>Salmonella paratyphi A</i>	24	gris	1,5	gris	1	-	-	gris 1
	006	48	gris	3,5	gris	2	-	-	gris 3
60	<i>Salmonella typhi</i>	24	gris	2	gris	1	-	-	gris 1
	118	48	gris	2,5	gris	2	-	-	gris 2
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24	gris	3	gris	0,5	-	-	gris 4
	165	48	gris	3	gris	2	-	-	gris 4
	<b>Hafnia alvei</b>	24	-	-	-	-	-	-	-
65	025	48	-	-	-	-	-	-	-
	I: intensidad de coloración (escala arbitraria); C: color; TI: tiempo de incubación; -: incoloro								

## ES 2 266 309 T3

Nota: se prepararon distintas relaciones de Tween®/disolvente para cada Tween® ensayado. Sin embargo, se da sólo una relación en este ejemplo, porque los resultados eran muy similares independientemente de la relación estudiada.

El Tween® 20, Tween® 80 y Tween® 60 permiten obtener una buena solubilidad de los sustratos, y destacar la hidrólisis del sustrato con intensidades muy satisfactoria.

### Ejemplo 9

*Estabilidad comparada de medios de agar-agar que contienen un sustrato de esterasa, el nonanoato de 5-bromo-3-indolilo, solubilizado o no en presencia de Tween® 20*

Se prepararon dos disoluciones madre: una con 40 g/l en metanol en presencia de 6,5 g/l de sales biliares nº3, la otra con 40 g/l en una mezcla de DMSO (40%) y Tween® 20 (60%). Después, se añadió un volumen que corresponde a una concentración final de 500 mg/l de sustrato en un medio de agar-agar sobreenfriado, el medio Mac Conkey. Se vertieron estos dos medios en cápsulas de Petri de un diámetro de 90 mm, y se almacenaron a +4°C durante 8 semanas. Después de una semana, dos semanas, cuatro semanas y ocho semanas, se prepararon extemporáneamente dos medios iguales a los descritos anteriormente.

Se inocularon microorganismos, que proceden de la colección del Solicitante, por aislamiento en tres cuadrantes, a partir de una suspensión McFarland 0,5, sobre los dos medios preparados extemporáneamente, y sobre los dos medios conservados a +4°C. Se incubaron las cápsulas a 37°C durante 48 horas. Las colonias formadas se examinaron visualmente después de 24 y 48 horas de incubación. Se anotaron la coloración de estas colonias, así como la intensidad de esta coloración. Los resultados se presentan en las tablas siguientes.

TABLA 13

Medio		Fresco		Conservado 1 semana		fresco		Conservado 1 semana	
		Metanol sales biliares		Metanol sales biliares		DMSO Tween 20		DMSO Tween 20	
Cepas	TI	C	I	C	I	C	I	C	I
<i>Salmonella typhimurium</i>	24 h	gris	0,5	gris	0,5	gris	3	gris	3
	48 h	gris	1,5	gris	1,5	gris	4	gris	4
<i>Salmonella arizonae</i>	24 h	gris	1	gris	1	gris	3	gris	3
	48 h	gris	1,5	gris	1,5	gris	4	gris	4
<i>Salmonella paratyphi A</i>	24 h	-	-	-	-	gris	2	gris	2
	48 h	gris	0,5	gris	0,5	gris	4	gris	4
<i>Salmonella typhi</i>	24 h	gris	0,5	gris	0,5	gris	3	gris	3
	48 h	gris	1,5	gris	1,5	gris	4	gris	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24 h	gris	1	gris	1	gris	2	gris	2
	48 h	gris	1	gris	1	gris	3	gris	3
<i>Hafnia alvei</i>	24 h	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-	-	-	-	-

ES 2 266 309 T3

TABLA 14

Medio		Fresco		Conservado 2 semana		fresco		Conservado 2 semana	
		Metanol sales biliares		Metanol sales biliares		DMSO Tween 20		DMSO Tween 20	
Cepas	TI	C	I	C	I	C	I	C	I
<i>Salmonella typhimurium</i> 10	24 h	gris	0,5	gris	0,5	gris	3	gris	3
	48 h	gris	1,5	gris	1,5	gris	4	gris	4
<i>Salmonella arizonae</i> 15	24 h	gris	1	gris	0,1	gris	3	gris	3
	48 h	gris	1,5	gris	0,5	gris	4	gris	4
<i>Salmonella paratyphi A</i> 006	24 h	-	-	-	-	gris	2	gris	2
	48 h	gris	0,5	gris	0,1	gris	4	gris	4
<i>Salmonella typhi</i> 118	24 h	gris	0,5	-	-	gris	3	gris	3
	48 h	gris	1,5	gris	0,5	gris	4	gris	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 165	24 h	gris	1	gris	1	gris	2	gris	2
	48 h	gris	1	gris	1	gris	3	gris	3
<i>Hafnia alvei</i> 025	24 h	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLA 15

Medio		Fresco		Conservado 4 semana		fresco		Conservado 4 semana	
		Metanol sales biliares		Metanol sales biliares		DMSO Tween 20		DMSO Tween 20	
Cepas	TI	C	I	C	I	C	I	C	I
<i>Salmonella typhimurium</i> 10	24 h	gris	0,5	-	-	gris	3	gris	3
	48 h	gris	1,5	gris	0,5	gris	4	gris	4
<i>Salmonella arizonae</i> 15	24 h	gris	1	gris	0,1	gris	3	gris	3
	48 h	gris	1,5	gris	0,5	gris	4	gris	4
<i>Salmonella paratyphi A</i> 006	24 h	-	-	-	-	gris	2	gris	2
	48 h	gris	0,5	gris	0,1	gris	4	gris	4
<i>Salmonella typhi</i> 118	24 h	gris	0,5	-	-	gris	3	gris	3
	48 h	gris	1,5	gris	0,5	gris	4	gris	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 165	24 h	gris	1	gris	0,5	gris	2	gris	2
	48 h	gris	1	gris	1	gris	3	gris	3
<i>Hafnia alvei</i> 025	24 h	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-	-	-	-	-

ES 2 266 309 T3

TABLA 16

Medio	TI	Fresco		Conservado 8 semana		fresco		Conservado 8 semana	
		Metanol sales biliares	I	Metanol sales biliares	I	DMSO Tween 20	I	DMSO Tween 20	I
<b>Cepas</b>		<b>C</b>	<b>I</b>	<b>C</b>	<b>I</b>	<b>C</b>	<b>I</b>	<b>C</b>	<b>I</b>
<i>Salmonella typhimurium</i> 10	24 h	gris	0,5	-	-	gris	3	gris	2,5
	48 h	gris	1,5	gris	0,5	gris	4	gris	3,5
<i>Salmonella arizonae</i> 15	24 h	gris	1	-	-	gris	3	gris	3
	48 h	gris	1,5	gris	0,5	gris	4	gris	3
<i>Salmonella paratyphi A</i> 006	24 h	-	-	-	-	gris	2	gris	1,5
	48 h	gris	0,5	-	-	gris	4	gris	3
<i>Salmonella typhi</i> 118	24 h	gris	0,5	-	-	gris	3	gris	2
	48 h	gris	1,5	gris	0,5	gris	4	gris	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 165	24 h	gris	1	gris	0,5	gris	2	gris	2
	48 h	gris	1	gris	1	gris	3	gris	3
<i>Hafnia alvei</i> 025	24 h	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-	-	-	-	-

I: Intensidad de coloración (escala arbitraria); C: color; TI: tiempo de incubación; -: Incoloro

El medio que contiene el sustrato disuelto en una mezcla de metanol u sales biliares presenta una caída muy importante de la expresión de la actividad de esterasa después de 2 semanas de conservación. Esta caída se amplifica con el tiempo. El medio que contiene el sustrato disuelto en la mezcla de DMSO y Tween 20 presenta una expresión de la actividad de esterasa constante en el tiempo, hasta por lo menos seis semanas. Después de ocho semanas, hay una ligera caída de la expresión de la actividad de esterasa, pero que no es prohibitiva. El Tween 20 permite por lo tanto estabilizar el sustrato de esterasa, y facilita la conservación y el uso de medios de cultivo que contienen este tipo de sustrato.

Nota: En los ejemplos anteriormente, los números siguientes a las cepas corresponden al número de cada cepa referenciada en la colección del Solicitante. La intensidad de coloración corresponde a una escala arbitraria cuya significado es la siguiente:

- 0 ninguna actividad
- 0,1 traza de coloración
- 0,5 coloración muy pálida
- 1 coloración neta de baja intensidad
- 2 clara coloración de intensidad media
- 3 coloración intensa
- 4 coloración muy intensa

Ejemplo 10

*Estabilidad comparada de medios de agar-agar que contienen un sustrato de osidasa, 6-cloro-3-indol-β-N-acetilglucosaminida, solubilizado o no en presencia de Tween® 20*

Se preparan dos disoluciones madre de sustrato: una con 50 g/l en DMF, la otra con 50 g/l en una mezcla de DMF (40%) y Tween® 20 (60%). Después, se añade un volumen que corresponde a una concentración final de 175 mg/l de sustrato en un medio de agar-agar sobreenfriado, el medio Columbia sin sangre. Estos dos medios se vertieron en cápsulas de Petri de un diámetro de 90 mm, y se almacenaron a +4°C durante 8 semanas. Después de tres semanas, seis semanas, nueve semanas y doce semanas, se prepararon dos medios extemporáneamente iguales a los descritos anteriormente.

## ES 2 266 309 T3

Se inocularon microorganismos, que proceden de la colección del Solicitante, por aislamiento en tres cuadrantes, a partir de una suspensión McFarland 0,5, sobre los dos medios preparados extemporáneamente, y sobre los dos medios se conservaron a +4°C. Las cápsulas se incubaron a 37°C durante 48 horas. Las colonias formadas se examinaron visualmente después de 24 y 48 horas de incubación. Se anotaron la coloración de estas colonias, así como la intensidad de esta coloración. Los resultados se presentan en las tablas siguientes.

TABLA 17

Medio		Fresco		Conservado 3 semana		fresco		Conservado 3 semana	
		DMF		DMF		DMSO Tween 20		DMSO Tween 20	
Cepas	TI	C	I	C	I	C	I	C	I
<i>Listeria innocua</i> 36	24 h	M	2	M	1,5	M	2	M	2
	48 h	M	3	M	3	M	3	M	3
<i>Listeria ivanovii</i> 18	24 h	M	1,5	M	1	M	1,5	M	1,5
	48 h	M	2,5	M	2,5	M	2,5	M	2,5
<i>Listeria monocytogenes</i> 23	24 h	M	2	M	1,5	M	2	M	2
	48 h	M	3	M	3	M	3	M	3
<i>Staphylococcus aureus</i> 20	24 h	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 165	24 h	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLA 18

Medio		Fresco		Conservado 6 semana		fresco		Conservado 6 semana	
		DMF		DMF		DMSO Tween 20		DMSO Tween 20	
Cepas	TI	C	I	C	I	C	I	C	I
<i>Listeria innocua</i> 36	24 h	M	2	M	1	M	2	M	2
	48 h	M	3	M	2	M	3	M	3
<i>Listeria ivanovii</i> 18	24 h	M	1,5	M	0,5	M	1,5	M	1,5
	48 h	M	2,5	M	2	M	2,5	M	2,5
<i>Listeria monocytogenes</i> 23	24 h	M	2	M	1	M	2	M	2
	48 h	M	3	M	2	M	3	M	3
<i>Staphylococcus aureus</i> 20	24 h	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 165	24 h	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-	-	-	-	-

ES 2 266 309 T3

TABLA 19

Medio		Fresco		Conservado 9 semana		fresco		Conservado 9 semana	
		DMF		DMF		DMSO Tween 20		DMSO Tween 20	
Cepas	TI	C	I	C	I	C	I	C	I
<i>Listeria innocua</i> 36	24 h	M	2	M	0,5	M	2	M	1,5
	48 h	M	3	M	1	M	3	M	2,5
<i>Listeria ivanovii</i> 18	24 h	M	1,5	M	-	M	1,5	M	1
	48 h	M	2,5	M	0,5	M	2,5	M	2,5
<i>Listeria monocytogenes</i> 23	24 h	M	2	M	0,5	M	2	M	1
	48 h	M	3	M	0,5	M	3	M	2
<i>Staphylococcus aureus</i> 20	24 h	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 165	24 h	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLA 20

Medio		Fresco		Conservado 12 semana		fresco		Conservado 12 semana	
		DMF		DMF		DMSO Tween 20		DMSO Tween 20	
Cepas	TI	C	I	C	I	C	I	C	I
<i>Listeria innocua</i> 36	24 h	M	2	M	-	M	2	M	1
	48 h	M	3	M	0,5	M	3	M	2,5
<i>Listeria ivanovii</i> 18	24 h	M	1,5	M	-	M	1,5	M	1
	48 h	M	2,5	M	-	M	2,5	M	2
<i>Listeria monocytogenes</i> 23	24 h	M	2	M	-	M	2	M	1
	48 h	M	3	M	-	M	3	M	2
<i>Staphylococcus aureus</i> 20	24 h	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 165	24 h	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-	-	-	-	-

I: Intensidad de coloración (escala arbitraria); C: color; TI: tiempo de incubación; M: Magenta; -: incoloro

El medio que contiene el sustrato disuelto en DMF solo presenta una caída muy importante de expresión de la actividad de  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa después de tres semanas de conservación. Esta caída se amplifica con el tiempo. Ya no es posible detectar una actividad después de doce semanas. El medio que contiene el sustrato disuelto en la mezcla de DMF y Tween 20 presenta una expresión de la actividad de  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa constante en el tiempo, hasta al menos seis semanas. Después de nueve y doce semanas, existe una ligera caída de la expresión de la actividad de  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa, pero que no es prohibitiva. El Tween 20 permite por lo tanto estabilizar el sustrato de  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa, y facilita la conservación y el uso de medios de cultivo que contienen este tipo de sustratos.

## ES 2 266 309 T3

En los ejemplos anteriormente, los números siguientes a las cepas corresponden a los números de cada cepa referenciada en la colección del Solicitante. La intensidad de coloración corresponde a una escala arbitraria cuya significación es la siguiente:

5	0	ninguna actividad
	0,1	traza de coloración
	0,5	coloración muy pálida
	1	coloración neta de baja intensidad
10	2	clara coloración de intensidad media
	3	coloración intensa
	4	coloración muy intensa

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Medio de detección/identificación de microorganismos, y en particular de bacterias y/o de levaduras con actividad enzimática, seleccionada de entre las actividades de esterasas y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas, del tipo de los que comprenden especialmente un medio de reacción, y al menos un sustrato de esterasas y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas, cromógeno o fluorógeno, excluyendo los sustratos que comprenden un catión de 4-[2-(4-octanoiloxi-3,5-dimetoxifenil)-vinil]-quinolinio-1-(ácido propan-3-il-carboxílico) y un anión, basándose esta detección/identificación sustancialmente en la revelación de la actividad esterasa y/o osidasa y/o peptidasa y/o sulfatasa y/o fosfatasa, dicho medio:

\* está en forma líquida o gel listo para uso y estable para la conservación, es decir, la intensidad de la coloración o la fluorescencia se mantiene a un nivel máximo al menos durante varias semanas;

\* comprende:

- al menos un éster de sorbitán con ácido(s) grasos(s) (ESAG), o al menos un ácido graso (AG), o una mezcla de ESAG/AG, como agente estabilizador-emulsionante,
- la concentración de [ESAG] en el medio se define según lo siguiente (% en peso):  $0,5 \leq [ESAG] \leq 5$ , preferentemente  $1,5 \leq [ESAG] \leq 3,5$ ;
- y eventualmente al menos un disolvente (S).

2. Medio según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se obtiene mezclando al menos una disolución madre de sustrato en el disolvente S y ESAG, AG o mezcla de ESAG/AG, con al menos una parte de los constituyentes del medio de cultivo.

3. Medio según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque el ESAG se selecciona de entre el grupo constituido por:

- Monolaurato de sorbitán polietoxilado que comprende 20 unidades de óxido de etileno (O.E.), -TWEEN® 20-;
- Monopalmitato de sorbitán polietoxilado (20 O.E.), TWEEN® 40-;
- Monoestearato de sorbitán polietoxilado (20 O.E.), -TWEEN® 60-;
- Triestearato de sorbitán polietoxilado (20 O.E.), -TWEEN® 65-;
- Monooleato de sorbitán polietoxilado (20 O.E.), -TWEEN® 80-;
- Sesquioleato de sorbitán polietoxilado (20 O.E.), -TWEEN® 83-;
- Trioleato de sorbitán polietoxilado (20 O.E.), -TWEEN® 85-;
- y sus mezclas;

4. Medio según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque el AG se selecciona de entre el grupo constituido por ácidos grasos saturados o insaturados de C4-C20, preferentemente ácidos grasos saturados o insaturados de C6-C11 y más preferentemente ácidos grasos de C8-C9; y sus mezclas.

5. Medio según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque comprende asimismo al menos un tensioactivo aniónico, preferentemente hidrogenosulfato de 7-etil-2-metil-4-undecilo o sus sales, y más particularmente sus sales de sodio (TERGITOL-4®).

6. Medio según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque el sustrato cromógeno o fluorógeno está constituido de una parte diana de la enzima, y de una parte cromófora o fluorófora, siendo la parte diana seleccionada de entre el grupo constituido en particular por:

- glicósidos, constituidos por unidades de mono-, di- y/o polisacaridos, unidos en  $\alpha$  o en  $\beta$  a la función hidroxilo de la parte fluorófora o cromófora;
- los ácidos  $\alpha$ -aminados o péptidos;
- ácidos orgánicos, tales como  $-O-CO(CH_2)_n-CH_3$ , con n comprendido entre 0 y 20;
- sulfato, fosfato, piro-sulfato, piro-fosfato o fosfodiéster;

## ES 2 266 309 T3

siendo la parte cromófora o fluorófora seleccionada de entre el grupo constituido en particular por:

- quinonas/antraquinonas y derivados, especialmente dihidroxiantraquinona (alizarina);
- amino- o hidroxycumarinas y derivados;
- fluoresceínas y derivados;
- indoxilos y derivados.

7. Medio según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque el disolvente S se selecciona de entre el grupo constituido por:

- alcoholes, preferentemente metanol, etanol, metoxietanol;
- amidas, preferentemente dimetilformamida (DMF);
- disolventes azufrados, preferentemente dimetilsulfóxido (DMSO);
- disolventes acuosos, preferentemente agua, agua tamponada;
- y sus mezclas.

8. Medio según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque la proporción ponderal de éster de sorbitán con ácido(s) graso(s) (ESAG): disolvente(s) está comprendida entre 20:80 y 80:20, preferentemente está comprendida entre 30:70 y 70:30, y más preferentemente aún corresponde a 40:60 ó 60:40.

9. Medio según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque la concentración en [sustrato] en el medio se define según lo siguiente (en mg/l):

	$1 \leq [\text{sustrato}] \leq 2000,$
preferentemente	$5 \leq [\text{sustrato}] \leq 1500,$
aún más preferentemente	$25 \leq [\text{sustrato}] \leq 1000.$

10. Medio según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque el medio de cultivo que comprende se selecciona de entre el grupo constituido por:

- los medios selectivos de tipo: Mac Conkey, Columbia ANC, PALCAM, Sabouraud Gentamicina-cloranfenicol, preferentemente el medio Mac Conkey,
- los medios no selectivos de tipo Columbia +/- sangre, soja de Tripcasa, Gelosa nutritiva, Sabouraud, preferentemente el medio Columbia.

11. Medio según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque los microorganismos a detectar/identificar son parte de los microorganismos de interés médico o industrial, y especialmente los del género *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* o *Candida*.

12. Procedimiento de obtención del medio según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** porque consiste sustancialmente en:

- preparar al menos una disolución madre de sustrato de esterasas y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas, cromógeno o fluorógeno, en el disolvente S, y al menos un ESAG, AG o mezcla de ESAG/AG,
- añadir esta disolución y eventualmente otros aditivos al medio de cultivo, y
- homogeneizar el conjunto.

13. Procedimiento de detección/identificación de cepas con actividad esterasa y/o osidasa y/o peptidasa y/o sulfatasa y/o fosfatasa, **caracterizado** porque consiste en:

- inocular el medio según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o el medio obtenido mediante el procedimiento de la reivindicación 12, con las bacterias a analizar;
- incubar el medio inoculado en condiciones apropiadas; y

## ES 2 266 309 T3

- leer e interpretar las coloraciones alrededor de las colonias, coloraciones las cuales revelan la hidrólisis del sustrato por las bacterias.

5 14. Uso de éster(es) de sorbitán con ácido(s) graso(s), de ácido(s) graso(s) (AG) o de ESAG/AG, como agente estabilizador-emulsionante de medio (líquido o de gel) de detección/identificación de microorganismos, especialmente de bacterias o de levaduras, con actividad enzimática elegida entre las actividades esterases y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas, comprendiendo este medio especialmente un medio de cultivo y al menos un sustrato de esterases y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas, cromógeno o fluorógeno, excluyendo los sustratos que comprenden un carboxilato de 4-[2-(4-octanoiloxi-3,5-dimetoxifenil)-vinil]-quinolinio-1-(propan-3-il) y un  
10 anión, eventualmente en asociación con al menos un disolvente S del sustrato de esterases y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas, cromógeno o fluorógeno, presente en el medio; estando la concentración de [ESAG] en el medio definida según lo siguiente (% en peso):  $0,5 \leq [\text{ESAG}] \leq 5$ , preferentemente  $1,5 \leq [\text{ESAG}] \leq 3,5$ .

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65