

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 952 442**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/14 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/04 (2006.01)

C12Q 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2016 PCT/NZ2016/050027**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2016 WO16137341**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2016 E 16755973 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023 EP 3262183**

54 Título: **Identificación de bacterias y prueba de susceptibilidad antimicrobiana**

30 Prioridad:

27.02.2015 AU 2015900695

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

31.10.2023

73 Titular/es:

**MASTAPLEX LIMITED (100.0%)
87 St David Street North Dunedin
Dunedin 9013, NZ**

72 Inventor/es:

BORK, OLAF

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 952 442 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

Identificación de bacterias y prueba de susceptibilidad antimicrobiana

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a la susceptibilidad a los antibióticos y a kits respectivos para facilitar la identificación de un tratamiento adecuado para la mastitis.

10 **Antecedentes de la invención**

15 Ha habido avances significativos en el campo de la microbiología clínica y en el tratamiento y manejo de enfermedades infecciosas en las últimas décadas. Sin embargo, las infecciones microbianas sistémicas y localizadas, debilitantes y potencialmente mortales, siguen siendo un grave problema para la salud humana y animal. Además, la aparición de organismos multiresistentes ha incrementado los retos a los que se enfrentan las prácticas sanitarias humanas y veterinarias.

20 Las infecciones microbianas tratadas de forma inadecuada o incorrecta son responsables en gran medida del aumento de cepas de bacterias multiresistentes que provocan muchas infecciones de origen hospitalario y agrícola. La resistencia a los fármacos, específicamente la resistencia a los antibióticos, suele producirse cuando el antibiótico usado para tratar una infección o bien se selecciona de forma inadecuada, se prescribe de un modo que no erradica eficazmente el agente infeccioso o bien es el resultado de un cumplimiento deficiente por parte del paciente o de prácticas de cultivo deficientes. Además, cuando se prescriben antibióticos ineficaces o innecesarios, las bacterias infecciosas presentes siguen multiplicándose sin cesar, lo que a menudo provoca complicaciones potencialmente mortales que requieren tratamientos caros y agresivos, incluida la hospitalización innecesaria. Por tanto, el diagnóstico preciso y rápido de un posible agente infeccioso es fundamental para mejorar el cuidado del paciente, reducir los costos de atención sanitaria y la conservación de la eficacia antimicrobiana.

30 La infección de personas o animales puede estar causada, entre otros patógenos, por bacterias. Los agentes antimicrobianos, incluidos los antibióticos, se emplean en un intento de eliminar una población bacteriana o inhibir su crecimiento como medio para combatir la infección. Una breve lista de bacterias causantes de enfermedades y la primera y segunda elección de antimicrobianos contra bacterias comunes o importantes figuran, por ejemplo, en "Pharmacology", Rang & Dale 1987, Churchill Livingstone. Los agentes antimicrobianos típicos usados en medicina humana y veterinaria incluyen antibióticos. Por ejemplo, la bencilpenicilina (o penicilina G) es el fármaco de elección para las infecciones causadas por estreptococos, neumococos, meningococos, gonococos y estafilococos no productores de penicilinas. En el caso de estafilococos productores de betalactamasas, se recomienda el uso de cloxacilina, entre otros. Por otra parte, la bencilpenicilina suele ser casi ineficaz contra las bacterias Gram negativas como las bacterias coliformes como, por ejemplo, *Escherichia coli*. Los antibióticos de amplio espectro a menudo son activos contra bacterias coliformes. Los antibióticos de amplio espectro típicos son ampicilina, amoxicilina o cefalosporinas tales como cefotaxima o ceftiour.

45 Los antibióticos comúnmente usados pueden clasificarse en aminoglucósidos, carbapenems y monobactámicos, cefalosporinas, cloranfenicol, lincosamidas, macrólidos, pleuromutilinas, glucopéptidos, polipéptidos, penicilinas, polimixinas, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas, entre otros.

Otro tipo de agentes antimicrobianos incluyen, por ejemplo, nisina, plata o desinfectantes entre muchos otros.

50 Curiosamente, la mayoría de los antimicrobianos administrados en todo el mundo no se administran a pacientes humanos, sino más bien a animales, incluyendo ganado vacuno, ovejas, cerdos, pollos y peces, para fines de producción de alimentos. Los antibióticos se administran a estos animales para tratar la enfermedad en animales infectados, entre otras razones.

55 El uso de grandes cantidades de antimicrobianos en la producción de alimentos y la amplia liberación no intencionada de antimicrobianos en el entorno a través de aguas residuales animales y humanas y agua residual de sitios agrícolas tiene consecuencias para la salud pública, más claramente observado en las bacterias zoonóticas resistentes asociadas a enfermedades de transmisión alimentaria en humanos. Además, de importancia cualitativa y cuantitativa desconocida es el paso potencial de los genes de resistencia de bacterias de origen animal a patógenos humanos.

60 El tratamiento antimicrobiano oportuno de un paciente infectado puede marcar la diferencia entre el éxito de la terapia, la discapacidad a largo plazo o incluso la muerte. Desgraciadamente, el uso y mal uso de los antimicrobianos ha impulsado la expansión incesante de microbios resistentes, lo que ha provocado una pérdida de eficacia de los regímenes de tratamiento tradicionales. De hecho, la resistencia a los antibióticos y la evolución de bacterias multiresistentes o "superbacterias" han sido identificadas por la Organización Mundial de la Salud como una amenaza significativa para la supervivencia a largo plazo de la población humana.

65

Los tratamientos antimicrobianos suelen comenzar poco después de la detección de la infección o la enfermedad. La selección del tratamiento suele basarse en la primera o segunda elección de antimicrobianos recomendados por instituciones especializadas para una infección bacteriana específica en humanos y animales (por ejemplo, oído, garganta, ubre o útero, etc.).

5

Sería ventajoso si la identificación de infección o enfermedad infecciosa que provoca bacterias se produce antes del tratamiento de modo que se pueda seleccionar un antimicrobiano apropiado para el tratamiento para la administración. Sin embargo, conocer el tipo de bacterias no siempre es suficiente para seleccionar un tratamiento antimicrobiano apropiado. Por ejemplo, en el caso de los estafilococos, la bencilpenicilina es el fármaco de primera elección si se trata de estafilococos no productores de penicilinasa. Sin embargo, este tipo de información no se conoce habitualmente antes del tratamiento o necesariamente después de que se haya producido la prueba de enriquecimiento bacteriano selectiva y/o diferencial.

10

Idealmente, sería deseable realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana antes del tratamiento que no solo respalda la selección de un régimen de tratamiento antimicrobiano, sino que respalda la selección de una dosis adecuada. Sin embargo, existen varias limitaciones con este enfoque, ya que los ensayos deben realizarse en laboratorios establecidos con >tiempo de respuesta. Mientras tanto, la infección permanece sin tratar o se ha tratado con (por ejemplo) un agente antimicrobiano de amplio espectro en un intento de combatir la infección. No es de extrañar que esta práctica haya conducido al uso excesivo de antibióticos y, en consecuencia, al desarrollo de farmacoresistencia (por ejemplo, resistencia a los antibióticos) en muchas especies bacterianas.

15

20

Mastitis

La mastitis es una enfermedad inflamatoria de la glándula mamaria de un mamífero. En medicina veterinaria, la mastitis más importante y la mastitis más frecuentemente encontrada es la de los animales bovinos y, en particular, las vacas lecheras.

25

Los rebaños lecheros suelen criarse para la producción de leche. La convención de ordeñar hasta dos o tres veces durante un periodo de 24 horas predispone a las glándulas mamarias de las vacas a la infección. Además, la implicación de aparatos mecánicos en las prácticas de ordeño automatizado, que pasan de una vaca a otra, significa que la infección puede transmitirse fácilmente de un animal a otro.

30

La glándula mamaria dispone de una serie de mecanismos de defensa naturales contra los patógenos bacterianos. Sin embargo, estos mecanismos de defensa pueden ser superados por altos niveles de exposición bacteriana, por una mala cría de los animales o por cambios fisiológicos en determinados momentos del ciclo de lactación. Por ejemplo, el periodo entre el secado y el parto se asocia a una incidencia relativamente alta de mastitis.

35

La mastitis puede ser causada por muchas especies diferentes de bacterias Gram positivas y negativas. Esas especies bacterianas implicadas más comúnmente en la mastitis bovina se dividen en dos categorías. La primera categoría incluye patógenos del huésped, tales como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. Estas bacterias viven en la piel de la ubre o en la propia ubre y son una fuente de infección para otras vacas del rebaño. La segunda categoría incluye patógenos ambientales tales como *Streptococcus uberis* y *Escherichia coli*. Estos patógenos se encuentran en el entorno inmediato de la vaca láctea y, por lo tanto, presentan un riesgo constante de infección.

40

La mastitis causada por las bacterias caracterizadas anteriormente puede manifestarse como enfermedad clínica o subclínica.

45

La mastitis clínica es una respuesta inflamatoria a la infección que causa una leche visiblemente anómala (por ejemplo, color, coágulos de fibrina). A medida que aumenta la extensión de la inflamación, también pueden manifestarse cambios en la ubre (hinchazón, calor, dolor, enrojecimiento). Los casos clínicos que incluyen sólo signos locales se denominan leves o moderados. Si la respuesta inflamatoria incluye afectación sistémica (fiebre, anorexia, choque), el caso se denomina grave. Si la aparición es muy rápida, como suele ocurrir en los casos clínicos graves, se denomina caso agudo de mastitis grave. Las vacas más gravemente afectadas suelen tener más secreciones serosas en el cuarto afectado. Dicho esto, las presentaciones más leves de la mastitis clínica son las más típicas.

50

55

La mastitis subclínica es la presencia de una infección sin signos aparentes de inflamación local o afectación sistémica. Aunque pueden aparecer episodios transitorios de leche anómala o inflamación de la ubre, estas infecciones son en su mayor parte asintomáticas y, si la infección persiste durante al menos 2 meses, se denominan crónicas. Una vez establecidas, muchas de estas infecciones persisten durante lactancias enteras o durante toda la vida de la vaca. La mejor forma de detectarlo es examinando la leche en busca de células somáticas (SCC) (predominantemente neutrófilos).

60

La mastitis sigue siendo una de las principales causas de pérdidas económicas en la industria láctea a pesar de la disponibilidad de diversas opciones de tratamiento. En la actualidad, el principal método para tratar la mastitis en las vacas (inflamación de la ubre), así como para tratar la metritis (inflamación del útero), es la terapia con antibióticos.

65

Los organismos gubernamentales o las instituciones especializadas en enfermedades suelen recomendar agentes antimicrobianos de primera y segunda elección. La mastitis bovina puede estar causada por bacterias Gram positivas y negativas. Las bacterias más comunes e importantes son *Strep uberis*, *Staph aureus*, *Staph* negativo para coagulasa, *Strep agalactiae*, *Strep dysagalactiae* y E-Coli. La leche de mastitis cambia de consistencia en comparación con la leche de vacas sanas. La leche de mastitis puede tener coágulos y la textura puede ser acuosa y fina o espesa. El color de la leche de mastitis se puede describir como entre amarillo y parduzco.

Además, habitualmente la leche de mastitis tendrá un alto recuento de células somáticas que puede ser de hasta varios millones por mililitro que es diferente para la leche de vaca sana.

Existen varios kits de prueba de bacterias para la mastitis bovina en el mercado y pueden usarse para identificar el tipo de bacterias que causan infección en la granja. Por ejemplo, "The Overnighter" (documento WO 2007/032691) describe un dispositivo y receptáculo de crecimiento microbiológico. El medio de cultivo se basa en un medio de agar (tipo gel) y la identificación de las bacterias se muestra mediante un cambio colorimétrico. La identificación de bacterias se produce dentro de las 24 a 48 h.

Los documentos WO 1999/18439 y WO 2011/139263 describen pruebas de recuento aeróbico y de E. coli/coliformes a base de película rápida. La película de recuento rápido aerobio detecta todas las bacterias aerobias presentes en una muestra de leche, mientras que la película de E. coli/coliformes sólo admite el crecimiento de bacterias Gram negativas. Una vez que se ha determinado si la infección de mastitis está causada por bacterias Gram positivas o Gram negativas, se podría tomar una decisión de tratamiento para resolver la infección."

CHECK-UP Mastitis Diagnostic Tool, On Farm Mastitis Testing, Farm Medix, <http://www.farmmedix.com/> es una placa de agar que comprende cuatro zonas para identificar *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococci* SPP y E. Coli. El tiempo de detección es de 15 a 24 h.

Sin embargo, ninguna de estas pruebas ofrece pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

La mastitis bovina es sólo un ejemplo típico de infección. La mastitis también puede afectar a los seres humanos o a otros animales productores de leche. La metritis es otra infección típica entre muchas otras infecciones bacterianas. El tratamiento de estas infecciones bacterianas a menudo se ve afectado por el desconocimiento del tipo de bacteria o la susceptibilidad a los antimicrobianos, lo que puede llevar a la selección de un antimicrobiano inadecuado para tratar la infección y, como consecuencia, a otro tratamiento antimicrobiano. El documento CN1858235 describe la prueba de susceptibilidad antimicrobiana utilizando una baja concentración de rojo de fenol como indicador de crecimiento.

El solicitante ha desarrollado ahora nuevos enfoques para la identificación de bacterias, en particular con respecto a las bacterias que se sabe que causan infecciones como la mastitis y la metritis. Además, el solicitante ha desarrollado sorprendentemente nuevos enfoques para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana basadas en la colorimetría que pueden realizarse directamente en muestras biológicas obtenidas de animales humanos y no humanos. Este enfoque proporciona información "en tiempo real" con respecto a la susceptibilidad de (por ejemplo) las bacterias a los agentes antimicrobianos con el fin de informar sobre las opciones de tratamiento. Estas características y otras ventajas se pondrán de manifiesto en la descripción que sigue.

Resumen de la invención

En un aspecto de la presente invención se proporciona un método para realizar una prueba de susceptibilidad antimicrobiana en una muestra biológica obtenida de un ser humano o animal no humano, donde el ser humano o animal no humano puede estar infectado por, o en riesgo de infección por, una o más bacterias causantes de infección, el método comprende,

(i) proporcionar una mezcla de reacción que comprenda una muestra biológica obtenida de un ser humano o animal no humano y medios de susceptibilidad que comprendan medios para el crecimiento, un agente antimicrobiano, rojo de fenol y un agente estabilizador; y

(ii) determinar la susceptibilidad de una o más bacterias de la muestra al agente antimicrobiano observando un cambio de color cuando se añade la muestra al medio de susceptibilidad,

en donde el rojo de fenol está presente en la mezcla de reacción entre el 0,0035 % y el 0,30 % que es en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento de una o más bacterias causantes de infección si no fuera por la presencia del agente estabilizador,

- y en donde el agente estabilizador comprende una proteína derivada de la leche o un extracto de proteína derivada de la leche para bacterias Gram positivas, y

- el agente estabilizador comprende un hidrato de carbono para bacterias Gram negativas.

En otro aspecto más de la presente invención se proporciona un kit de prueba para realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en bacterias Gram positivas que causan infección en un ser humano o un animal no humano, el kit de prueba que comprende reactivos para realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en una muestra de prueba de un ser humano o un animal no humano utilizada en el método de la invención detallado anteriormente con instrucciones de uso, en donde los reactivos comprenden un medio de crecimiento, un agente antimicrobiano, rojo de fenol y un agente estabilizador que comprende una proteína derivada de la leche o un extracto de proteína derivada de la leche, y en donde el rojo de fenol está presente en la mezcla de reacción del kit de prueba entre el 0,0035 % y el 0,30 %. En otro aspecto de la presente invención se proporciona un kit de prueba para realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en bacterias Gram negativas que causan infección en un ser humano o un animal no humano, el kit de prueba que comprende reactivos para realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en una muestra de prueba de un ser humano o un animal no humano utilizada en el método de la invención detallado anteriormente, junto con instrucciones de uso, en donde los reactivos comprenden un medio de crecimiento, un agente antimicrobiano, rojo de fenol y un agente estabilizador que comprende un hidrato de carbono, y en donde el rojo de fenol está presente en la mezcla de reacción del kit de prueba entre el 0,0035 % y el 0,30 %.

Breve descripción de las figuras

Figura 1 muestra la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* expuesto a niveles variables de kanamicina en función del tiempo. Control (cuadrado cerrado), 0,5 ug/ml de kanamicina (círculo), 1,0 ug/ml de kanamicina (símbolo más), 2,0 ug/ml de kanamicina (cuadrado abierto), 4,0 ug/ml de kanamicina (cruz) y 8 ug/ml de kanamicina (triángulo).

Figura 2 muestra la identificación/diferenciación de bacterias entre *Staphylococcus aureus* y estafilococos negativos para coagulasa.

Figura 3 muestra la identificación visual de *Staphylococcus aureus* mediante la aparición de sedimento negro.

Definiciones generales

A menos que se defina específicamente lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tendrán el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica (por ejemplo, en microbiología, inmunología, inmunohistoquímica, química de proteínas y bioquímica).

Se pretende que la referencia a un intervalo de números descritos en el presente documento (por ejemplo, de 1 a 10) también incorpore referencia a todos los números relacionados dentro de ese intervalo (por ejemplo, 1, 1,1, 2, 3, 3,9, 4, 5, 6, 6,5, 7, 8, 9 y 10) y también cualquier intervalo de números racionales dentro de ese intervalo (por ejemplo, de 2 a 8, de 1,5 a 5,5 y de 3,1 a 4,7) y, por lo tanto, se describen expresamente todos los subintervalos de todos los intervalos descritos expresamente en el presente documento. Estos son solamente ejemplos de lo que se pretende específicamente y todas las combinaciones posibles de valores numéricos entre el valor más bajo y el valor más alto enumerado deben considerarse expresamente indicados en esta solicitud de una manera similar.

El término “y/o”, por ejemplo, “X y/o Y” se entenderá que significa o bien “X y Y” o bien “X o Y” y se tomará para proporcionar apoyo explícito para ambos significados o cualquier significado.

En toda esta memoria descriptiva, la palabra “comprenden”, o variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, se entenderá que implican la inclusión de un elemento, número entero o etapa establecido, o grupo de elementos, número enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, número enteros o etapas.

En toda esta memoria descriptiva, a menos que se establezca específicamente lo contrario o el contexto requiera lo contrario, la referencia a una única etapa, composición de materia, grupo de etapas o grupo de composiciones de materia abarcará una y una pluralidad (es decir una o más) de esas etapas, composiciones de materia, grupos de etapas o grupo de composiciones de materia.

Definiciones seleccionadas

El término “microorganismo” se utilizará en el presente documento para describir cualquier microorganismo eucariota o procariota, incluyendo, por ejemplo, bacterias, levaduras, hongos, virus y similares.

El término “infección” se utilizará en el presente documento para describir la invasión y multiplicación de microorganismos patógenos en una parte del cuerpo o tejido, que puede producir lesiones tisulares posteriores y progresar a enfermedad manifiesta a través de diversos mecanismos celulares o tóxicos.

El término “estreptococo” se utilizará en el presente documento para referirse a un estreptococo o a una población de estreptococos.

El término “estreptococos del grupo D” se utilizará en el presente documento para referirse a un estreptococo del grupo D o a una población de estreptococos del grupo D. Los ejemplos de estreptococos del grupo D incluyen, pero no se limitan a, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis* y *Streptococcus equinus*.

5 El término “estafilococos negativos para coagulasa” o “estafilococos negativos para coagulasa” se utilizará en el presente documento para describir aquellos estafilococos que no tienen la enzima proteica coagulasa que permite la conversión de fibrinógeno en fibrina. Los ejemplos de estafilococos negativos para coagulasa incluyen, pero no se limitan a, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus hemolyticus*, *Staphylococcus arlettae*, *Staphylococcus aureus*,
10 *Staphylococcus gallinarum*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus warneri/pasteuri*, *Staphylococcus aureus* (algunas cepas son coagulasa negativas).

15 El término “estafilococos positivos para coagulasa” o “estafilococos positivos para coagulasa” se utilizará en el presente documento para describir aquellos estafilococos que tienen la enzima proteica coagulasa que permite la conversión de fibrinógeno en fibrina. Los ejemplos de estafilococos positivos para coagulasa incluyen, pero no se limitan a, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus lutrae*, *Staphylococcus pseudintermedius* y *Staphylococcus schleiferi* subsp.

20 El término “bacterias coliformes” se utilizará en el presente documento para describir bacterias Gram negativas con forma de bastón que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas.

25 El término “indicador” o “composición indicadora” se utilizará en el presente documento para describir compuestos o moléculas específicos que incluyen, pero no se limitan a, uno o más de rojo de fenol, púrpura de bromocresol, azul de bromotimol, verde de bromocresol, rojo de metilo, púrpura de metilo, azolitmina, rojo neutro, naftolftaleína, rojo de cresol, cresolftaleína, fenolftaleína, 2,4- dimitrofenol, sal disódica de eritrosina, benzopurpurina 4B, N,N-dimethyl-p-(m-tolilazo)amilina, p-dimetilaminoazobenceno, 4,4'-ácido bis(2-amino-1-naftilazo)-2,2'-estilbendisulfónico, sal potásica de éster etílico de tetrabromofenolftaleína, azul de bromfenol, rojo de congo, naranja de metilo, naranja de etilo, ácido 4-(4-dimetilamino-1-naftilazo)-3-metoxibencenosulfónico, resazurina, 4-fenilazo-1-naftilanina, rojo de etilo 2-(p-dimetilaminofenilazo) piridina, monohidrocloreto de 4-(p-etoxifenilazo)-m-fenilenodiamina, azul de resorcina, rojo de alizarina S, rojo de propilo, rojo de clorofenol, p-nitrofenol, sal disódica del ácido 2-(2,4-dinitrofenilazo) 1-naftol-3,6-disulfónico de alizarina, 6,8-dinitro-2,4-(1H)quinazolinadiona, amarillo brillante, m-nitrofenol, cúrcuma (curcumina), púrpura metracresol, 4,4'-ácido bis(4-amino-1-naftilazo)-2,2'-stilbendisulfónico, azul de timol, p-naftolbenceno, fenolftaleína, o-cresolftaleína, bis(2,4-dimetilfenil) etanoato de etilo. Para evitar dudas, el término indicador incluye
35 indicadores de pH.

40 El término “sujeto” se utilizará en el presente documento para describir mamíferos humanos y no humanos. Los ejemplos de animales no humanos incluyen, pero no se limitan a, vacas, ovejas, ciervos, caballos, cerdos, pollos, peces, perros, gatos, ratones, ratas, primates (incluidos gorilas, monos rhesus y chimpancés), zarigüeyas y otros animales domésticos de granja o de zoológico. Así, los ensayos, métodos y kits aquí descritos tienen aplicación tanto en animales humanos como no humanos, en particular, y sin limitación, en humanos, primates, animales de granja incluyendo ganado vacuno, ovejas, cabras, cerdos, ciervos, alpacas, llamas, búfalos, animales de compañía y/o de raza pura incluyendo gatos, perros y caballos. Además, aunque el sujeto es preferiblemente un organismo vivo, la invención descrita en el presente documento puede utilizarse también en análisis post mortem.

45 El término “muestra” o “muestra biológica” se utilizará en el presente documento para referirse a cualquier muestra tomada o derivada de un sujeto. Dicha muestra puede obtenerse de un sujeto, o puede obtenerse de materiales biológicos destinados a proporcionarse al sujeto. Por ejemplo, una muestra puede obtenerse de la sangre o de la leche evaluada, que puede proceder de un ser humano o animal no humano. Se incluyen las muestras tomadas o derivadas de cualquier sujeto, como sujetos sanos normales y/o sujetos sanos para los que sea útil conocer el nivel de microorganismo(s) infeccioso(s). Las muestras preferidas son las de fluidos corporales. El término “muestra de fluido corporal”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una muestra de fluido corporal obtenida con fines de, por ejemplo, diagnóstico, pronóstico, clasificación o evaluación de un sujeto de interés. En determinadas realizaciones, tal muestra puede obtenerse con el fin de determinar la gravedad de la infección. La muestra puede ser cualquier muestra conocida en la técnica en la que pueden detectarse uno o más microorganismos. Se incluye cualquier fluido corporal como una muestra de sangre completa, plasma, suero, leche, muestra de fluido folicular ovárico, muestra de fluido seminal, fluido cerebroespinal, muestra de fluido del útero, saliva, esputo, orina, efusiones pleurales, fluido intersticial, fluido sinovial, linfa, lágrimas, por ejemplo, aunque la muestra de sangre entera, plasma, suero y leche son particularmente adecuados para su uso en esta invención. Además, un experto en la técnica se daría cuenta de que determinadas muestras de fluidos corporales se analizarían más fácilmente tras un procedimiento de fraccionamiento o purificación, por ejemplo, la separación de la sangre total en componentes de suero o plasma.
60

65 El término “tira reactiva” se utilizará en el presente documento para referirse a cualquier configuración de placas de ensayo, pocillos, viales o recipientes en los que puedan realizarse los ensayos y métodos de la presente invención. Por ejemplo, la identificación de bacterias y/o las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se realizan simultáneamente, por separado o secuencialmente, como se describe en el presente documento.

El término “prueba de susceptibilidad cualitativa” se utilizará en el presente documento para describir los aparatos y métodos que producen resultados de pruebas que generalmente indican si un microorganismo o espécimen celular es sensible o resistente a un producto antimicrobiano particular. Según el método de que se trate, sólo se suelen utilizar una o dos concentraciones de producto antimicrobiano. En las pruebas cualitativas de susceptibilidad no se informa del grado de sensibilidad o resistencia.

El término “prueba de susceptibilidad cuantitativa” se utilizará en el presente documento para describir los aparatos y métodos de prueba que producen resultados que proporcionan datos sobre la concentración del producto antimicrobiano que será suficiente para inhibir el crecimiento del microorganismo. Normalmente, para las muestras de microorganismos, se utilizan múltiples diluciones diferentes del producto antimicrobiano que cubren la gama terapéutica de concentraciones del producto antimicrobiano. El término concentración inhibitoria mínima (CIM) se utiliza a menudo para referirse al resultado proporcionado por la prueba de susceptibilidad cuantitativa del microorganismo y se define como la concentración mínima del producto antimicrobiano que producirá la inhibición del crecimiento del microorganismo.

El término “agente antimicrobiano” se utilizará aquí para describir un agente que mata o inhibe el crecimiento de un microorganismo, incluyendo por ejemplo bacterias, levaduras, hongos, virus, parásitos, etc. Se dice que un agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo o población de microorganismos es microbiostático (por ejemplo, bacteriostático en el caso de un agente antibacteriano que inhibe el crecimiento de bacterias). Del mismo modo, un agente antimicrobiano que mata un microorganismo o una población de microorganismos se dice que es microbicida (por ejemplo, bactericida en el caso de un agente antibacteriano que destruye bacterias). Se enumeran a continuación ejemplos de agente antimicrobianos adecuados.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “tratar” y “tratamiento” se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a pruebas de susceptibilidad a los antibióticos y kits respectivos para determinar a qué antibiótico(s) son susceptibles las bacterias causantes de infecciones y cepas específicas de las mismas.

1. Identificación de bacterias

Sería ventajoso que la identificación de la infección o de la bacteria causante de la enfermedad infecciosa guiara las decisiones de tratamiento, de modo que se pudiera seleccionar un antimicrobiano apropiado para la terapia. Es decir, la identificación de bacterias causantes de infecciones o enfermedades infecciosas en una muestra biológica obtenida de un ser humano o animal no humano puede utilizarse para informar sobre las opciones de tratamiento para terapias de seguimiento. La identificación de bacterias causantes de infecciones o enfermedades infecciosas también puede utilizarse para mapear la prevalencia de bacterias asociadas a brotes de enfermedades infecciosas y/o dentro de parámetros geográficos definidos. Además, la información relativa a la identificación de bacterias causantes de infecciones o enfermedades infecciosas asociadas a determinados estados patológicos como, por ejemplo, la mastitis y la metritis, puede utilizarse para crear una base de datos de información útil para supervisar los cambios históricos y estacionales y los brotes geográficos asociados a determinadas enfermedades infecciosas.

El solicitante ha descubierto nuevos enfoques para la identificación de bacterias en muestras biológicas que incluyen, pero no se limitan a, la identificación de estreptococos y estafilococos (no parte de la invención).

que comprenden (por ejemplo) *Streptococcus uberis*, pueden identificarse en una muestra biológica obtenida de un ser humano o animal no humano mediante enriquecimiento en medios de identificación que comprenden esculina, citrato férrico y un agente estabilizador. Los estreptococos del grupo D, incluyendo *Streptococcus uberis*, por ejemplo, hidrolizan esculina a esculina y dextrosa. La esculina reacciona con el citrato férrico produciendo un ennegrecimiento del medio de cultivo, proporcionando así un cambio detectable exclusivo de los estreptococos del grupo D. La presencia de un agente estabilizador, tal como (por ejemplo) la leche, se utiliza para suprimir la actividad inhibitoria de la esculina y el citrato férrico sobre el crecimiento bacteriano (véanse (por ejemplo) las tablas 2a-2e del ejemplo 2, donde se demuestra el efecto inhibitorio de estos analitos utilizando medios de enriquecimiento convencionales). Esto significa que se pueden usar concentraciones aumentadas de citrato de esculina y férrico en los métodos para mejorar la identificación de estreptococos del Grupo D. Esto es especialmente importante para su uso en muestras clínicas en las que existe un color de fondo asociado a microorganismos causantes de infecciones. Este punto se analiza con más detalle a continuación.

Para mayor claridad, el término “enriquecimiento” se refiere a cualquier técnica conocida que aumente el número de bacterias en la muestra con fines de detección e identificación. Esto incluye no sólo enriquecimiento, sino también cultivo, así como técnicas de selección de crecimiento positivo o negativo.

En consecuencia, en un aspecto de la presente descripción (no parte de la invención) se proporciona un método para identificar estreptococos del grupo D en un ser humano o animal no humano, en donde el ser humano o animal no humano puede estar infectado por, o en riesgo de infección por, estreptococos del grupo D, comprendiendo el método:

- 5 (i) proporcionar una mezcla de reacción que comprenda una muestra biológica obtenida de un ser humano o animal no humano y un medio de identificación que comprenda esculina, citrato férrico y un agente estabilizador; y
- (ii) identificar si los estreptococos del Grupo D están presentes en la muestra,

10 en donde la esculina y el citrato férrico están presentes en la mezcla de reacción en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento de los estreptococos del grupo D si no fuera por la presencia del agente estabilizador

y en donde, la identificación de estreptococos del grupo D en la muestra se confirma mediante el ennegrecimiento de la mezcla de reacción,

15 donde la identificación de estreptococos del grupo D en la muestra indica que el ser humano o animal no humano está infectado por, o en riesgo de infección por, los estreptococos del grupo D.

20 En un ejemplo, el agente estabilizante comprende una proteína derivada de la leche o un extracto de proteína derivada de la leche. Los ejemplos de proteínas derivadas de leche o extractos de proteínas derivados de la leche incluyen, pero no se limitan a, α -caseína, β -caseína (incluyendo una o más de las variantes A1, A2, A3, B, C, D, E y F), caseína de sodio (por ejemplo, que comprende α -caseína, β -caseína y κ -caseína), κ -caseína, β -lactoglobulina, proteína de suero de leche, lactoalbúmina, lactoferrina y leche o leche en polvo, así como combinaciones de los mismos.

25 Las proteínas y extractos lácteos pueden derivarse de cualquier fuente genética que incluye, pero no se limita a, los descritos en:

http://ansci.illinois.edu/static/ansc438/Milkcompsynth/milkcomp_table.html

30 La caseína sódica puede obtenerse de Sigma Chemicals (n.º de cat. C8654).

En un ejemplo, los estreptococos del grupo D se seleccionan del grupo que consiste en *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovine* y *Streptococcus equinis*.

35 En aún otro ejemplo según la descripción (no parte de la invención), el medio de identificación comprende además componentes seleccionados de uno o más del grupo que consiste en medios de enriquecimiento, crecimiento y selección. Los términos “enriquecimiento”, “crecimiento” y “selección” serían bien conocidos por un experto en la técnica. Además, los ejemplos de los medios de enriquecimiento, de crecimiento y de selección adecuados para su uso en los métodos también serían conocidos por un experto en la técnica pertinente. Además, los ejemplos no limitativos de medios de enriquecimiento, crecimiento y selección se describen en los ejemplos que siguen.

40 En otro ejemplo, la etapa de combinar la muestra con el medio de identificación comprende además enriquecer las bacterias durante un periodo de tiempo suficiente para identificar si una o más bacterias están presentes en la muestra.

45 En otro ejemplo más, la etapa de enriquecer las bacterias comprende cultivar a entre 25 °C y 45 °C durante entre 6 y 48 h. Para evitar dudas y a modo de ilustración solamente, el cultivo a entre 25 y 45 °C incluye el cultivo a 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45 °C. De manera similar, para evitar dudas y solo a modo de ilustración, el cultivo durante entre 6 y 48 h incluye cultivar 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 o 48 h.

50 Los medios de identificación pueden comprender cualquier medio de enriquecimiento, crecimiento y/o selección suficiente para enriquecer las bacterias presentes en la muestra con fines de identificación. Como mínimo, los medios de identificación deben permitir el crecimiento y la selección de bacterias con el fin de identificar las bacterias de interés. Los ejemplos de medios de enriquecimiento suficientes para soportar el crecimiento del crecimiento de bacterias se enumeran en el ejemplo 1. Sin embargo, a título ilustrativo, algunos ejemplos no limitativos son el caldo de soja Tryptic, el caldo Mueller Hinton, el caldo MacConkey, el caldo de sal de manitol, el caldo de esculina azida, el caldo Giolitti Cantoni, en función de las bacterias que se desee enriquecer. El experto en la técnica entenderá que la presente descripción no se limita a medios de enriquecimiento líquidos y a técnicas de cultivo asociadas, y si es necesario o deseable, se pueden usar otros medios y técnicas de cultivo. Por ejemplo, el cultivo de muestras en un gel de agar que contenga los medios de enriquecimiento, crecimiento y/o selección deseados.

55 En un ejemplo, los medios de identificación para identificar estreptococos del Grupo D comprenden caldo de soja triptico.

60 Además del medio de identificación que soporta el crecimiento de bacterias, el medio de identificación comprende además al menos un medio de selección para facilitar la identificación de las bacterias de interés. Para la selección

de estreptococos del grupo D, los medios de selección comprenden esculina, citrato férrico y un agente estabilizante. La esculina y el citrato férrico están presentes en los medios de selección en cantidades que normalmente inhibirían el crecimiento de las bacterias, si no fuera por la presencia del agente estabilizador que favorece el crecimiento.

5 La esculina combinada con citrato férrico se utiliza como medio selectivo para la identificación de Streptococcus del grupo D. La esculina y el citrato férrico suelen utilizarse en bajas concentraciones, ya que el aumento de las concentraciones del compuesto podría inhibir el crecimiento de las bacterias en la muestra. Remítase al ejemplo 1 y a la tabla 5, ejemplo 3. Normalmente, se mezclan hasta 100 ul de muestras con 10 ml de caldo de esculina o se extienden sobre un agar esculina. Esta es una razón en volumen de aproximadamente 1:100. Esta razón o razones en volumen similares tienen la ventaja de hacer visible la reacción positiva (ennegrecimiento del medio de cultivo) y son viables en un laboratorio especializado. Para proporcionar a un lego en la técnica un método factible las razones en volumen entre 1:10 y 10:1 son más aplicables. El ejemplo 3, tabla 6 muestra que la concentración de esculina utilizada típicamente de 0,1 % y la concentración de citrato férrico de 0,05 % conducen a una detección colorimétrica débil de Streptococcus uberis en la leche. El problema se asocia con el color de fondo de la muestra clínica. Sorprendentemente, el solicitante descubrió que las concentraciones más elevadas de esculina y citrato férrico no inhiben el crecimiento de los estreptococos del grupo D en presencia de un agente estabilizador (por ejemplo) proteína derivada de la leche o extracto proteico derivado de la leche, y la presencia de estreptococos del grupo D en la muestra de ensayo puede identificarse convenientemente a simple vista (reacción positiva = formación de un ennegrecimiento del medio de cultivo).

20 En consecuencia, en un ejemplo, los medios de identificación comprenden además entre 0,1 % y 2,0 % de esculina, y en particular 0,50 % de esculina. Entre 0,1 y 2,0 % de esculina incluye, pero no se limita a, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 y 2,0 % de esculina, y comprende todos los valores intermedios, incluyendo (por ejemplo) 0,25 % de esculina.

25 En un ejemplo relacionado, el medio de identificación comprende entre 0,05 % y 1,0 % de citrato férrico, y en particular 0,25 % de citrato férrico. Entre 0,05 y 1,0 % de citrato férrico incluye, pero no se limita a, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 y 1,0 % de citrato férrico, y comprende todos los valores intermedios, incluyendo (por ejemplo) 0,125 % de citrato férrico. El experto en la técnica sabrá que el citrato férrico puede existir en diversas formas, incluyendo, pero sin limitarse a, citrato férrico amonio, así como otras formas libres o de sal.

30 En otro ejemplo relacionado, el medio de identificación comprende 0,50 % de esculina y 0,25 % de citrato férrico, y el paso de combinar la muestra biológica con el medio de identificación comprende el cultivo de las bacterias durante un periodo de 16 a 24 h a 37 °C.

35 la muestra biológica puede seleccionarse del grupo que consiste en leche, muestra de líquido del útero, muestra de sangre entera, plasma, suero, muestra de líquido folicular ovárico, muestra de líquido seminal, líquido cefalorraquídeo, saliva, esputo, orina, efusiones pleurales, líquido intersticial, líquido sinovial, linfa y lágrimas.

40 Además, cuando la muestra biológica es leche (por ejemplo, de un ser humano o animal no humano, como un animal bovino) no hay necesidad de un agente estabilizador en la mezcla de reacción.

45 En consecuencia, en otro aspecto de la presente descripción (no parte de la invención) se proporciona un método para identificar estreptococos del grupo D en un ser humano o animal no humano, en donde el ser humano o animal no humano puede estar infectado por, o en riesgo de infección por, estreptococos del grupo D, comprendiendo el método:

50 (i) proporcionar una mezcla de reacción que comprenda una muestra biológica que contenga leche obtenida de un ser humano o animal no humano y un medio de identificación que comprenda esculina y citrato férrico; y

(ii) identificar si los estreptococos del Grupo D están presentes en la muestra,

55 en donde la esculina y el citrato férrico están presentes en la mezcla de reacción en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento de los estreptococos del grupo D si no fuera por la presencia del agente estabilizador en la muestra de leche,

y en donde, la identificación de estreptococos del grupo D en la muestra se confirma mediante el ennegrecimiento de la mezcla de reacción,

60 donde la identificación de estreptococos del grupo D en la muestra indica que el ser humano o animal no humano está infectado por, o en riesgo de infección por, los estreptococos del grupo D.

65 Dado que los estreptococos son bacterias Gram positivas, los medios de identificación pueden comprender además uno o más agentes antimicrobianos Gram negativos, por ejemplo un antibiótico contra bacterias Gram negativas. Es importante señalar que la presencia de un agente antimicrobiano contra las bacterias Gram negativas no afectará al

enriquecimiento de estreptococos Gram positivos. La inclusión de un antimicrobiano contra bacterias gramnegativas facilitará el enriquecimiento de estreptococos del grupo D para su identificación.

5 Por consiguiente, en otro ejemplo relacionado, el medio de identificación para la identificación de estreptococos del grupo D comprende además un agente antimicrobiano contra bacterias Gram negativas.

Algunos ejemplos de antibióticos Gram negativos son los monobactámicos, entre los que se incluye el aztreonam.

10 A menudo se desea la identificación específica y/o la diferenciación entre estafilococos positivos para coagulasa y estafilococos negativos para coagulasa. Conociendo el tipo de estafilococos que causan infección puede influir en las decisiones de tratamiento.

15 En el presente documento se describe un enfoque para identificar y diferenciar los estafilococos entre positivos para coagulasa y negativos para coagulasa.

20 En primer lugar, los estafilococos positivos para coagulasa (por ejemplo *Staphylococcus aureus*) pueden identificarse en una muestra biológica obtenida de un ser humano o animal no humano mediante enriquecimiento en medios de identificación que comprenden telurita. La telurita inhibe selectivamente el crecimiento de las bacterias negativos para coagulasa.

25 En segundo lugar, si no se detecta enriquecimiento para estafilococos coagulasa positivos, puede lograrse la identificación paralela de bacterias coagulasa negativas a partir de la misma muestra biológica enriqueciendo en medios de identificación que comprendan altos niveles de sal (por ejemplo, cloruro sódico), una fuente selectiva de hidratos de carbono y un indicador de pH. La alta concentración de sal solo soportará el crecimiento de estafilococos positivos para coagulasa y negativos para coagulasa. La ausencia de un sedimento negro en los medios de enriquecimiento con telurita y el crecimiento de las bacterias en los medios de identificación que comprenden un alto contenido en sal combinado con una fuente deseada de hidratos de carbono permite la identificación indirecta de los estafilococos coagulasa negativos, interrogados a través de un cambio en el pH. Es decir, en presencia de una fuente de hidratos de carbono deseada, las bacterias negativas para coagulasa convertirán los hidratos de carbono en productos de acidificación que darán lugar a un cambio de pH que puede medirse. Esto se muestra en la figura 2.

30 En consecuencia, en un aspecto adicional de la presente descripción (no parte de la invención), se proporciona un método para identificar estafilococos positivos para coagulasa en un ser humano o animal no humano, en donde el animal humano o no humano puede estar infectado por, o en riesgo de infección por, estafilococos positivos para coagulasa, comprendiendo el método:

35 (i) proporcionar una mezcla de reacción que comprenda una muestra biológica obtenida de un ser humano o animal no humano y un medio de identificación que comprenda telurita y un agente estabilizador; y

40 (ii) identificar si los estreptococos positivos para coagulasa están presentes en la muestra,

en donde, la telurita está presente en la mezcla de reacción en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento de los estafilococos positivos para coagulasa si no fuera por la presencia del agente estabilizador

45 y en donde la identificación de estafilococos positivos para coagulasa en la muestra se confirma mediante la aparición de un sedimento de color negro en la mezcla de reacción,

50 donde la identificación de estafilococos positivos para coagulasa en la muestra indica que el ser humano o animal no humano está infectado por, o en riesgo de infección por estafilococos positivos para coagulasa.

En un ejemplo, los estafilococos positivos para coagulasa son *Staphylococcus aureus*.

55 En otro ejemplo, el medio de identificación comprende entre 0,5 % y 30 % de una solución de telurita al 1 %, y en particular entre 10 % y 22 % de una solución de telurita al 1 %. En un ejemplo relacionado, la telurita es telurita potásica.

60 En un ejemplo relacionado, los medios de identificación comprenden 10 % de una solución de telurito de potasio al 1 % y el paso de proporcionar una mezcla de reacción que comprenda la muestra biológica y los medios de identificación comprende el cultivo de las bacterias durante un periodo de entre 7 y 48 h a 25 a 45 °C.

En el evento de que el método fracase, identificar estafilococos positivos para coagulasa en una muestra biológica obtenida del ser humano o animal no humano, la muestra puede ser interrogada adicionalmente para determinar indirectamente la presencia de estafilococos negativos para coagulasa.

65 En consecuencia, en un aspecto adicional de la presente descripción (no parte de la invención), se proporciona un método para identificar estafilococos negativos para coagulasa en un ser humano o un animal no humano, en donde

el animal humano o no humano está infectado por, o está en riesgo de infección por, estafilococos negativos para coagulasa, comprendiendo el método;

5 (ii) establecer que los estafilococos positivos para coagulasa no están presentes en la muestra de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento;

10 (ii) proporcionar una mezcla de reacción que comprenda una muestra biológica obtenida del mismo ser humano o animal no humano con un medio de identificación que comprenda una alta concentración de sal, una fuente de hidratos de carbono y un indicador de pH basado en color; y

(iii) identificar si los estreptococos negativos para coagulasa están presentes en la muestra,

15 y en donde, el indicador de pH en la mezcla de reacción está presente en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento de los estafilococos negativos para coagulasa si no para la presencia del agente estabilizante,

y en donde, la fuente de hidratos de carbono en la mezcla de reacción se selecciona de uno o más del grupo que consiste en fructosa, maltosa, sacarosa, glicerol, galactosa, manosa y lactosa,

20 y en donde la identificación de estafilococos negativos para coagulasa se confirma por un cambio de color en la mezcla de reacción causada por un cambio en el pH,

donde la identificación de estafilococos negativos para coagulasa en la muestra indica que el ser humano o animal no humano está infectado por, o en riesgo de infección por estafilococos negativos para coagulasa.

25 En un ejemplo, la alta concentración de sal comprende $\geq 7,5$ % (p/v) de cloruro de sodio. Alternativamente, la alta concentración de sal comprende $\geq 7,5$ % (p/v) de cloruro de potasio u otras sales como se conoce por un experto en la técnica pertinente.

30 La fuente de hidratos de carbono se selecciona del grupo que consiste en fructosa, maltosa, sacarosa, glicerol, galactosa, manosa y, lactosa. Es importante destacar que la fuente de hidratos de carbono no incluye manitol, trehalosa, ramnosa, xilosa o arabinosa.

35 En un ejemplo relacionado adicional, el indicador de pH se selecciona del grupo que consiste en rojo de fenol, púrpura de bromocresol y azul de bromotimol. En otro ejemplo adicional, el indicador de pH es rojo de fenol y la acidificación del medio que resulta del crecimiento de bacterias provoca un cambio de color de rojo a amarillo.

40 En otro ejemplo más, el estafilococo negativo para coagulasa se selecciona del grupo que consiste en *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hemolyticus*, *Staphylococcus arlettae*, *Staphylococcus gallinarum*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus warneri/pasteuri*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococci schleiferi* y *Staphylococci caprae*. En un ejemplo, los estafilococos negativos para coagulasa se seleccionan del grupo *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococci schleiferi* y *Staphylococci caprae*.

45 En un ejemplo, el agente estabilizante comprende una proteína derivada de la leche o un extracto de proteína derivada de la leche. Los ejemplos de proteínas derivadas de leche o extractos de proteínas derivados de la leche incluyen, pero no se limitan a, α -caseína, β -caseína (incluyendo una o más de las variantes A1, A2, A3, B, C, D, E y F), caseína de sodio (por ejemplo, que comprende α -caseína, β -caseína y κ -caseína), κ -caseína, β -lactoglobulina, proteína de suero de leche, lactoalbúmina, lactoferrina y leche o leche en polvo, así como combinaciones de los mismos.

50 En ejemplos adicionales, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en leche, orina, suero, plasma, esputo y heces.

55 Es importante destacar que los métodos son particularmente útiles, por ejemplo, en la identificación de bacterias que causan mastitis o metritis en seres humanos y animales no humanos. En particular, los métodos son útiles en la identificación de bacterias que causan mastitis en animales bovinos. Por ejemplo, en vacas lecheras.

60 En consecuencia, en otro aspecto más de la presente descripción (no parte de la invención), se proporciona un método para identificar una o más bacterias que provocan mastitis en un ser humano o animal no humano, comprendiendo el método:

(i) proporcionar una mezcla de reacción que comprende una muestra de leche obtenida de un medio de identificación e identificación de animales humanos o no humanos; y

65 (ii) identificar si una o más bacterias que causan mastitis están presentes en la muestra de leche según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, siendo la modificación que la mezcla de reacción no requiere un agente estabilizador.

En un ejemplo relacionado, el método de acuerdo con este aspecto comprende además identificar otras mastitis provocando la aparición de bacterias, por ejemplo, bacterias coliformes. Un ejemplo de bacteria coliforme causante de mastitis es la *Escherichia coli*.

5

Por consiguiente, en otro ejemplo relacionado, cuando se desea determinar si las bacterias coliformes pueden estar presentes en una muestra biológica, incluyendo pero no limitado a la leche, los medios de identificación comprenden oxbile y un indicador de pH, y la identificación de bacterias coliformes en la muestra se confirma por un cambio de color de rojo a amarillo cuando la muestra se combina con los medios de identificación.

10

En el ejemplo relacionado, el medio de identificación comprende caldo MacConkey como fuente de bilis de buey.

En un ejemplo relacionado adicional, el indicador de pH basado en color se selecciona del grupo que consiste en rojo de fenol, púrpura de bromocresol y azul de bromotimol.

15

En un ejemplo adicional más, las bacterias que causan mastitis se seleccionan del grupo que consiste en *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus alagactiae*, *Streptococcus disagalactiae*, *Staphylococcus coli* y estafilococos negativos para coagulasa que incluyen *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus hemolyticus*, *Staphylococcus arlettae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus gallinarum*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus warneri/pasteuri*, *Corynebacterium bovis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Aerococcus viridans*, *Enterobacter cloacae*, especies de *Nocardia*, *Klebsiella oxtoca*, *Arcanobacterium pyogenes*, especies de *Bacillus* y *Proteus SPP*.

20

25

Con respecto a la metritis, los métodos se pueden realizar usando una muestra de fluido obtenida del útero para identificar las bacterias que causan infección.

Es probable que la infección del ser humano o animal no humano esté causada por más de una especie bacteriana. En consecuencia, los métodos pueden realizarse en la misma muestra en paralelo para interrogar, en diferentes niveles, la naturaleza de la infección. Por ejemplo, los métodos de identificación descritos en el presente documento pueden realizarse en tiras reactivas paralelas de forma que pueda investigarse la identificación simultánea, separada o secuencial de las bacterias causantes de la infección. Remítase al ejemplo 4 para ejemplos no limitativos relacionados con la mastitis.

30

35

En un ejemplo de los métodos de identificación de bacterias, la infección es mastitis, y las bacterias causantes de la infección son estreptococos del grupo D. En un ejemplo relacionado, los estreptococos del grupo D incluyen, pero no se limitan a, *Streptococcus uberis*.

40

En otro ejemplo de los métodos de identificación de bacterias, la infección es mastitis, y las bacterias causantes de la infección son estafilococos. En un ejemplo relacionado, los estafilococos incluyen, entre otros, *Staphylococcus aureus* y estafilococos negativos para coagulasa.

45

En otro ejemplo de los métodos de identificación de bacterias, la infección es mastitis, y las bacterias causantes de la infección son estreptococos del grupo D y *E. coli* o bacterias Gram negativas. En un ejemplo relacionado, los estreptococos del grupo D incluyen, pero no se limitan a, *Streptococcus uberis*.

50

En un ejemplo adicional de los métodos de identificación de bacterias, la infección es mastitis, y las bacterias causantes de la infección son estafilococos y *E. coli* o bacterias Gram negativas. En un ejemplo relacionado, los estafilococos incluyen, entre otros, *Staphylococcus aureus* y estafilococos negativos para coagulasa.

55

En aún un ejemplo adicional de los métodos de identificación de bacterias, la infección es mastitis, y las bacterias causantes de la infección son estreptococos del grupo D, estafilococos y *E. coli* o bacterias Gram negativas. En un ejemplo relacionado, los estreptococos del grupo D incluyen, pero no se limitan a, *Streptococcus uberis*. En un ejemplo relacionado adicional, los estafilococos incluyen, entre otros, *Staphylococcus aureus* y estafilococos negativos para coagulasa.

60

Tal como se definió anteriormente, las tiras de ensayo comprenden cualquier configuración de placas, pocillos, viales o receptáculos suficientes para realizar los ensayos y métodos de la presente invención. Esto incluye la identificación de bacterias, así como la realización de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (véase más abajo).

65

En determinados ejemplos, las tiras de ensayo comprenden placas prefabricadas (por ejemplo, placas de micromatriz de 96 pocillos) que comprenden pocillos de prueba, o pocillos de prueba prefabricados en diferentes configuraciones tales como (por ejemplo) 1x10, 1x8, 1x6, 1x4, 2x3, 2x5, 3x3, 3x4, 3x8, 4x8, 4x12 etc. En otros ejemplos, los pocillos de prueba, viales o receptáculos se llenan previamente con los medios de identificación de bacterias según la presente

invención. Esto permite que la muestra biológica se añada directamente a la tira reactiva y/o a los pocillos de ensayo con el fin de enriquecer y posteriormente identificar las bacterias presentes en la muestra.

También pueden incluirse reactivos de prueba de identificación de bacterias conocidas dentro de pocillos, viales o receptáculos de prueba independientes con el fin de identificar bacterias en la muestra biológica que se va a analizar. Por ejemplo, un pocillo, vial o recipiente de prueba puede llenarse con caldo de soja tríptico y rojo de fenol para establecer simplemente la identificación de bacterias Gram positivas y Gram negativas en la muestra.

2. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

Aunque puede ser ventajoso conocer información relativa a la identidad de las bacterias causantes de infecciones o enfermedades infecciosas con el fin de seleccionar un antimicrobiano adecuado para el tratamiento de seguimiento, la información relativa al tipo de bacterias presentes en una muestra obtenida de un ser humano o animal no humano no siempre es suficiente. Por ejemplo, es posible que una cepa concreta de bacterias causantes de infección haya desarrollado resistencia farmacológica a los agentes antimicrobianos convencionales (por ejemplo, antibióticos) de los que se sabía previamente que destruían o inhibían el crecimiento de las mismas bacterias. Además, determinadas cepas de bacterias pueden ser más susceptibles a determinados antimicrobianos o de una o más clases de antimicrobianos. Por consiguiente, sería ventajoso realizar pruebas de susceptibilidad a los antibióticos en tiempo real en un intento de comprender hasta qué punto las bacterias causantes de la infección son susceptibles al tratamiento con determinados agentes antimicrobianos. Esta información también puede utilizarse para documentar tratamientos eficaces contra brotes históricos, estacionales y geográficos asociados a enfermedades infecciosas, con el fin de construir bases de datos de información. Además, mediante la realización de pruebas de susceptibilidad cuantitativas, por ejemplo a través de análisis de dilución en serie, se puede obtener información con respecto a la optimización de la dosis para un tratamiento de seguimiento del ser humano o animal no humano infectado.

Aunque el concepto de prueba de susceptibilidad antimicrobiana es conocido (por ejemplo, Watts y col. (2008) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard. Tercera edición, 28(8) Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pensilvania, EE.UU.), existen limitaciones asociadas con las técnicas existentes. Por ejemplo, las pruebas basadas en laboratorio convencionales requieren mucho tiempo (es decir, hasta varios días) e implican el aislamiento y el posterior cultivo de bacterias antes de la prueba. Esto se debe a que cada prueba requiere un inóculo específico de bacterias. Esto significa que los cultivos de bacterias deben crecer hasta la fase logarítmica exponencial por la razón de que una serie de agentes antimicrobianos sólo son eficaces contra las bacterias en división (por ejemplo, las penicilinas). El tiempo de prueba convencional a base de laboratorio no sólo consume tiempo, sino que también requiere experiencia en el campo del cultivo de bacterias, aislamiento y microbiología general. Mientras tanto, un paciente está esperando un resultado sin tratamiento o se está tratando sin conocimiento específico sobre la infección bacteriana. En cualquier situación, las consecuencias pueden ser negativas e incluso mortales para el paciente, por no hablar de la resistencia a los medicamentos.

Sería deseable realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana directamente en una muestra biológica obtenida de un ser humano o animal no humano. Este enfoque podría basarse en una prueba colorimétrica en cultivos líquidos que pueda ser fácilmente detectada y utilizada por un profano. Sin embargo, un problema asociado a menudo con el uso de muestras bacterianas clínicas es el color de fondo debido a la infección. En el caso de la mastitis, por ejemplo, este color puede describirse de amarillo a marrón en función de la gravedad de la infección. De manera similar, las muestras biológicas que comprenden orina pueden contener trazas de sangre, lo que significa que las muestras clínicas pueden tener un color de fondo rojo. Las muestras fecales pueden ser de color amarillo, marrón o incluso contener sangre. Este color de fondo puede crear dificultades para las lecturas de prueba colorimétricas.

Además, existen limitaciones con el uso de indicadores de color a concentraciones suficientes para enmascarar cualquier color de fondo de la muestra asociada con la infección. Por ejemplo, las tablas 2a-2c en el ejemplo 2 demuestran el efecto inhibitorio de un indicador de color comúnmente usado, rojo de fenol, en crecimiento de bacterias. Es decir, para enmascarar cualquier color de fondo asociado a la muestra, puede ser necesario añadir rojo de fenol a concentraciones que inhiban realmente el crecimiento bacteriano y, por tanto, el enriquecimiento. El resultado es poca o ninguna información útil sobre la eficacia potencial de los antimicrobianos cuando se aplican técnicas colorimétricas a las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Por consiguiente, las detecciones colorimétricas son difíciles y a menudo requieren aislamiento de bacterias antes de la aplicación de medios de enriquecimiento selectivos o diferenciales. Un enfoque para superar este problema es diluir muestras clínicas, por ejemplo, 100 veces, 1.000 veces o 10.000 veces para reducir el color de fondo y/o eliminar los efectos inhibitorios. Sin embargo, estas diluciones no suelen ser deseables, ya que comprometen la sensibilidad de la prueba de susceptibilidad. Alternativamente, se toman varias muestras en puntos de tiempo deseados y luego se siembran en geles de agar para recuento de células bacterianas. Sin embargo, este procedimiento lleva aún más tiempo y es más difícil de conseguir para la persona no experta.

El solicitante ha descubierto sorprendentemente que el efecto inhibitorio de los indicadores de pH basados en el color contra el crecimiento de las bacterias puede suprimirse eficazmente utilizando uno o más agentes estabilizadores, lo que significa que pueden utilizarse mayores concentraciones de indicadores de pH, es decir, rojo de fenol, no sólo en

ensayos de identificación de bacterias, sino también en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. La ventaja de utilizar mayores concentraciones de indicadores basados en el color significa que las pruebas colorimétricas pueden realizarse utilizando muestras clínicas, eliminando así los posibles problemas asociados con (i) tener que realizar técnicas de aislamiento previo y (ii) la contaminación del color de fondo causada por la infección de las muestras que se van a analizar.

Como tal, la presente invención proporciona pruebas de susceptibilidad antibiótica bacteriana que pueden realizarse utilizando ensayos de inhibición del crecimiento basados en el cambio colorimétrico. Más aún, la presente invención proporciona convenientemente métodos y kits que pueden ser utilizados por el profano en la realización de pruebas de susceptibilidad a los antibióticos con el fin de seleccionar un tratamiento adecuado.

Por consiguiente, en un aspecto de la presente invención se proporciona un método para realizar una prueba de susceptibilidad antimicrobiana en una muestra biológica obtenida de un ser humano o animal no humano, donde el ser humano o animal no humano puede estar infectado por, o en riesgo de infección por, una o más bacterias causantes de infección, el método comprende,

(i) proporcionar una mezcla de reacción que comprenda una muestra biológica obtenida de un ser humano o animal no humano y medios de susceptibilidad que comprendan medios para el crecimiento, un agente antimicrobiano, rojo de fenol y un agente estabilizador; y

(ii) determinar la susceptibilidad de una o más bacterias de la muestra al agente antimicrobiano observando un cambio de color cuando se añade la muestra al medio de susceptibilidad,

en donde el rojo de fenol está presente en la mezcla de reacción entre el 0,0035 % y el 0,30 % que es en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento de una o más bacterias causantes de infección si no fuera por la presencia del agente estabilizador,

- y en donde el agente estabilizador comprende una proteína derivada de la leche o un extracto de proteína derivada de la leche para bacterias Gram positivas, y

- el agente estabilizador comprende un hidrato de carbono para bacterias Gram negativas.

Según este aspecto de la presente invención, donde la bacteria es una bacteria Gram positiva, el agente estabilizador comprende una proteína derivada de la leche o un extracto de proteína derivado de leche. Los ejemplos de proteínas derivadas de leche o extractos de proteínas derivados de la leche incluyen, pero no se limitan a, α -caseína, β -caseína (incluyendo una o más de las variantes A1, A2, A3, B, C, D, E y F), caseína de sodio (por ejemplo, que comprende α -caseína, β -caseína y κ -caseína), κ -caseína, β -lactoglobulina, proteína de suero de leche, lactoalbúmina, lactoferrina y leche o leche en polvo, así como combinaciones de los mismos.

Según este aspecto de la presente invención, donde la bacteria es una bacteria Gram negativa, el agente estabilizador comprende un carbohidrato. Los ejemplos de hidratos de carbono según este aspecto de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, dextrosa, manitol, lactosa, trehalosa y sacarosa.

Es importante destacar que los medios de selectividad deben desempeñar dos funciones, a saber, (i) favorecer el crecimiento de las bacterias con fines de enriquecimiento bacteriano, y (ii) incluir componente(s) suficientes para identificar la susceptibilidad de las bacterias a la inhibición del crecimiento en presencia de un agente antimicrobiano.

Según la invención, el indicador de pH basado en color es rojo de fenol. Otros indicadores a base de color descritos en el presente documento son púrpura de bromocresol, azul de bromotimol, verde de bromocresol, rojo de metilo, púrpura de metilo, azolitmina, rojo neutro, naftoltaleína, rojo de cresol, cresoltaleína, fenoltaleína, 2,4-dinitrofenol, sal disódica de eritrosina, benzopurpurina 4B, N,N-dimetil-p-(m-tolilazo)amilina, p-dimetilaminoazobenceno, 4,4'-ácido bis(2-amino-1-naftilazo)-2,2'-estilbendisulfónico, sal potásica de éster etílico de tetrabromofenoltaleína, azul de bromfenol, rojo de congo, naranja de metilo, naranja de etilo, ácido 4-(4-dimetilamino-1-naftilazo)-3-metoxibencenosulfónico, resazurina, 4-fenilazo-1-naftilanina, rojo de etilo 2-(p-dimetilaminofenilazo) piridina, monohidrocloreto de 4-(p-etoxifenilazo)-m-fenilenodiamina, azul de resorcina, rojo de alizarina S, rojo de propilo, rojo de clorofenol, p-nitrofenol, sal disódica del ácido 2-(2,4-dinitrofenilazo) 1-naftol-3,6-disulfónico de alizarina, 6,8-dinitro-2,4-(1H)quinazolinadiona, amarillo brillante, m-nitrofenol, cúrcuma (curcumina), púrpura metracresol, 4,4'-ácido bis(4-amino-1-naftilazo)-2,2'-stilbendisulfónico, azul de timol, p-naftolbenceno, fenoltaleína, o-cresoltaleína, bis(2,4-dimetilfenil) etanoato de etilo.

En un ejemplo relacionado, el indicador de pH basado en color se selecciona del grupo que consiste en rojo de fenol, púrpura de bromocresol y azul de bromotimol.

Según la presente invención, el indicador de pH basado en color es fenol y se añade añadido a entre 0,0035 y 0,30 %, entre 0,005 y 0,1 % y 0,01 y 0,1 %. En particular, se añade rojo de fenol a una concentración de entre 0,0125 % y

0,03 %. A concentraciones comprendidas entre el 0,0035 y el 0,30 %, el color del rojo de fenol es suficiente para enmascarar cualquier color de fondo asociado a la muestra que se va a analizar.

5 Además, la presente descripción contempla el uso de agentes de ajuste del pH (es decir, ácidos y bases) suficientes para ajustar el pH de la mezcla de reacción a un pH deseado inmediatamente antes de la adición de la muestra a analizar. Por ejemplo, cuando se desea tener un pH inicial de 7,2, y la mezcla de reacción se asienta a 7,0, se puede realizar la adición de (por ejemplo) hidróxido de sodio para llevar el pH a 7,2. Estos tipos de modificaciones de ajuste del pH serían conocidos por un experto en la técnica.

10 Tal como se discutió previamente, el propósito del agente estabilizante es suprimir el efecto inhibitor del indicador de pH basado en el color en el crecimiento de bacterias. Un ejemplo de un agente estabilizador adecuado cuando se somete a prueba la susceptibilidad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas es una proteína derivada de la leche o una proteína derivada de la leche, tal como (por ejemplo) α -caseína, β -caseína (incluyendo una o más de las
15 variantes A1, A2, A3, B, C, D, E y F), caseína de sodio (por ejemplo, que comprende α -caseína, β -caseína y κ -caseína), κ -caseína, β -lactoglobulina, proteína de suero de leche, lactoalbúmina, lactoferrina y leche o leche en polvo, así como combinaciones de los mismos. Un ejemplo de un agente estabilizante adecuado cuando se somete a prueba la susceptibilidad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas es un hidrato de carbono, tal como (por ejemplo) dextrosa, manitol, lactosa, trehalosa y sacarosa. El efecto del agente estabilizante en la supresión del efecto inhibitor del crecimiento de (por ejemplo) concentraciones aumentadas de rojo de fenol es evidente a partir de los resultados
20 enumerados en las tablas 4a a 4d, cuando se comparan con las tablas 2a a 2c.

Además, puede ser conveniente probar la eficacia del agente antimicrobiano, o de la combinación de agentes antimicrobianos, a diferentes concentraciones para determinar cuál puede ser una dosis eficaz en un tratamiento de
25 seguimiento.

En consecuencia, en un ejemplo según la descripción, la etapa de combinar la muestra biológica con medios de susceptibilidad que comprenden un agente antimicrobiano comprende pruebas de susceptibilidad cuantitativa. Las pruebas de susceptibilidad cualitativa se definen específicamente en el presente documento, y se pueden lograr usando, por ejemplo, dilución en serie del agente antimicrobiano a analizar o usando concentraciones
30 preseleccionadas del agente antimicrobiano a analizar. Ejemplos de pruebas de susceptibilidad cuantitativa de acuerdo con la presente invención se proporcionan en el ejemplo 6.

En determinados ejemplos, el agente antimicrobiano es un antibiótico o una combinación de antibióticos.

35 En un ejemplo relacionado, el antibiótico o combinación de antibióticos se selecciona del grupo que consiste en penicilinas, cefalosporinas, macrólidos, lincosamidas, florfenicol, quinolinas, monobactamas, tetraciclinas, aminoglucósidos, sulfonamidas, polimixinas y glucopéptidos.

En otros ejemplos, la etapa de combinar la muestra biológica con el medio de susceptibilidad comprende cultivar las
40 bacterias durante un periodo de entre 7 y 48 h a 25 a 45 °C.

Los métodos de susceptibilidad microbiana se realizan en menos de 24 h, aunque son deseables periodos de tiempo de menos de 12 h, y menos de 7 h. Aunque el tiempo hasta la identificación depende en última instancia del inóculo bacteriano en la muestra clínica o biológica analizada, también se hace referencia a la figura 1, que muestra la
45 inhibición del crecimiento bacteriano en función del tiempo. Estos datos indican que una lectura de susceptibilidad a < 7 h puede proporcionar información engañosa, de ahí la importancia de evaluar la susceptibilidad antimicrobiana a lo largo del tiempo.

En otros ejemplos de la presente invención, la prueba de susceptibilidad antimicrobiana se usa para determinar la
50 susceptibilidad de bacterias a antibióticos con el fin de tratar la mastitis o metritis. Esto implica obtener una muestra de leche de un ser humano o animal no humano sospechoso de infección por mastitis o metritis y realizar pruebas de susceptibilidad a antibióticos según los métodos de la presente. Realizando pruebas de susceptibilidad a los antibióticos “en tiempo real” en una muestra de leche obtenida de un ser humano o animal no humano, se puede obtener la susceptibilidad de las bacterias causantes de la infección a determinados antibióticos o combinaciones de
55 antibióticos, además de a cualquier otro agente antimicrobiano. Este enfoque también elimina los posibles problemas creados por las bacterias resistentes a los fármacos cuando el antibiótico se ha seleccionado exclusivamente en función de los análisis de identificación de las bacterias. Por lo tanto, aumentan las probabilidades de éxito del tratamiento para el ser humano o el animal no humano.

60 A pesar de las ventajas que confieren las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos que utilizan muestras obtenidas de un ser humano o de un animal no humano, también podría ser útil determinar la identidad de las bacterias causantes de la infección paralelamente a las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. Por ejemplo, en investigar la mastitis o metritis. Por consiguiente, la presente invención también contempla métodos dobles y kits de prueba para lograr la identificación de bacterias y la prueba de susceptibilidad a antibióticos. Remítase al ejemplo 7,
65 que proporciona ejemplos de identificación de bacterias y pruebas de susceptibilidad combinadas de acuerdo con la presente invención.

Tal como se describe en el presente documento, el propósito del agente estabilizante es suprimir el efecto inhibitor del indicador de pH basado en color. Un ejemplo de un agente estabilizante según la presente invención es la leche. Por consiguiente, en el caso de que la muestra a analizar sea leche, por ejemplo en el caso de pruebas de susceptibilidad relacionadas con mastitis o metritis, entonces no es necesario incluir un agente estabilizador.

En consecuencia, en otro aspecto de la presente descripción se proporciona un método para realizar una prueba de susceptibilidad antimicrobiana en una muestra biológica que comprende leche obtenida de un ser humano o animal no humano, donde el ser humano o animal no humano puede estar infectado por, o en riesgo de infección por, una o más bacterias causantes de infección, el método comprende,

(i) proporcionar una mezcla de reacción que comprenda una muestra biológica obtenida de un animal humano o no humano y medios de susceptibilidad que comprendan un agente antimicrobiano y un indicador de pH basado en el color; y

(ii) determinar la susceptibilidad de una o más bacterias de la muestra al agente antimicrobiano observando un cambio de color cuando se añade la muestra al medio de susceptibilidad,

en donde el indicador de pH está presente en la mezcla de reacción en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento de una o más bacterias causantes de infección si no fuera por la presencia del agente estabilizador.

En un ejemplo relacionado, el antibiótico seleccionado para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana en una muestra obtenida de un animal humano o no humano sospechoso de estar infectado por mastitis comprende un antibiótico seleccionado del grupo que consiste en amoxicilina, ampicilina, bencilpenicilina o penicilina G, carbenicilina, clavulanato, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, metilicina, nafcilina, oxacilina, penetamato, fenoximetilpenicilina o penicilina V, sulbactam, tazobactam, cefracetrilo, cefalexina, cefalotina, cefapirina, cefuroxima, ceftiofur, cefquinoma, eritromicina, oleandomicina, tilosina, clindamicina, lincomicina, pirlimicina, florfenicol, danofloxacino, difloxacino, enrofloxacin, ibafloxacino, marbofloxacino, orbifloxacino, sarafloxacino, ciprofloxacino, aztreonam, oxitetraciclina, tetraciclina, dihidroestreptomina, neomicina, kanamicina, estreptomina, gentamicina, sulfadiazina, sulfametoxazol, sulfadoxina y vancomicina.

El método básico de la prueba de susceptibilidad implica probar la susceptibilidad de un microorganismo a la inhibición del crecimiento por una concentración preseleccionada de un producto antimicrobiano utilizando un panel de prueba con un pocillo o receptáculo de control de crecimiento negativo, un pocillo o receptáculo de control de crecimiento positivo y un pocillo o receptáculo de prueba. Los términos "pocillo" o "receptáculo" se utilizarán indistintamente en esta especificación, entendiéndose que el término "receptáculo" es general a cualquier estructura apropiada para contener analitos de prueba. Los métodos no son dependientes del uso de un panel multipocillo o una placa multipocillo, y podrían usarse receptáculos individuales separados. Se prefiere el enfoque de panel o placa por la simplicidad de manejo dentro y fuera de incubadoras y por otras razones que son bien conocidas por la persona experta.

Un ejemplo de cómo se podría realizar la prueba de susceptibilidad se describe en los Ejemplos 2 y 6 que siguen. Los medios adecuados para el cultivo microbiano incluyen caldo de soja triptico, caldo Mueller Hinton, caldo de MacConkey y caldo de esculina entre otros medios de cultivo conocidos en la técnica. Ejemplos de medios de crecimiento habituales para el cultivo de microorganismos se enumeran en el Ejemplo 1.

La concentración del medio de crecimiento seleccionado puede estar en el intervalo convencional de concentraciones usadas actualmente en la industria de las pruebas de susceptibilidad.

También es deseable proporcionar kits de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y/o de identificación de bacterias listos para usar que comprendan analitos que tengan una vida útil adecuada para sobrevivir al envío y almacenamiento durante periodos de corto a medio plazo. Algunos antibióticos de la penicilina o cefalosporina se degradan en medios acuosos cuando se almacenan a temperatura ambiente a lo largo del tiempo. Si la degradación del fármaco se produce en el estante, entonces la concentración real del fármaco en el momento de la prueba sería desconocida creando potencial para proporcionar información incorrecta (por ejemplo) de resultados falsos negativos de prueba.

Un enfoque para evitar esta limitación, que es particularmente útil en el caso de antibióticos, es proporcionar agentes antimicrobianos secos o liofilizados, incluyendo antibióticos. Otro enfoque es congelar agentes antimicrobianos, incluyendo antibióticos.

Para proporcionar al usuario final una prueba de susceptibilidad antimicrobiana lista para usar conveniente, los antimicrobianos deben estabilizarse químicamente para su almacenamiento. Esto se puede lograr si el antimicrobiano de elección (por ejemplo, antibiótico) se incluye en el kit de prueba junto con medios de susceptibilidad y almacenados en el congelador, o si el fármaco de elección se seca o se liofiliza. Por ejemplo, el medio de susceptibilidad que comprende un antimicrobiano deseado puede añadirse a un pocillo del kit de prueba en el concentrado deseado, y luego secarse a 75 °C durante 30 min. Los medios de susceptibilidad, incluyendo los antibióticos de elección, ahora

Macrólidos incluyendo, pero sin limitarse a, azitromicina, claritromicina, eritromicina, telitromicina, carbomicina A, josamicina, kitasamicina, midecamicina/acetato de midecamicina, oleandomicina, solitromicina, espiramicina, troleandomicina, tilosina, roxitromicina.

5 *Lincosamidas* incluyendo, pero sin limitarse a, clindamicina, lincomicina, pirlimicina.

Quinolonas incluyendo, pero sin limitarse a, danofloxacino, difloxacino, enrofloxacino, ibafloxacino, marbofloxacino, orbifloxacino, sarafloxacino, ciprofloxacino.

10 *Monobactamas* incluyendo, pero sin limitarse a, aztreonam.

Tetraciclinas incluyendo, pero sin limitarse a, doxiciclina, clortetraciclina, clomociclina, demeclociclina, limeciclina, meclociclina, metaciclina, minociclina, oxitetraciclina, penimepiciclina, rolitetraciclina, tetraciclina.

15 *Aminoglucósidos* incluyendo, pero sin limitarse a, dihidroestreptomicina, neomicina, kanamicina, estreptomicina, gentamicina.

Sulfonamidas incluyendo, pero sin limitarse a, sulfadiazina, sulfametoxazol, sulfadoxina.

20 *Polimixinas* incluyendo, pero sin limitarse a, polimixina B, colistina.

Glucopéptidos incluyendo, pero sin limitarse a, vancomicina, teicoplanina, avoparcina.

Otros antibióticos incluyendo, pero sin limitarse a, carbapenems, cloranfenicol, pleuromutilinas, polipéptidos.

25 Según los métodos y kits de la presente divulgación, los antibióticos se usan en forma libre o en diversas formas de sal. Por ejemplo, la bencilpenicilina puede utilizarse como sal potásica, sódica o procaína, la cloxacilina como sal sódica o benzoatínica, el ceftiofur como sal ácida, clorhidrato o sódica, la cefapirina como sal sódica o benzoatínica, la cefazolina puede utilizarse en forma libre o como sal sódica, la oxitetraciclina como sal clorhidrato, la neomicina como sal trisulfato, la cefalexina como monohidrato y la dihidroestreptomicina como sal sulfato. Dependiendo del antibiótico que se vaya a utilizar, (por ejemplo) en las pruebas de susceptibilidad o en un régimen de tratamiento de seguimiento, por ejemplo en el tratamiento de la mastitis, la persona experta sabrá la forma adecuada de antibiótico (es decir, forma libre o sal particular) que debe utilizarse.

35 En un ejemplo según la presente descripción, los antibióticos utilizados en pruebas de susceptibilidad en muestras de leche de mastitis incluyen, pero no se limitan a, bencilpenicilina como sal procaína, oxitetraciclina como sal clorhidrato, cefalexina como monohidrato, neomicina como sal trisulfato, dihidroestreptomicina como sal sulfato, aztreonam en forma libre, ceftiofur como clorhidrato y cloxacilina como sal sódica. Además, se contemplan combinaciones de antibióticos para su uso en los métodos de la presente invención. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, bencilpenicilina como procaína en combinación con cloxacilina como sodio, así como oxitetraciclina como clorhidrato en combinación con neomicina como sal de trisulfato.

4. Kits de pruebas

45 La presente invención también contempla un kit de prueba para realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en bacterias Gram positivas que causan infección en un ser humano o un animal no humano, el kit de prueba que comprende reactivos para realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en una muestra de prueba de un ser humano o un animal no humano según el método de la invención junto con instrucciones de uso, en donde los reactivos comprenden un medio de crecimiento, un agente antimicrobiano, rojo de fenol y un agente estabilizador que comprende una proteína derivada de la leche o un extracto de proteína derivada de la leche, y en donde el rojo de fenol está presente en la mezcla de reacción del kit de prueba entre el 0,0035 % y el 0,30 %. También parte de la invención es un kit de prueba para realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en bacterias Gram negativas que causan infección en un ser humano o un animal no humano, el kit de prueba que comprende reactivos para realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en una muestra de prueba de un ser humano o un animal no humano según el método de la invención junto con instrucciones de uso, en donde los reactivos comprenden un medio de crecimiento, un agente antimicrobiano, rojo de fenol y un agente estabilizador que comprende un hidrato de carbono, y en donde el rojo de fenol está presente en la mezcla de reacción del kit de prueba entre el 0,0035 % y el 0,30 %.

60 Los kits de prueba pueden contener reactivos para realizar la prueba de susceptibilidad antimicrobiana en formas líquidas o liofilizadas. Sin embargo, se prefieren los reactivos que han sido liofilizados, y que pueden ser rápidamente resuspendidos en solución inmediatamente antes de su uso. Esto mejora la vida útil de los productos. Además, los medios de reactivo liofilizado pueden incluir además un agente de eliminación de humedad tal como sílice coloidal hidrófila para eliminar el exceso de contenido de humedad/agua. De nuevo, la inclusión de un agente eliminador de humedad mejora aún más la vida útil de los kits de prueba de acuerdo con la presente invención.

65

La metodología típica de secado por congelación o liofilización comprende las siguientes etapas:

Etapas:
Etapa 1: Solidificación

- 5 (i) Llenar el recipiente de muestras preferido con medios de cultivo líquidos
- (ii) Tomar el recipiente de muestras lleno con medios y congelarlo, es decir, a -40 °C bajo presión atmosférica (esto se puede hacer dentro del liofilizador o en un congelador separado) se denomina solidificación (etapa 1)
- 10 (iii) Transferir el recipiente de muestras con medios congelados al liofilizador

Etapa 2: Secado por sublimación (secado primario)

- 15 ○ Presión reducida, típicamente menor que 100 Pa
- Temperatura de inicio -40 °C, la temperatura se aumenta continuamente hasta, es decir, -10 °C, rampa 0,06 °C/min, luego a -10 °C, se mantiene la temperatura durante, es decir, 8 h

Etapa 3: Secado por desorción (secado secundario)

- 20 ○ Presión reducida, típicamente menor que 100 Pa
- Temperatura de inicio -10 °C, la temperatura se aumenta continuamente hasta, es decir, -40 °C, rampa 1,5 °C/min, luego a 40 °C, se mantiene la temperatura durante, es decir, 6 h

Etapa 4: Sellado (opcional)

- 25 ○ Una tapa de goma se empuja en el contenedor de muestras a baja presión para proteger los medios liofilizados

Etapa 5: Aumentar la presión hasta presión atmosférica y sacar las muestras

35 En determinados ejemplos, las tiras de prueba que comprenden medios de identificación liofilizados/lioofilizados y/o medios de prueba de susceptibilidad (tubos separados) pueden prepararse de acuerdo con la metodología descrita anteriormente. Las tiras reactivas se pueden enviar a continuación al punto de uso (por ejemplo, en la granja), donde se pueden añadir muestras biológicas (por ejemplo, leche) para crear la mezcla de reacción para el cribado fenotípico.

40 De acuerdo con la enseñanza de esta memoria descriptiva, la persona experta reconocerá que las tiras reactivas comprenden diferentes reactivos (medios de identificación/susceptibilidad) dependiendo de la naturaleza de la aplicación y las bacterias a (i) identificarse y/o (ii) cribarse potencialmente para la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos.

45 Por ejemplo, y sólo a modo de ilustración, las tiras de prueba de susceptibilidad a antibióticos se envasan para contener medios de crecimiento liofilizados (por ejemplo, caldo de soja tríptico), antibióticos (por ejemplo, bencilpenicilina; en diluciones en serie), indicador de pH (por ejemplo, rojo de fenol) y opcionalmente un agente estabilizante (por ejemplo, una o más caseínas). Después, las tiras de prueba se sellan en bolsas de aluminio o de plástico al vacío y/o con bolsitas de gel de sílice (eliminadores de humedad) y se envían a un sitio de prueba deseado. Adición de una muestra de prueba por ejemplo, muestra biológica; remítase a lo anterior) dará como resultado la resuspensión del medio de susceptibilidad que proporciona una mezcla de reacción de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

Ejemplos

55 Ejemplo 1 (por razones de comparación): Materiales y métodos

1. Medios de enriquecimiento habituales para el cultivo de bacterias

60 Caldo de soja tríptico (pH~7,3) (% p/v)

Tritona (digestión pancreática de caseína) 1,7 %

Soytone (Hidrolizado pancreático de harina de soja) 0,3 %

65 Glucosa (=Dextrosa) 0,25 %

ES 2 952 442 T3

	Cloruro de sodio	0,5 %
5	Hidrogenofosfato dipotásico	0,25 %
	Agua	97,0 %
	Caldo de MacConkey (pH ~7,3) (% p/v)	
10	Hidrolizado enzimático de gelatina	2,0 %
	Lactosa	1,0 %
15	Oxidación	0,5 %
	Púrpura de Bromocresol	0,001 %
	Agua	96,499 %
20	Agar de esculina (% p/v)	
	Agar	1,5 %
	Hidrolizado pancreático de caseína	1,3 %
25	NaCl	0,5 %
	Extracto de levadura	0,5 %
30	Músculo cardíaco, sólidos de infusión	0,2 %
	Esculina	0,1 %
35	Citrato férrico	0,05 %
	Agua	95,85 %
	Caldo de esculina azida (pH~7,2) (% p/v)	
40	Hidrolizado péptico de tejido animal	2,0 %
	Extracto de levadura	0,5 %
45	Sales biliares	1,0 %
	Citrato de sodio	0,1 %
	Esculina	0,1
50	Citrato de amonio férrico	0,05 %
	Azida de sodio	0,025 %
55	Agua	96,225 %
	Agar con sal de manitol (% p/v)	
	Agar	1,5 %
60	Hidrolizado enzimático de caseína	0,5 %
	Hidrolizado enzimático de tejido animal	0,5 %
65	Extracto de ternera	0,1 %
	D-Manitol	1,0 %

ES 2 952 442 T3

	Cloruro de sodio	7,5 %
5	Rojo de fenol	0,0025 %
	Agua	88,8975 %
	Caldo con sal de manitol (pH ~7,3) (% p/v)	
10	Manitol	0,25 %
	Cloruro de sodio	10 %
15	Peptona de soja	0,3 %
	Peptona de caseína	1,275 %
	Peptona de gelatina	0,425 %
20	Rojo de fenol	0,0025 %
	Fosfato dipotásico	0,25 %
25	Agua	87,4975 %
	Agar Baird Parker (% p/v)	
	Triptona	1 %
30	Extracto de ternera	0,5 %
	Extracto de levadura	0,1 %
35	Glicina	1,2 %
	Piruvato de sodio	1,0 %
	Cloruro de litio	0,5 %
40	Agar	1,5 %
	Agua	94,2 %
45	+50 ml de emulsión de telurito de yema de huevo por litro	
	Base de caldo Giolitti Cantoni (% p/v) pH ~6,9	
	Triptona	1 %
50	Extracto de ternera	0,5 %
	Extracto de levadura	0,5 %
55	D-Manitol	2 %
	Cloruro de sodio	0,5 %
	Cloruro de litio	0,5 %
60	Glicina	0,12 %
	Piruvato de sodio	0,3 %
65	Agua	94,58 %

ES 2 952 442 T3

Añadir 1,05 ml (~5,24 %) o cuando se analice la carne añadir 0,105 ml (~0,55 %) de solución de telurita al 1 % en 19 ml de caldo base Giolitti Cantoni

5	Caldo Mueller Hinton (% p/v)	
	Hidrolizado ácido de caseína	1,75 %
	Extracto de ternera	0,3 %
10	Almidón	0,15 %
	Agua	97,9 %
15	2. Muestras bacterianas	
	Muestra bacteriana 1:	
	Escherichia coli en caldo de soja tríptico/ufc/ml	
20	a) ~10 ⁸ ; b) ~10 ⁷ ; c) ~10 ⁶ ; d) ~10 ⁵ ; e) ~10 ⁴ ; f) ~10 ³ ; g) ~10 ²	
	Muestra bacteriana 2:	
	Staphylococcus aureus en caldo de soja tríptico/ufc/ml	
25	a) ~10 ⁸ ; b) ~10 ⁷ ; c) ~10 ⁶ ; d) ~10 ⁵ ; e) ~10 ⁴ ; f) ~10 ³ ; g) ~10 ²	
	Muestra bacteriana 3:	
30	Streptococcus uberis en caldo de soja tríptico/ufc/ml	
	a) ~10 ⁸ ; b) ~10 ⁷ ; c) ~10 ⁶ ; d) ~10 ⁵ ; e) ~10 ⁴ ; f) ~10 ³ ; g) ~10 ²	
	Muestra bacteriana 4:	
35	Escherichia coli en leche procesada entera/ufc/ml	
	a) ~10 ⁸ ; b) ~10 ⁷ ; c) ~10 ⁶ ; d) ~10 ⁵ ; e) ~10 ⁴ ; f) ~10 ³ ; g) ~10 ²	
40	Muestra bacteriana 5:	
	Staphylococcus aureus en leche procesada entera/ufc/ml	
45	a) ~10 ⁸ ; b) ~10 ⁷ ; c) ~10 ⁶ ; d) ~10 ⁵ ; e) ~10 ⁴ ; f) ~10 ³ ; g) ~10 ² ; h) ~10 ^{6,5}	
	Muestra bacteriana 6:	
	Streptococcus uberis en leche procesada entera/ufc/ml	
50	a) ~10 ⁸ ; b) ~10 ⁷ ; c) ~10 ⁶ ; d) ~10 ⁵ ; e) ~10 ⁴ ; f) ~10 ³ ; g) ~10 ²	
	Muestra bacteriana 7:	
	Staphylococcus epidermidis (negativo para coagulasa) en leche procesada entera/ufc/ml	
55	a) ~10 ⁸ ; b) ~10 ⁷ ; c) ~10 ⁶ ; d) ~10 ⁵ ; e) ~10 ⁴ ; f) ~10 ³ ; g) ~10 ² ; h) ~10 ^{6,5}	
	Muestra de bacterias 8 (%v/v) (sin bacterias)	
60	Leche procesada entera	100 %
	Muestra bacteriana 9:	
	Streptococcus agalactiae en leche procesada entera/ufc/ml	
65	a) ~10 ⁶ ; b) ~10 ³ ;	

ES 2 952 442 T3

Muestra bacteriana 10:

Escherichia coli en orina/ufc/ml

5

a) 10^7 ; b) 10^5 ; c) 10^3

Muestra bacteriana 11:

10 Streptococcus uberis en orina/ufc/ml

a) 10^7 ; b) 10^5 ; c) 10^3

Muestra de bacterias 12:

15

Staphylococcus epidermidis en caldo de soja tríptico/ufc/ml

a) 10^7 ; b) 10^5

20 3. Muestras de bacterias clínicas de mastitis bovina

ID de muestra: 1 a 8 obtenido de una granja en South Island, Nueva Zelanda.

4. Composiciones

25

Composición 1: (% p/v)

Única concentración de caldo MacConkey 99,9875 %

30 Rojo de fenol 0,0125 %

Composición 2 (% p/v)	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
Caldo de soja tríptico	99,9985 %	99,995 %	99,9875 %	99,975 %	99,95 %
Rojo de fenol	0,0015 %	0,005 %	0,0125 %	0,025 %	0,05 %

40 Composición 3 (% p/v)

Caldo de soja tríptico 99,96 %

45 Púrpura de Bromocresol 0,04 %

Composición 4 (% p/v)	(a)	(b)	(c)	(d)
Caldo de soja tríptico	99,85 %	98,5 %	97 %	92,5 %
Esculina	0,1 %	1,0 %	2,0 %	5,0 %
Citrato de amonio férrico	0,05 %	0,5 %	1 %	2,5 %

50 Composición 5 (% v/v)

Caldo Giolitti Cantoni 98,77 %

55 Solución de telurita potásica al 1 % p/v 1,23 %

Composición 6 (% v/v)

60 Caldo Giolitti Cantoni 98,0 %

Solución de telurita potásica al 1 % p/v 2,0 %

Composición 7 (% v/v)

65 Caldo Giolitti Cantoni 83,33 %

ES 2 952 442 T3

	Solución de telurita potásica al 1 % p/v	16,67 %
	Composición 8 (% v/v)	
5	Caldo Giolitti Cantoni	88,89 %
	Solución de telurita potásica al 1 % p/v	11,11 %
10	Composición 9 (% v/v)	
	Caldo con sal de manitol	98,77 %
	Solución de telurita potásica al 1 % p/v	1,23 %
15	Composición 10 (% v/v)	
	Caldo con sal de manitol	93,02 %
20	Solución de telurita potásica al 0,1 % p/v	6,98 %
	Composición 11 (% v/v)	
	Caldo con sal de manitol	100 %
25	Composición 12 (% v/v)	
	Caldo con sal de manitol	49,385 %
30	Agua destilada	49,385 %
	Solución de telurita potásica al 1 % p/v	1,23 %
	Composición 13 (% v/v)	
35	Caldo con sal de manitol	50 %
	Agua destilada	50 %
40	Composición 14 (% p/v)	
	Caldo con sal de manitol	98,75 %
	Lactosa	1,25 %
45	Composición 15 (% p/v)	
	Caldo de soja trípico	96,362 %
50	Rojo de fenol	0,025 %
	Solución de telurita potásica al 1 % p/v	3,614 %
	Composición 16 (% p/v)	
55	Caldo de soja trípico	96,374 %
	Rojo de fenol	0,0125 %
60	Solución de telurita potásica al 1 % p/v	3,614 %
	Composición 17 (% p/v)	
	Caldo de soja trípico	93,0 %
65	Rojo de fenol	0,023 %

ES 2 952 442 T3

	Solución de telurita potásica al 1 % p/v	6,977 %
5	Composición 18 (% p/v)	
	Caldo de soja tréptico	99,625 %
	Esculina	0,25 %
10	Citrato de amonio férrico	0,125 %
	Composición 19 (% p/v)	
15	Caldo MacConkey	99,975 %
	Rojo de fenol	0,025 %
	Composición 20 (% v/v)	
20	Base de caldo Giolitti Cantoni	93,82 %
	Solución de telurita potásica al 1 % p/v	6,18 %
25	Composición 21 (% v/v)	
	Caldo con sal de manitol	75,0 %
	Solución de telurita potásica al 0,1 % p/v	6,56 %
30	Solución de cloruro de litio al 10 % p/v	6,25 %
	Solución de glicina al 10 % p/v	1,5 %
35	Agua destilada	10,69 %
	Composición 22 (% p/v)	
	Caldo de soja tréptico	99,625 %
40	Esculina	0,5 %
	Citrato de amonio férrico	0,25 %
45	Composición 23 (% p/v)	
	Caldo MacConkey	98,98 %
	Rojo de fenol	0,02 %
50	Cloxacilina de sodio	1,0 %
	Composición 24 (% p/v)	
55	Caldo de soja tréptico	99,98 %
	Rojo de fenol	0,02 %
	Composición 25 (% p/v)	
60	Caldo de soja tréptico	98,56 %
	Esculina	0,22 %
65	Citrato de amonio férrico	0,11 %
	Gentamicina al 1 % p/v	1,11 %

ES 2 952 442 T3

Composición 26 (% p/v)

5	Caldo Mueller Hinton	99,9875 %
	Rojo de fenol	0,0125 %

Composición 27 (% p/v)

10	Caldo de soja tréptico	99,2375 %
	Esculina	0,5 %
15	Citrato de amonio férrico	0,25 %
	Rojo de fenol	0,0125 %

Composición 28 (% p/v)

		(a)	(b)	(c)	(d)
20	Caldo de soja tréptico	99,85 %	99,85 %	99,94 %	99,95 %
	Rojo de fenol	0,05 %	0,05 %	0,05 %	0,05 %
	Triton X 100	1,0 %	0,1 %	0,01 %	0 %

25 Las composiciones 29-54 se enumeran en la tabla 90.

	Composición 55	g	g
30	Rojo de fenol	0,0125 %	0,001
	Caldo con sal de manitol	8,0 %	0,800
	agua (estéril)	91,9875 %	9,199
	Volumen total	100,0 %	10,000

	Composición 56	%
35	Manitol	3,39 %
	Glicina	0,21 %
	Cloruro de litio	0,17 %
	Piruvato de sodio	0,51 %
40	Caldo de soja tréptico	95,72 %
	Total	100,00 %

	Composición 57	%
45	Composición 56	90,0 %
	Solución de telurita de potasio al 1 %	10,0 %

	Composición 58	%
50	Manitol	3,39 %
	Glicina	0,21 %
	Cloruro de litio	0,17 %
	Piruvato de sodio	0,51 %
55	Sílice coloidal hidrófila	5,00 %
	Caldo de soja tréptico	90,72 %
	Total	100,00 %

	Composición 59	%
60	Composición 60	78,1 %
	Solución de telurita de potasio al 1 %	21,9 %

Ejemplo 2: Prueba de susceptibilidad a antibióticos

(ejemplos distintos de los que comprenden rojo de fenol en la mezcla de reacción a entre 0,0035 % y 0,30 % en combinación con el agente estabilizante no forman parte de la invención)

1. Experimentos preliminares basados en el desarrollo de pruebas y validación

En este ejemplo, se usan las siguientes abreviaturas: McC=caldo MacConkey; TSB= caldo de soja trípico

Bacterias Gram negativas incluyendo E. coli en caldo MacConkey más adición de rojo de fenol (medios de enriquecimiento para bacterias coliformes); El caldo de Conkey se usa para la detección de bacterias coliformes en la leche y agua.

Fórmula para el caldo MacConkey g/l

Hidrolizado enzimático de gelatina 20 g

Lactosa 10 g

Oxidación 5 g

Púrpura de Bromocresol 0,01 g

Si se cultivan bacterias Gram negativas, incluyendo E. coli, en caldo MacConkey con un exceso de rojo de fenol, como era de esperar el color es inicialmente rojo y se vuelve amarillo con el crecimiento de las bacterias. Es importante destacar que el color amarillo permanece durante hasta 48 h. Consulte la tabla 1, a continuación.

La tabla 2a muestra la E. coli cultivada en un medio de enriquecimiento general, que se requiere para la prueba de susceptibilidad a antibióticos. Los resultados demuestran que, con el aumento de la concentración de rojo de fenol, la intensidad de rojo aumenta y, por tanto, la respuesta de color amarillo (datos no mostrados). En aras de la simplicidad, los resultados descritos en el presente documento simplemente indican rojo o amarillo. Sin embargo, se puede medir la cinética asociada con el cambio de color. Consulte más adelante.

Tal como se esperaba, cuando E. coli se cultiva en medios de enriquecimiento generales, se produce un cambio de color de rojo a amarillo. Sin embargo, el cambio de color no es estable, se degrada de amarillo de vuelta a naranja/rojo después de ~11,5 h. Aunque puede haber alguna diferencia discernible entre los tonos de rojo en T=0 y T=24, esto no es deseable. Además, dado el efecto inhibitor del crecimiento bacteriano de muchos indicadores de pH basados en color, tampoco es deseable añadir simplemente más (por ejemplo) rojo de fenol a la prueba por la razón que. Esto se ilustra en las tablas 2b y 2c donde se investigó el crecimiento de Staphylococcus aureus y Streptococcus uberis en función de la concentración creciente de rojo de fenol.

Es importante destacar que el éxito de una prueba colorimétrica depende de un cambio de color estable que se mantenga durante toda la ventana de muestreo. En el caso de la identificación bacteriana y/o las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos, se desea una ventana de muestreo de ~24 h.

La presente invención supera estas limitaciones mediante la inclusión de uno o más agentes estabilizadores que suprimen el efecto inhibitor potencial del indicador de pH basado en el color. Como tal, se pueden usar concentraciones aumentadas del indicador de pH basado en color (es decir, rojo fenol) en la prueba, logrando así estabilidad en el cambio de color asociado al crecimiento de bacterias. Un ejemplo de un agente estabilizante según la presente invención es la leche.

2. Prueba de susceptibilidad a antibióticos

En este ejemplo, se usan medios de cultivo líquidos que permiten la identificación temprana y fácil de antimicrobianos susceptibles para apoyar la decisión de selección de antimicrobianos para tratar infecciones bacterianas. También permite la detección de bacterias como gram+ y/o gram- en muestras clínicas están presentes y/o permite la estimación del inóculo a partir de análisis cinéticos de cambio de color. La base de este medio de cultivo líquido es un medio de enriquecimiento de líquido de propósito general, por ejemplo, caldo de soja trípico (medio de extracto de caseína de soja) pero también podría ser caldo Mueller Hinton. Este medio TSB tiene un exceso de concentración de un indicador de pH como el rojo de fenol y/o el púrpura de bromocresol y leche. Dichos medios de cultivo se mezclan luego con una muestra clínica de ser humano o animal tal como leche cruda, orina, heces, sangre, esputo u otros tipos de muestras de intercambio. Si la muestra clínica es una muestra de leche, no se requiere leche adicional. Los análisis colorimétricos pueden realizarse a simple vista o mediante un lector óptico, por ejemplo a través de un chip de cámara CCD o un fotodiodo.

En las tablas que siguen, se proporciona un inóculo aproximado de bacterias en la muestra sometida a prueba. Por ejemplo, 10^6 , 10^7 y 10^8 . El experto reconocerá que un inóculo de 10^8 es aproximado y puede representar a modo de ejemplo no limitativo $7,6 \times 10^7$ u $8,4 \times 10^8$.

ES 2 952 442 T3

Tabla 1: 80 µl de composición 1 + 20 µl de muestra bacteriana 1a, 1c o 1e

E-Coli	t=0 h			t=5 h			t=16 h			t=24 h			t=48 h		
Inóculo ufc/ml	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁴
Composición 1	rojo	rojo	rojo	Naranja	rojo	rojo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo

Tabla 2a: 80 µl de composición 2a, 2b, 2c, 2d o 2e + 20 µl de muestra bacteriana 1b, 1d o 1f

E-Coli	t=0 h			t=5 h			t=7 h			t=11,5 h			t=23,5 h		
Inóculo ufc/ml	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	10 ⁷	10 ⁵	10 ³
Composición 2a	rosa	rosa	rosa	amarillo	amarillo	rosa	amarillo	amarillo	rosa	amarillo	amarillo	amarillo	rojo	rojo	rojo
Composición 2b	rojo	rojo	rojo	amarillo	rojo	rojo	amarillo	amarillo	rojo	amarillo	amarillo	amarillo	rosa	rosa	rosa
Composición 2c	rojo	rojo	rojo	amarillo	rojo	rojo	amarillo	amarillo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
Composición 2d	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
Composición 2e	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo

Tabla 2b: 80 µl de composición 2a, 2b, 2c, 2d o 2e + 20 µl de muestra bacteriana 2b, 2d o 2f

Staph aureus	t=0 h			t=5 h			t=7 h			t=11,5 h			t=23,5 h		
Inóculo ufc/ml	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	10 ⁷	10 ⁵	10 ³
Composición 2a	rosa	rosa	rosa	amarillo	rosa	rosa	amarillo	rojo	rojo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo
Composición 2b	rojo	rojo	rojo	amarillo	rojo	rojo	amarillo	rojo	rojo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo
Composición 2c	rojo	rojo	rojo	amarillo	rojo	rojo	amarillo	rojo	rojo	amarillo	amarillo	rojo	amarillo	amarillo	amarillo
Composición 2d	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
Composición 2e	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo

Tabla 2c: 80 µl de composición 2a, 2b, 2c, 2d o 2e + 20 µl de muestra bacteriana 3b, 3d o 3f

Strep uberis	t=0 h			t=6,5 h			18,5 h		
Inóculo ufc/ml	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	10 ⁷	10 ⁵	10 ³
Composición 2a	rosa	rosa	rosa	amarillo	amarillo	rosa	amarillo	amarillo	amarillo
Composición 2b	rojo	rojo	rojo	amarillo	amarillo	rojo	amarillo	amarillo	amarillo
Composición 2c	rojo	rojo	rojo	amarillo	amarillo	rojo	amarillo	amarillo	amarillo
Composición 2d	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	amarillo	rojo	rojo
Composición 2e	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo

Tabla 3: E. coli en 80 ul de McC/ 20 ul de leche; inóculo se refiere a ufc/ml en leche.

E. coli	t=0 h			t=5 h			t=16 h			t=24 h			t=48 h		
Inóculo ufc/ml	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁴
Composición 1	rojo	rojo	rojo	amarillo	rojo	rojo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo

Tabla 4a: E. coli en 80 ul de TSB/20 ul de leche; inóculo se refiere a ufc/ml en leche.

E-Coli	t=0 h			t=5 h			t=7 h			t=11,5 h			t=23,5 h		
Inóculo ufc/ml	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	10 ⁷	10 ⁵	10 ³
Composición 2d	rojo	rojo	rojo	amarillo	rojo	rojo	amarillo	amarillo	rojo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo
Composición 2e	rojo	rojo	rojo	amarillo	rojo	rojo	amarillo	amarillo	rojo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo

Tabla 4b: Staphylococcus aureus en 80 ul de TSB/20 ul de leche; inóculo se refiere a ufc/ml en leche.

Staph aureus	t=0 h			t=5 h			t=7 h			t=11,5 h			t=23,5 h		
Inóculo ufc/ml	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	10 ⁷	10 ⁵	10 ³
Composición 2d	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	amarillo	amarillo	rojo	amarillo	amarillo	amarillo

Composición 2e	rojo	rojo	rojo	naranja	rojo	rojo	naranja	rojo	rojo	amarillo	amarillo	rojo	amarillo	amarillo	amarillo
----------------	------	------	------	---------	------	------	---------	------	------	----------	----------	------	----------	----------	----------

Tabla 4c: Strep uberis en 80 ul de TSB/20 ul de leche; inóculo se refiere a ufc/ml en leche.

Strep uberis	t=0 h			t=6,5 h			18,5 h		
Inóculo ufc/ml	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	10 ⁷	10 ⁵	10 ³
Composición 2d	rojo	Rojo	rojo	amarillo	amarillo	naranja	amarillo	amarillo	amarillo
Composición 2e	rojo	Rojo	rojo	amarillo	amarillo	naranja	amarillo	amarillo	amarillo

Tabla 4d: Staphylococci epidermidis (estafilococo coagulasa negativo - CNS) en 80 ul de TSB/ 20ul de leche: inóculo se refiere a ufc/ml en leche.

Staph epidermidis	t=0 h			t~16 h			24 h		
Inóculo ufc/ml	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁴
Composición 2d	rojo	rojo	rojo	amarillo	amarillo	naranja	amarillo	amarillo	amarillo

Tabla 4e: Strep uberis en 80 ul de TSB/ 20 ul de leche con púrpura de bromocresol como indicador de pH; inóculo se refiere a ufc/ml en leche.

Strep uberis	t=0 h						
Inóculo ufc/ml	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
Composición 3	Morado	morado	morado	morado	morado	morado	morado
	t~16 h						
Composición 3	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo

Si se produce un cambio de color, éste se produce gradualmente y puede controlarse. El punto de partida del cambio de color depende del inóculo. Por tanto, una curva de cambio de color cinética puede determinarse a lo largo del tiempo y se calcula un inóculo inicial estimado.

En presencia de un agente estabilizador, se puede incluir rojo de fenol a una concentración de entre 35 ug/ml y 3000 ug/ml, entre 50 ug/ml y 1000 ug/ml, y en particular entre 100 ug/ml y 500 ug/ml en combinación con leche o leche en polvo como agente estabilizante.

Según los ejemplos de prueba de susceptibilidad a antibióticos descritos a continuación, la prueba se realizó usando muestras (clínicas) durante hasta 24 horas.

El agente estabilizante incluido en los ejemplos a continuación fue leche procesada (cabeza azul oscura) y, por tanto, poseía un color blanco.

La tabla 3 muestra E. coli en 80 ul de McC/ 20 ul de leche; inóculo se refiere a ufc/ml en leche. Tal como se esperaba, los resultados en la tabla 3 se alinean con la tabla 1.

La tabla 4a muestra E. coli en 80 ul de TSB/20 ul de leche; inóculo se refiere a ufc/ml en leche. Sorprendentemente, los resultados en la tabla 4a no muestran prácticamente ningún impacto de la concentración de rojo de fenol en cambio de color (excepto a las 7 h y un inóculo de 10³ ufc/ml). El cambio de color permaneció constante entre 11,5 h y 23,5 h, lo que es el periodo de tiempo crucial a pesar de la cantidad en exceso de rojo de fenol. Esto es inesperado si se compara con los datos de la tabla 2a y apunta al efecto estabilizador de la leche en la supresión del efecto inhibitor de concentraciones crecientes de rojo de fenol.

Sorprendentemente, los resultados de la tabla 4b no muestran inhibición de Staphylococcus aureus en presencia de diferentes concentraciones de rojo de fenol a las 23,5 h. Puntos de tiempo anteriores, unos pocos casos de concentración de rojo de fenol de 0,25 mg/ml y superiores muestran un ligero retraso de la respuesta del color. Una vez más, estos resultados son inesperados si se comparan con los datos de la tabla 2b.

De manera similar, la tabla 4c muestra que el crecimiento de Streptococcus uberis es independiente de la concentración de rojo fenol diferente. Una vez más, estos resultados son inesperados si se comparan con los datos de la tabla 2c.

Como se muestra en la tabla 4d, también se obtiene el mismo resultado para Staphylococcus epidermidis, una bacteria negativa para coagulasa.

Como se muestra en la tabla 4e, el exceso de concentración de púrpura de bromocresol no inhibe el crecimiento de *Streptococcus uberis* en todos los inóculos investigados. Curiosamente, las concentraciones típicas de púrpura de bromocresol en medios de enriquecimiento típicos como el caldo MacConkey son del orden de ~40 veces menores.

5 En conjunto y sorprendentemente, estos datos muestran que el efecto inhibitor del crecimiento observado utilizando concentraciones mayores de indicadores de pH basados en color puede suprimirse en presencia de un agente estabilizador, por ejemplo, la leche. En consecuencia, pueden utilizarse concentraciones mayores de indicadores de pH basados en el color para proporcionar una prueba colorimétrica robusta con el fin de evaluar la susceptibilidad de las bacterias a uno o más antimicrobianos.

10 Ejemplo 3: Identificación de estreptococos del grupo D en muestras clínicas (por motivos de comparación)

15 El agar de esculina o el caldo de esculina u otros medios de cultivo típicos que contienen esculina contienen esculina sola o en combinación con citrato férrico. Este medio puede usarse para el cultivo y la diferenciación de bacterias en función de su capacidad para hidrolizar la esculina. Las composiciones de ejemplo de agar o caldo de cultivo de acuerdo con la presente invención incluyen:

Agar de esculina

20 Composición por litro:

Agar	15,0 g
Hidrolizado pancreático de caseína	13,0 g
25 NaCl	5,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
30 Músculo cardíaco, sólidos de infusión	2,0 g
Esculina	1,0 g
Citrato férrico	0,5 g
35 Caldo de azida de esculina	
Composición por litro:	
40 Hidrolizado péptico de tejido animal	20,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
45 Sales biliares	10,0 g
Citrato de sodio	1,0 g
Esculina	1,0 g
50 Citrato de amonio férrico	0,5 g
Azida de sodio	0,25 g
pH final (a 25 °C)	7,2±0,2

55 Los estreptococos del grupo D, por ejemplo el *Streptococcus uberis*, hidrolizan la esculina en esculina y dextrosa, que reacciona con el citrato férrico produciendo un ennegrecimiento del medio de cultivo. La concentración típica de esculina presente en los medios de enriquecimiento es del 0,1 % y del 0,05 % para el citrato férrico. En el contexto de este ejemplo, el citrato férrico aquí significa citrato férrico de amonio pero se pueden usar otras formas.

60 Sin embargo, concentraciones más elevadas de esculina y/o citrato férrico pueden provocar la inhibición del crecimiento bacteriano. Para ilustrar estos puntos, se cultivaron estreptococos del grupo D, y en particular *Streptococcus uberis*, en caldo de soja tríptica en presencia de (i) 0,1 % de esculina y 0,05 % de citrato férrico, (ii) 1,0 % de esculina y 0,5 % de citrato férrico (iii) 2,0 % de esculina y 1,0 % de citrato férrico y (iv) 5,0 % de esculina y 2,5 % de citrato férrico. Brevemente, se dispersó y cultivó *Streptococcus uberis* en caldo de soja tríptico (TSB) y luego diluciones de 20 ul se mezclaron con 100 ul de TSB que contenía concentraciones de esculina y citrato férrico tal

65

ES 2 952 442 T3

como se muestra en la tabla 5 (en los inóculos de $\sim 10^6$ y $\sim 10^4$ ufc/ml). El color del medio inicial de Streptococcus uberis esculina/citrato férrico era amarillo transparente. El color se comprobó después de ~ 16 h y ~ 48 h. Los resultados se resumen en la tabla 5.

5 Tabla 5: Streptococcus uberis en medio de 100 ul de esculina/citrato férrico/TSB; 80 ul de TSB/esculina/citrato férrico + 20 ul de bacterias en TSB(2); inóculo se refiere a ufc/ml en TSB(2)

		10⁶ ufc/ml	10⁴ ufc/ml
10	esculina al 0,1 % + citrato férrico al 0,05 %	negro	negro
	esculina al 1 % + citrato férrico al 0,5 %	no negro	no negro
	esculina al 2 % + citrato férrico al 1 %	no negro	no negro
15	esculina al 5 % + citrato férrico al 2,5 %	no negro	no negro

20 Estos datos muestran que la inhibición del crecimiento de Streptococcus uberis se sitúa entre el 0,1 % de esculina y el 0,05 % de citrato férrico, y entre el 1,0 % de esculina y el 0,5 % de citrato férrico en medios de enriquecimiento que comprenden TSB.

25 Sin embargo, existe una limitación al utilizar el mismo enfoque en muestras clínicas, ya que éstas pueden adquirir un fuerte color de fondo causado por la infección (por ejemplo, infectadas por estreptococos del grupo D). En otras palabras, la detección de un precipitado negro/marrón producido por estreptococos del grupo D en presencia de esculina y citrato férrico puede quedar enmascarada por el color de fondo asociado a la muestra clínica.

30 Según los resultados presentados en la tabla 5, no es posible aumentar simplemente la concentración de esculina (es decir, $>1,0$ %) y citrato férrico (es decir, $>0,5$ %) en la muestra para aumentar la detección de un precipitado, debido al efecto o efectos inhibidores del crecimiento de estos analitos.

Sorprendentemente, el solicitante ha descubierto que la inclusión de un agente estabilizante (por ejemplo, leche) puede suprimir el efecto inhibitor del crecimiento de la esculina y citrato férrico a concentraciones significativamente mayores.

35 A modo de ilustración, el mismo experimento se realizó como anteriormente, solo esta vez usando muestras de leche clínicas obtenidas de un animal bovino sospechoso de estar infectado con mastitis.

40 Incluso para muestras de leche clínica que parecían “blancas”, el solicitante observó que la respuesta de color fue débil en comparación con el mismo resultado obtenido utilizando TSB que comprende concentraciones reducidas de esculina y citrato férrico (es decir, esculina al 0,1 % y citrato férrico al 0,05 %). A pesar de los intentos de obtener un resultado útil añadiendo a las muestras de leche Streptococcus uberis (datos no mostrados)

45 Sin embargo, el solicitante ha descubierto que en las muestras clínicas derivadas de la leche pueden utilizarse mayores cantidades de esculina y citrato férrico. Por ejemplo, a concentraciones de al menos 2 % de esculina y 1 % de citrato férrico, no se inhibe el crecimiento de Streptococcus uberis. Estos datos se presentan en la tabla 6, por referencia a la formación de un ennegrecimiento de los medios de cultivo (se refieren a la descripción de la química anterior). Contraste estos datos con los experimentos similares realizados en presencia de TSB (tabla 5).

50 En consecuencia, el solicitante ha descubierto sorprendentemente que un componente de la leche suprime las propiedades inhibitoras del crecimiento de la esculina y el citrato férrico, estabilizando así la formación de un ennegrecimiento del medio de cultivo en presencia de estreptococos del grupo D. La identificación de los estreptococos del grupo D es por tanto posible, incluso cuando la muestra clínica tiene asociado un color de fondo significativo.

55 Obsérvese que, en los experimentos anteriores, la muestra clínica analizada era leche obtenida de un animal bovino sospechoso de estar infectado por mastitis. Si se analizara una muestra clínica no láctea, sería necesaria la inclusión de un agente estabilizador (por ejemplo, leche en forma de líquido o polvo) para suprimir el efecto inhibitor del crecimiento de la esculina y el citrato férrico a las concentraciones más altas utilizadas según esta invención.

60 Tabla 6: Strep uberis en 100 ul de medio de esculina/citrato férrico/TSB + 20 ul de leche; inóculo se refiere a ufc/ml en leche

		10⁶ ufc/ml	10⁴ ufc/ml
65	esculina al 0,1 % + citrato férrico al 0,05 %	ligeramente gris	ligeramente gris
	esculina al 1 % +	negro	negro

	citrato férrico al 0,5 %		
	esculina al 2 % +		
	citrato férrico al 1 %	negro	negro
5	esculina al 5 % +		
	citrato férrico al 2,5 %	no negro	no negro

El color se comprobó después de ~16 h y ~48 h.

10 El solicitante descubrió además que TSB que contenía esculina al 0,5 % y citrato férrico al 0,25 % y 80 ul de muestra de leche de *Streptococcus uberis* enriquecida que también contenía una concentración de 100 ug/ml de aztreonam (antibiótico que tiene actividad contra muchas bacterias gram- como *E. coli*) y/o en combinación con 0,5 mg/ml de rojo de fenol conducía a cambios de color fácilmente detectables. No se detectó ninguna inhibición del *Streptococcus uberis* debida al rojo de fenol o al aztreonam.

15 Ejemplo 4: Identificación de estafilococos (diferenciación y selectividad) en muestras clínicas (por razones de comparación)

A menudo se desea diferenciar los estafilococos positivos para coagulasa de los negativos para coagulasa. Conocer el tipo de estafilococos de coagulasa puede influir en la decisión de tratamiento.

20 Tradicionalmente, la diferenciación entre estafilococos positivos y negativos para coagulasa se ha realizado con la prueba de la coagulasa en tubo, que detecta la estafilocoagulasa extracelular, o la prueba de la coagulasa en portaobjetos, que detecta el factor de aglutinación (coagulasa unida) presente en la superficie celular bacteriana.

25 Alternativamente, la prueba de látex BBL™ Staphyloslide™ es una prueba de aglutinación en portaobjetos de látex para la diferenciación de estafilococos que poseen factor de aglutinación y/o proteína A, normalmente presentes con *Staphylococcus aureus*, de estafilococos que no poseen estas propiedades.

30 La prueba de látex BBL™ Staphyloslide™ consiste en partículas de látex azul recubiertas con fibrinógeno humano e IgG. Al mezclar el reactivo de látex con colonias de estafilococos que contengan factor de aglutinación o proteína A, se producirá una reticulación que dará lugar a una aglutinación visible de las partículas de látex. Dicha aglutinación se producirá notablemente con *Staphylococcus aureus*. Si no están presentes ni el factor de aglutinación ni la proteína A, no se producirá aglutinación y el resultado se considerará negativo. Los aislados de estafilococos negativos para coagulasa y proteína A más frecuentes son los *Staphylococcus epidermidis*.

35 Estas pruebas de coagulasa (portaobjetos, tubo y partículas de látex) requieren el cultivo de muestras en placas de agar.

40 Caldo con sal de manitol (MSB; se refiere a un ejemplo del ejemplo 1) es un medio selectivo para el aislamiento de estafilococos presuntamente patógenos. La mayoría de las otras bacterias se inhiben por la alta concentración de cloruro de sodio.

45 MSB comprende peptona que proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. MSB, como sugiere el nombre, también comprende manitol que es la fuente de energía de hidratos de carbono. El cloruro de sodio suministra electrolitos esenciales para el transporte y el equilibrio osmótico. La degradación del manitol por bacterias produce productos de acidificación que pueden detectarse en presencia de un indicador de pH. En el caso del rojo de fenol, la producción de productos de acidificación provoca un cambio de color de rojo a amarillo. Esto se demuestra mediante los siguientes ensayos de inhibición del crecimiento realizados a 35 ±2 °C durante 18-24 horas y después de 48 horas:

50	Microorganismo	Crecimiento	Producción de ácido
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Inhibido	
	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	Inhibido	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Bueno	+
55	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Bueno	Ligeramente +/-

60 Se sabe que el *Staphylococcus epidermidis* produce ácido aeróbicamente a partir de glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa y glicerol, y entre el 70 y el 90 % de las cepas producen ácido aeróbicamente a partir de galactosa, manosa y lactosa. No se produce ningún ácido a partir del manitol, la trehalosa, la ramnosa, la xilosa o la arabinosa (Parisi (1985) *Microbiological Reviews* 49(2): 126-139).

65 También se sabe que los medios con sal de manitol pueden utilizarse para cultivar selectivamente estafilococos y pueden utilizarse para diferenciar entre estafilococos coagulasa positivos (*Staphylococcus aureus*) y estafilococos coagulasa negativos (SNC), como *Staphylococcus epidermidis*. El problema en el caso de la mastitis bovina es que la leche contiene lactosa (4-5 % de media) y por lo tanto los SNC son capaces de producir ácido en la MSB también, lo

que conduce al cambio de color amarillo. Por tanto, la diferenciación entre estafilococos positivos para coagulasa y negativos falla con el medio de sal de manitol para muestras de leche.

5 Alternativamente, el agar Baird Parker (véase el ejemplo 1 para una formulación de ejemplo) se utiliza para la detección y el recuento de *Staphylococcus aureus* en los alimentos. La selectividad del medio se debe a que el cloruro de litio y el telurito de potasio al 1 % suprimen el crecimiento de organismos distintos de los estafilococos. La diferenciación de los estafilococos coagulasa positivos se basa en telurita potásica y la emulsión de yema de huevo. Los estafilococos que contienen lecitinasa descomponen la yema de huevo dando lugar a la formación de zonas claras alrededor de las colonias. Puede formarse una zona opaca de precipitación debido a la actividad de la lipasa. La reducción de telurita de potasio es una característica de los estafilococos positivos para coagulasa y provoca el ennegrecimiento de las colonias. Agar es el agente solidificante.

El agar Baird Parker contiene ~1 % de telurita en solución. Los resultados de crecimiento esperados son los siguientes:

15	Microorganismo	ATCC	Crecimiento	Características
	<i>Escherichia coli</i>	25922	inhibido	
	<i>Bacillus subtilis</i>	6633	malo a regular	marrón
	<i>Proteus mirabilis</i>	25933	bueno	marrón
20	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	bueno	negro
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	14990	malo a bueno	negro

25 Estos datos demuestran que la diferenciación de estafilococos positivos para coagulasa y negativos no es fiable mediante el uso de agar Baird Parker.

Alternativamente, la base de caldo Giolitti-Cantoni se utiliza para enriquecer *Staphylococcus aureus* a partir de alimentos durante los procedimientos de aislamiento. El cloruro de litio inhibe los bacilos Gram negativos. La telurita de potasio en combinación con glicina inhibe bacterias Gram positivas distintas de estafilococos.

30 Se añaden 1,05 ml o 0,105 ml cuando se analizan productos cárnicos. Se añade solución de telurita al 1 % a 19 ml de caldo base Giolitti Cantoni (GC). Después, típicamente se añade 1 g o 1 ml de muestra a 19 ml de caldo de Giolitti/Telurita. Por lo tanto, la concentración de solución de telurita en GO es típicamente entre 5 % y 0,5 %. La concentración de muestra es de aproximadamente el 5 % en caldo Giolitti Cantoni.

35	ORGANISMOS	ATCC™	INÓCULO UFC	RECUPERACIÓN	ASPECTO
	<i>Escherichia coli</i>	25922	10 ³ -2x10 ³	Inhibición	Sin ennegrecimiento
	<i>Micrococcus luteus</i>	10240	10 ³ -2x10 ³	Inhibición	Sin ennegrecimiento
40	<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	10 ² -10 ³	Bueno	Negro
	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	10 ² -10 ³	Bueno	Negro

Resultados esperados

45 Los tubos de lectura para el ennegrecimiento del medio (una reacción positiva) o sin ennegrecimiento (una reacción negativa). Si se produce un ennegrecimiento, el subcultivo a agar Baird-Parker para confirmar, el aislamiento de *S. aureus*.

50 No hay indicios de cómo se comporta *Staph epidermidis* en caldo Giolitti/Cantoni/telurita. Cabe esperar que no difiera del caldo Baird Parker, ya que la recomendación es subcultivar en agar Baird Parker.

Ninguno de estos medios para estafilococos enumerados anteriormente ofrece por sí solo una solución deseada para obtener una diferenciación rápida y fácil de los estafilococos coagulasa positivos y negativos (*Staph aureus* frente a CNS).

55 Suele añadirse una solución de telurita de potasio al 1 % a

- Medios Baird Parker ~1 %
- 60 • Varía para Giolitti Cantoni entre 0,5 % y 5 %.

Definiciones para los experimentos con estafilococos:

65 negro significa sedimento negro acumulado en el fondo de un vial/pocillo.

ES 2 952 442 T3

SA: Staph aureus (positivo para coagulasa); SE: Staph epidermidis (negativo para coagulasa Solución de telurita al 1 % salvo indicación contraria)

Tabla 7: 81 µl de composición 5 + 20 µl de muestra bacteriana 5b, 5c, 5e, 5f, 5g o 5 h o 20 µl de muestra bacteriana 7b, 7c, 7e, 7f, 7g o 7 h o 20 µl de muestra bacteriana 8

Inóculo	t=0 h							
	10 ⁷	10 ^{6,5}	10 ⁶	10 ⁴	10 ³	10 ²	0 (sin bacterias)	10 ⁴ (sin telurita)
Staph aureus	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco
Staph epidermidis	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco
	t~16 h							
Staph aureus	negro	negro	negro	negro	negro	negro	blanco	blanco
Staph epidermidis	negro	negro	negro	gris	gris	blanco	blanco	blanco
	t~48 h							
Staph aureus	negro	negro	negro	negro	negro	negro	blanco	blanco
Staph epidermidis	negro	negro	negro	negro	negro	negro	blanco	blanco

Tabla 8: 81 µl de composición 6 u 86 µl de composición 7 + 20 µl de muestra bacteriana 5a, 5c, 5e o 5g o 20 µl de muestra bacteriana 7a, 7c, 7e o 7g

Inóculo	t=0 h							
	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁴	10 ²	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁴	10 ²
	Comp. 6	Comp. 6	Comp. 6	Comp. 6	Comp. 7	Comp. 7	Comp. 7	Comp. 7
Staph aureus	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco
Staph epidermidis	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco
	t~16 h							
Staph aureus	negro	negro	negro	negro	negro	negro	negro	negro
Staph epidermidis	negro	negro	negro	blanco	negro	negro	blanco	blanco
	t~24 h							
Staph aureus	negro	negro	negro	negro	negro	negro	negro	negro
Staph epidermidis	negro	negro	negro	negro	negro	negro	negro	blanco
	t~48 h							
Staph aureus	negro	negro	negro	negro	negro	negro	negro	negro
Staph epidermidis	negro	negro	negro	negro	negro	negro	negro	negro

Los resultados de la tabla 7 demuestran que los estafilococos positivos para coagulasa forman sedimentos negros después de la incubación. Esto no es inesperado considerando el conocimiento de la técnica.

Los resultados de la tabla 8 muestran el efecto de aumentar la concentración de la solución de telurita (1 % o 10 %). El caldo Giolitti Cantoni (GO) y la muestra bacteriana se mezclaron al 50/50. Ni siquiera una solución de telurita al 10 % pudo suprimir el ennegrecimiento de los medios por estafilococos coagulasa negativos (SE).

Por lo general, los medios GC se utilizan para alimentos y su aplicación a muestras clínicas para distinguir entre coagulasa positiva y negativa no es evidente.

A pesar de los conocimientos anteriores, se descubrió sorprendentemente que telurita puede utilizarse para diferenciar los estafilococos positivos y negativos para coagulasa.

Se identificaron tres medios capaces de diferenciar los estafilococos positivos para coagulasa (*Staphylococcus aureus*) y los estafilococos negativos para coagulasa (*Staphylococcus epidermidis*) si el inóculo no es superior a 10⁷ ufc/ml. Se consiguió un enriquecimiento de *Staphylococcus aureus* y al mismo tiempo se suprimió *Staphylococcus epidermidis*:

1. Giolitti Cantoni + solución de telurita + muestra bacteriana (80ul + 10ul + 20ul)

2. Caldo con sal de manitol + solución de telurita + muestra bacteriana (80ul + 1ul + 20ul)

5 3. Caldo de soja tríptico + cantidad en exceso de rojo de fenol + 3-6ul de solución de telurita. Se consiguió el enriquecimiento de Staph epidermidis con cambio de color.

4. Caldo con sal de manitol + muestra de leche bacteriana (80ul + 20ul), en principio cualquier fuente de hidratos de carbono, como la lactosa, a partir de la cual el Staph epidermidis pueda producir ácido.

10 Combinaciones novedosas (2 viales/pocillos)

- 1 + 4;

15 - 2 + 4;

- 3 + 4;

Ejemplos (por motivos de comparación)

20 Caldo Giolitti Cantoni telurita

25 Sorprendentemente, se descubrió que si el caldo Giolitti Cantoni, la solución de telurita y la muestra bacteriana se mezclan en partes 8:1:2, es posible diferenciar los estafilococos coagulasa positivos y negativos (para un inóculo igual o inferior a 10^7 ufc/ml en la muestra bacteriana) (tablas 9 y 10). Este medio o un medio similar permite la identificación de estafilococos coagulasa positivos (por ejemplo, Staph aureus) y suprime los estafilococos negativos para coagulasa (CNS). Las muestras bacterianas clínicas contienen habitualmente menos de 10^8 ufc/ml.

30 Si se produce un ennegrecimiento, entonces la cantidad de sedimento negro aumenta gradualmente con el tiempo y el tiempo de inicio del sedimento de negro notable depende del inóculo y junto con una calibración (aparición de sedimento negro en exceso), es posible una estimación del inóculo inicial en la muestra clínica.

Tabla 9: estafilococos; Solución de telurita combinada con GC; 80 ul de medios + 10 ul de sol. de tel. + 20 ul de bacterias en leche

35

Inóculo				t=0 h			
ufc/ml	10^8	10^7	10^6	10^4	10^3	10^2	0 (sin bacterias)
SA	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco
SE	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco
				t~16 h			
SA	negro	negro	negro	negro	negro	blanco	blanco
SE	negro	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco
				t~24 h			
SA	negro	negro	negro	negro	negro	blanco	blanco
SE	negro	gris	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco

40

45

Tabla 10: estafilococos; Solución de telurita combinada con GC; 80 ul de medios + 10 ul de sol. de tel. + 20 ul de bacterias en leche

50

Inóculo				t=0 h			
ufc/ml	10^7	$10^{6,5}$	10^6	10^4	10^3	10^2	0 (sin bacterias)
SA	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco
SE	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco
				t~16 h			
SA	negro	negro	negro	negro	negro	gris	blanco
SE	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco
				t~48 h			
SA	negro	negro	negro	negro	negro	negro	blanco
SE	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco

55

60

Caldo con sal de manitol/telurita

65

Tabla 11: estafilococos; Solución de telurita combinada con MSB; 80 ul de medios + 6 ul de sol. de tel. (0,1 %) + 20 ul de bacterias en la leche

Inóculo				t=0 h				
ufc/ml	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁴	10 ³	10 ²	0 (sin bacterias)	
5	SA	rosa	rosa	rosa	rosa	rosa	rosa	
	SE	rosa	rosa	rosa	rosa	rosa	rosa	
				t~16 h				
	SA	negro/y	negro/y	negro/y	negro/o	gris/p	rosa	
10	SE	negro/y	negro/y	rosa	rosa	rosa	rosa	
				t~24 h				
	SA	negro/y	negro/y	negro/y	negro/y	negro/o	negro/p	
15	SE	negro/y	negro/y	gris/o	rosa	rosa	rosa	

Tabla 12: estafilococos; Solución de telurita combinada con MSB; 80 ul de medios + 1 ul de sol. de tel. + 20 ul de bacterias en leche

Inóculo				t=0 h			sin telurita
ufc/ml	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁴	10 ³	10 ²	0 (sin bacterias)	10 ⁴
20	SA	rosa	rosa	rosa	rosa	rosa	rosa
	SE	rosa	rosa	rosa	rosa	rosa	rosa
				t~16 h			
25	SA	negro/y	negro/y	gris/o	rosa	rosa	amarillo
	SE	negro/y	rosa	rosa	rosa	rosa	amarillo
				t~24 h			
	SA	negro/y	negro/y	negro/y	negro/y	rosa	amarillo
30	SE	negro/y	rosa	rosa	rosa	rosa	amarillo

Tabla 13: estafilococos; solución de telurita al 1 % en MSB; 40 ul de medio + 40 ul de H2O + 1 ul de sol. de tel. + 20 ul de bacterias en leche

Inóculo				t=0 h		sin telurita
ufc/ml	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁴	10 ³	10 ²	sin bacterias
35	SA	rosa	rosa	rosa	rosa	rosa
	SE	rosa	rosa	rosa	rosa	rosa
				t~16 h		
40	SA	negro/y	negro/y	negro/y	gris/p	rosa
	SE	negro/y	rosa	rosa	rosa	rosa
				t~24 h		
45	SA	negro/y	negro/y	negro/y	negro/y	rosa
	SE	negro/y	rosa	rosa	rosa	rosa

Negro/y= sedimento negro con medio amarillo

Negro/y= sedimento negro con medio naranja

Negro/y= sedimento negro con medio rosa

50 Gris/o= sedimento gris con medio naranja

Negro/y= sedimento gris con medio amarillo

Tabla 14: Staph epidermidis; Caldo con sal de manitol +/- 1,25 % de lactosa

Inóculo	t=0 h	t~16 h
ufc/ml	MSB	MSB +
		MSB +
		1,25 % de lactosa
55	10 ⁶	Rosa
60		Rosa
		Amarillo

60 Sorprendentemente, se descubrió que incluso ~ 1 ul de telurita en MSB o mezcla MSB/H2O suprime el enriquecimiento de Staph epidermidis si el inóculo está entre 10⁸ y 10⁶ ufc/ml o menos durante un periodo de al menos 24 h. Si no hay telurita presente, entonces se produce enriquecimiento de Staph epidermidis y, por tanto, el cambio de color (lactosa está presente en la leche) (control). Staph aureus se enriqueció en presencia de una solución de telurita al 1 % y dio lugar a un sedimento negro. Esta es una forma novedosa de identificar estafilococos positivos para coagulasa.

65

ES 2 952 442 T3

Incluso una solución de telurita de 0,6ul proporciona resultados razonables, pero está muy al límite. Se prefiere la solución de ~1 ul de telurita.

5 Si hay leche que contenga lactosa, o lactosa pura u otras fuentes de hidratos de carbono que permitan al Staph epidermidis producir ácido, se produce un enriquecimiento con cambio de color. Esto se desea en mi caso. En consecuencia, la reivindicación debe incluir también una combinación de pocillos en la que el pocillo 1 contenga al menos MSB/solución de telurito y muestra de bacterias y el pocillo 2 contenga MSB/leche y/o lactosa y/u otras fuentes de carbohidratos, que permita el ácido coagulasa negativo de estafilococos productores, y muestra de bacterias. Esta combinación de pocillos permite identificar la coagulasa positiva o negativa de una muestra clínica.

También es posible estimar el inóculo inicial. Mismo principio que el descrito en la sección GC.

Caldo de soja tríptico/Rojo de fenol / Caldo de telurita

15 Tabla 15: estafilococos; Solución de telurita combinada con TSB/ 0,25 mg/ml de rojo de fenol; 80 ul de medios + 3 ul de sol. de tel. + 20 ul de bacterias en leche

Inóculo				t=0 h				
ufc/ml	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁴	10 ³	10 ²	0 (sin bacterias)	
SA	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	
SE	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	
				t~16 h				
SA	negro/y	negro/y	negro/y	negro/o	negro/r	rojo	rojo	
SE	negro/o	gris/o	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	
				t~24 h				
SA	negro/y	negro/y	negro/y	negro/y	negro/y	negro/o	rojo	
SE	negro/y	negro/y	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	

30 Tabla 16: estafilococos; Solución de telurita combinada con Tsb +0,125 mg/ml de rojo de fenol; 80 ul de medios + 1 ul de sol. de tel. + 20 ul de bacterias en leche

Inóculo				t=0 h			sin telurita
ufc/ml	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁴	10 ³	10 ²	0 (sin bacterias)	10 ⁴
SA	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
SE	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
				t~16 h			
SA	negro/y	negro/y	negro/o	rojo	rojo	rojo	amarillo
SE	negro/o	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	amarillo
				t~24 h			
SA	negro/y	negro/y	negro/y	negro/o	negro/r	rojo	amarillo
SE	negro/y	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	amarillo
				t~48 h			
SE	negro/y	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	amarillo

50 Tabla 17: estafilococos; Solución de telurita combinada con TSB + 0,25 mg/ml de rojo de fenol; 80 ul de medios + 6 ul de sol. de tel. + 20 ul de bacterias en leche

Inóculo				t=0 h			sin telurita
ufc/ml	10 ⁷	10 ^{6,5}	10 ⁶	10 ⁴	10 ³	10 ²	0 (sin bacterias) 10 ⁴ (control)
SA	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
SE	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
				t~16 h			
SA	negro/y	negro/y	negro/y	negro/o	negro/r	rojo	amarillo
St	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	naranja
				t~48 h			
SA	negro/y	negro/y	negro/y	negro/y	negro/y	negro/o	amarillo
SE	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	blanco

Sorprendentemente, se descubrió que la combinación de TSB y una cantidad excesiva de rojo de fenol, por ejemplo 0,125 mg/ml o más, en combinación con 3ul o 6ul de solución de telurita es capaz de suprimir el enriquecimiento de Staph epidermidis (CNS) hasta 48 h de tiempo de cultivo, pero al mismo tiempo enriquece Staph aureus, lo que conduce a un sedimento negro con cambio de color.

También es posible estimar el inóculo inicial.

Ejemplo 5: Identificación de bacterias (por razones de comparación)

Abreviaturas para las tablas 18 y 19:

GC10 %T

80 ul de caldo base Giolitti Cantoni + 10 ul de solución de telurita +20 ul de bacterias en la leche

MSB

80 ul de caldo con sal de manitol +20ul de bacterias de la leche

TSB/Fer/FerCit

80 ul de caldo de soja tríptico con 0,25 % de esculina y 0,125 % de citrato férrico de amonio +20 ul de bacterias en la leche

McC/PR0,25 mg/ml

80 ul de caldo MacConkey (concentración única) con 0,025 % de rojo de fenol +20 ul de bacterias en la leche

TSB/PR0,25 mg/ml

80 ul de caldo de soja tríptico que contiene 0,025 % de rojo de fenol+20 ul de bacterias en la leche

TSB/PR0,125 mg/ml

80 ul de caldo de soja tríptico que contiene 0,0125 % de rojo de fenol+20 ul de bacterias en la leche

TSB/PR0,05 mg/ml

80 ul de caldo de soja tríptico que contiene 0,005 % de rojo de fenol+20 ul de bacterias en la leche

Negro/w

sedimento negro y medio blanco

Negro/y

sedimento negro y medio amarillo

Gris/p

sedimento gris y medio rosa

Las bacterias en la leche fueron 10^4 ufc/ml y 10^6 ufc/ml. Las tablas 18 y 19 muestran el color de cada pocillo a la incubación $t=0$ horas y $t=24$ horas. GC10 %T es el medio selectivo y diferencial para estafilococos positivos para coagulasa (Staphylococcus aureus). Sólo Staphylococcus aureus en ambas concentraciones de bacterias mostró sedimento negro. Todas las demás bacterias en GC10 %T (Staphylococcus epidermidis, Escherichia coli y Streptococcus uberis) no presentaron sedimento negro. MSB es el medio selectivo para estafilococos. Tanto los medios de Staphylococcus aureus como Staphylococcus epidermidis cambiaron de color a amarillo a $t=24$ horas. Los medios de E. Coli y Streptococcus uberis permanecieron con un color rosa. La combinación de GC10 %T y MSB permite distinguir entre estafilococos coagulasa positivos y negativos si una de las bacterias está presente en la muestra clínica. Si GC10 %T es blanco sin sedimento negro pero MSB es amarillo entonces la muestra clínica contiene estafilococos coagulasa negativos. Si GC10 %T tiene un sedimento negro y MSB es amarillo entonces la muestra clínica contiene estafilococos positivos para coagulasa. TSB/Esc/FerCit es el medio selectivo para los estreptococos del grupo D al que pertenecen los Streptococcus uberis. Sólo el Streptococcus uberis ennegreció este medio al cabo de 24 horas. Todas las demás bacterias investigadas (Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, E. coli)

no cambiaron el color del medio para estreptococos del grupo D a las t=24 horas. McC/PR0,25 mg/ml es el medio selectivo para bacterias coliformes. Solo E. coli cambió el color del medio a t = 24 horas. Todas las demás bacterias investigadas (Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus uberis) no cambiaron el color del medio de enriquecimiento con coliformes a las t=24 horas. Los medios de enriquecimiento general TSB/PR0,25 mg/ml, TSB/PR0,125 mg/ml y TSB/PF0,05 mg/ml cambiaron de color a las t=24 horas para las cuatro bacterias investigadas.

Esta combinación de medios generales, selectivos y diferenciales permite la identificación de bacterias del grupo D estreptococos, estafilococos coagulasa positivos y negativos y bacterias coliformes, así como de cualquier otra bacteria (no identificada).

Tabla 18: 80 µl de composición 2b, 2c, 2d, 8, 11 o 19 + 20 µl de muestra bacteriana 5c o 5e o 20 µl de muestra bacteriana 7c o 7e

Inóculo / ufc/ml	t=0 h				t=24 h			
	10 ⁴		10 ⁶		10 ⁴		10 ⁶	
	5e (SA)	7e (SE)	5c(SA)	7e(SE)	5e (SA)	7e (SE)	5c(SA)	7e (SE)
Composición 8	blanco	Blanco	blanco	blanco	negro/w	blanco	negro/w	blanco
Composición 11	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo
Composición 18	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
Composición 19	rojo	Rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
Composición 2d	rojo	Rojo	rojo	rojo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo
Composición 2c	-	-	rojo	rojo	-	-	amarillo	amarillo
Composición 2b	-	-	rojo	rojo	-	-	amarillo	amarillo

Tabla 19: 80 µl de composición 2b, 2c, 2d, 8, 11 o 19 + 20 µl de muestra bacteriana 4c o 4e o 20 µl de muestra bacteriana 6c o 6e

Inóculo / ufc/ml	t=0 h				t=24 h			
	10 ⁴		10 ⁶		10 ⁴		10 ⁶	
	6e (SU)	4e (EC)	6c (SU)	4c (EC)	6e (SU)	4e (EC)	6c (SU)	4c (EC)
Composición 8	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco
Composición 11	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa	rosa	rosa	rosa	rosa
Composición 18	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	negro	blanco	negro	blanco
Composición 19	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	amarillo	rojo	amarillo
Composición 2d	rojo	rojo	rojo	rojo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo
Composición 2c	-	-	rojo	rojo	-	-	amarillo	amarillo
Composición 2b	-	-	rojo	rojo	-	-	amarillo	amarillo

Abreviaturas para la tabla 20:

GC5,25 %T

80 ul de caldo base Giolitti Cantoni + 5,25 ul de solución de telurita +20 ul de bacterias en la leche

MSB2-0,5 %T

60 ul de MSB + 5,25 ul de telurita (0,1 %) + 5 ul de LiCl + 1,2 ul de glicina + 8,55 ul de H2O +20 ul de bacterias en la leche

TSB/Fer/FerCit2

80 ul de caldo de soja tréptico con 0,5 % de esculina y 0,25 % de citrato férrico de amonio +20 ul de bacterias en la leche

McCCLXPR0,2 mg/ml

80 ul de caldo MacConkey (concentración única) con 0,02 % de rojo de fenol y 1 % de cloxacilina como sodio +20 ul de bacterias en la leche

TSB/PR0,2 mg/ml

80 ul de caldo de soja tréptico que contiene 0,02 % de rojo de fenol+20 ul de bacterias en la leche

La incubación de Streptococci agalactiae (estreptococos del grupo B) no cambia el color de los medios de enriquecimiento selectivos o diferenciales investigados (GC5,25 %T, MSB2-0,5 %T, TSB/Esc/FerCit2/McCCLXPR0,2 mg/ml) tras 24 horas de incubación. Sólo el medio de enriquecimiento general (TSB/PR0,2 mg/ml) se volvió amarillo tras 24 horas de incubación.

Tabla 20: 80 µl de composición 20, 21, 22, 23 o 24 + 20 µl de muestra bacteriana 6c o 20 µl de muestra bacteriana 9a o 9b

Inóculo / ufc/ml	t=0 h				t~16 h			
	10^3		10^6		10^3		10^6	
	9a (SAg)	-	9b (SAg)	6c (SU)	9a (SAg)	-	9b (SAg)	6c (SU)
Composición 20	blanco	-	blanco	blanco	blanco	-	blanco	blanco
Composición 21	Rosa	-	Rosa	Rosa	rosa	-	rosa	rosa
Composición 22	blanco	-	blanco	blanco	Blanco	-	Blanco	negro
Composición 23	rojo	-	rojo	rojo	rojo	-	rojo	rojo
Composición 24	rojo	-	rojo	rojo	amarillo	-	amarillo	amarillo

Ejemplo 6: Identificación combinada de bacterias y prueba de susceptibilidad antimicrobiana (ejemplos distintos de los que comprenden rojo fenol en la mezcla de reacción a entre 0,0035 % y 0,30 % en combinación con el agente estabilizante no forman parte de la invención)

Una clínica veterinaria de South Island (Nueva Zelanda) recogió muestras de leche de casos clínicos de mastitis bovina. Las muestras se almacenaron en el congelador durante varios meses y se enviaron congeladas al centro de pruebas. En este ejemplo, el término “clínico” significa que las vacas lecheras tenían síntomas clínicos de una infección de ubre, por ejemplo, la vaca se comportaba de forma inusual, coágulos de leche, ubre hinchada entre otros síntomas clínicos. Las pruebas se realizaron en una placa de micropocillos de 24 pocillos (3x8 pocillos).

1. Configuración de placa n.º 1

El volumen líquido de los medios de enriquecimiento para cada pocillo figura en la tabla 21. Además, se añadieron 20 µl de muestra de mastitis clínica a cada pocillo con una pipeta de laboratorio.

Tabla 21: Configuración de placa n.º 1; Fármacos: Bencilpenicilina como potasio; Cloxacilina como sodio; Ceftiofur como clorhidrato; La concentración de fármaco en cada pocillo (A3 a C8) se basa en 80 µl de composición + 10 µl de solución de fármaco + 20 µl de muestra de leche de mastitis clínica y equivale a la concentración de fármaco indicada en µg/ml; Se añadieron 20µl de muestra de leche de mastitis bovina clínica a cada pocillo (A1 a C8).

pocillo	A	B	C	Concentración de fármaco
1	86 µl de composición 8	80 µl de composición 18	80 µl de composición 2c	pg/ml (libre de)
2	80 µl de composición 11	90 µl de composición 25	80 µl de composición 1	
3	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	4 µg/ml (pocillos: A3-C3)
4	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	2 µg/ml (pocillos: A4-C4)
5	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	1 µg/ml (pocillos: A5-C5)
6	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	0,5 µg/ml (pocillos: A6-C6)
7	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	0,1 µg/ml (pocillos: A7-C7)
8	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	0,05 µg/ml (pocillos: A8-C8)
	Bencilpenicilina	Ceftiofur	Cloxacilina	

Tabla 22: Color del medio en cada pocillo antes de la incubación a 0 horas (Tabla 21, Configuración de la placa n° 1) para los números de identificación (ID) 1, 2, 3 y 4 de las muestras de mastitis bovina clínica

5 **ID**
1 a 4 **T = 0 h**

	A	B	C
1	blanco	blanco	rojo
2	rosa	blanco	rojo
3	rojo	rojo	rojo
4	rojo	rojo	rojo
5	rojo	rojo	rojo
6	rojo	rojo	rojo
7	rojo	rojo	rojo
8	rojo	rojo	rojo

Tabla 23: Color del medio en cada pocillo después de 22 horas de incubación a 37 °C (tabla 21, configuración de la placa n.º 1) para el número de identificación de la muestra de mastitis bovina clínica: ID 1

20 **T=22 h**

ID 1	A	B	C
1	blanco	negro	amarillo
2	rosa	negro	rojo
3	rojo	rojo	rojo
4	rojo	rojo	rojo
5	rojo	rojo	rojo
6	rojo	rojo	rojo
7	rojo	amarillo	amarillo
8	naranja	amarillo	amarillo

Tabla 24: Color del medio en cada pocillo después de 22 horas de incubación a 37 °C (tabla 21, configuración de la placa n.º 1) para el número de identificación de la muestra de mastitis bovina clínica: ID 2

35 **T=22 h**

ID 2	A	B	C
1	blanco	negro	amarillo
2	rosa	blanco	rojo
3	naranja	rojo	rojo
4	naranja	rojo	rojo
5	naranja	rojo	rojo
6	amarillo	naranja	rojo
7	amarillo	amarillo	amarillo
8	amarillo	amarillo	amarillo

Tabla 25: Color del medio en cada pocillo después de 48 horas de incubación a 37 °C (tabla 21, configuración de la placa n.º 1) para el número de identificación de la muestra de mastitis bovina clínica: ID 2

40 **T=48 h**

ID 2	A	B	C
1	negro/w	negro	amarillo
2	amarillo	blanco	rojo
3	amarillo	rojo	rojo
4	amarillo	rojo	rojo
5	amarillo	rojo	rojo
6	amarillo	amarillo	rojo

7	amarillo	amarillo	amarillo
8	amarillo	amarillo	amarillo

Tabla 26: Color del medio en cada pocillo después de 22 horas de incubación a 37 °C (tabla 21, configuración de la placa n.º 1) para el número de identificación de la muestra de mastitis bovina clínica: ID 3

T=22 h

ID 3	A	B	C
1	blanco	blanco	amarillo
2	rosa	blanco	amarillo
3	amarillo	rojo	amarillo
4	amarillo	rojo	amarillo
5	amarillo	rojo	rojo
6	amarillo	amarillo	rojo
7	amarillo	amarillo	amarillo
8	amarillo	rojo	amarillo

Tabla 27: Color del medio en cada pocillo después de 22 horas de incubación a 37 °C (tabla 21, configuración de la placa n.º 1) para el número de identificación de la muestra de mastitis bovina clínica: ID 4

T=22 h

ID 4	A	B	C
1	negro/w	blanco	amarillo
2	amarillo	blanco	rojo
3	amarillo	rojo	rojo
4	naranja	rojo	rojo
5	naranja	rojo	rojo
6	amarillo	naranja	rojo
7	amarillo	amarillo	amarillo
8	amarillo	amarillo	amarillo

Abreviaturas

- 80 ul de GC +10 ul de tel.: 80 ul de caldo base Giolitti Cantoni + 10 ul de solución de telurita (1 %);
- 80 ul de TSB/Esc/Fer Cit: 80 ul de caldo de soja tríptico con 0,25 % de esculina y 0,125 % de citrato férrico de amonio;
- 80 ul de TSB/Esc/Fer Cit + 10 ul de Genta: 80 ul de caldo de soja tríptico que contiene 0,25 % de esculina y 0,125 % de citrato férrico de amonio +10 ul de solución de gentamicina 10 mg/ml;
- 80ul de McC/PR25: 80 ul de caldo MacConkey (concentración única) con 0,0125 % de rojo de fenol; y
- 80 ul de TSB/PR25: 80 ul de caldo de soja Tryptic con 0,0125 % de rojo de fenol.

Identificación de bacterias

Las columnas A a C y las filas 1 y 2 se usaron para la identificación de bacterias. A1: estafilococo positivo para coagulasa; A2: estafilococos; B1: estreptococo del grupo D; B2: estreptococo del grupo D; C1: medios de enriquecimiento generales (bacterias Gram+ y Gram-); C2: bacterias coliformes.

Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

Columna A3 a A8: dilución en serie de bencilpenicilina como potasio. Columna B3 a B8: dilución en serie de ceftiofur como clorhidrato. Columna C3 a C8: dilución en serie de cloxacilina como sodio. Concentraciones de antibiótico se indican como forma libre que varían entre 4 ug/ml y 0,05 ug/ml.

La concentración de sustancia inhibitoria mínima (CIM) se define aquí como la concentración si se produce un cambio de color entre dos pocillos (un pocillo permanece rojo con la concentración 1 de fármaco, el otro amarillo con la

concentración de fármaco 2, mientras que la concentración de fármaco 1 es mayor que la concentración de fármaco 2) entonces la CIM es el valor de la concentración de fármaco 1.

5 La tabla 21 indica la configuración de la placa de micropocillos n.º 1; Fármacos: Bencilpenicilina como potasio; Cloxacilina como sodio; Ceftiofur como clorhidrato; La concentración de fármaco en cada pocillo (A3 a C8) se basa en 80 µl de composición + 10 µl de solución de fármaco + 20 µl de muestra de leche de mastitis clínica y equivale a la concentración de fármaco indicada en µg/ml; Se añadieron 20ul de muestra de leche de mastitis bovina clínica a cada pocillo (A1 a C8).

10 La tabla 22 indica el color del medio de enriquecimiento en cada pocillo después de la adición de la muestra de mastitis clínica en cada pocillo antes de la incubación (t=0 horas) para las muestras ID 1,2,3,4 (referencia).

15 La tabla 23 muestra los colores de cada medio de enriquecimiento para el ID de muestra 1 después de la incubación a 37 °C durante 22 horas. El medio de enriquecimiento en el pocillo B1 y B2 se volvió negro y C1 se volvió amarillo. Sin cambio de color en el pocillo A1, A2, C2. Por tanto, esta muestra clínica contiene estreptococos del grupo D. Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana muestran la CIM para la bencilpenicilina 0,1 ug/ml, ceftiour y cioxacilina 0,5 ug/ml.

20 La tabla 24 muestra los colores de cada medio de enriquecimiento para la muestra ID 2 después de la incubación a 37 °C durante 22 horas. El medio de enriquecimiento en el pocillo B1 se volvió negro y C1 se volvió amarillo. Sin cambio de color en el pocillo A1, A2, B2, C2. Por tanto, esta muestra clínica contiene estreptococos del grupo D. Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana muestran la CIM para la bencilpenicilina >4 ug/ml, ceftiour 1 ug/ml y cloxacilina 0,5 ug/ml. La tabla 25 muestra los colores de cada medio de enriquecimiento para el ID de muestra 2 después de la incubación a 37 °C durante 48 horas. El pocillo B2 permaneció negro y el pocillo A1 tenía un sedimento de color negro y A2 se volvió amarillo. Por tanto, esta muestra también tiene un estafilococo positivo para coagulasa. Existe la posibilidad de que este estafilococo sea un estafilococo productor de betalactamasa, ya que la bencilpenicilina no es susceptible a concentraciones de fármaco de al menos hasta 4ug/ml.

30 La tabla 26 muestra los colores de cada medio de enriquecimiento para la muestra ID 3 después de la incubación a 37 °C durante 22 horas. El medio de enriquecimiento en el pocillo C1 y C2 se volvió amarillo. Sin cambio de color en el pocillo A1, A2, B1, B2. Por tanto, esta muestra clínica contiene bacterias coliformes. La prueba de susceptibilidad antimicrobiana muestra la CIM para la penicilina y la cloxacilina >4 ug/ml y ceftiofur 1 ug/ml.

35 La tabla 27 muestra los colores de cada medio de enriquecimiento para la muestra ID 4 después de la incubación a 37 °C durante 22 horas. El medio de enriquecimiento en el pocillo A1 tenía un sedimento de color negro y A2, C1 se volvieron amarillos. Sin cambio de color en el pocillo B1, B2, C2. Por tanto, esta muestra clínica contiene estafilococo positivo para coagulasa. Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana muestran una CIM para bencilpenicilina >4ug/ml, ceftiofur 1ug/ml y cioxacilina 0,5ug/ml. Existe la posibilidad de que este estafilococo sea un estafilococo productor de betalactamasa, ya que la bencilpenicilina no es susceptible a concentraciones de fármaco de al menos hasta 4ug/ml.

40 2. Configuración de placa n.º 2

45 El volumen líquido de los medios de enriquecimiento para cada pocillo figura en la tabla 28. Además, cada pocillo recibió una gota de muestra clínica de una pipeta de transferencia, que era por término medio de unos 35 mg. Esto se determinó pesando la placa de pocillos antes y después de añadir las muestras clínicas de mastitis. Este peso se dividió entonces en 24.

50 Abreviaturas

1. 80 ul de GC +10 ul de tel.: 80 ul de caldo base Giolitti Cantoni + 10 ul de solución de telurita (1 %);
2. 80 ul de TSB/Esc/Fer Cit: 80 ul de caldo de soja tríptico con 0,25 % de esculina y 0,125 % de citrato férrico de amonio;
- 55 3. 80 ul de TSB/Esc/Fer Cit + 10 ul de Genta: 80 ul de caldo de soja tríptico que contiene 0,25 % de esculina y 0,125 % de citrato férrico de amonio +10 ul de solución de gentamicina 10 mg/ml;
4. 80ul de McC/PR25: 80 ul de caldo MacConkey (concentración única) con 0,0125 % de rojo de fenol; y
- 60 5. 80 ul de TSB/PR25: 80 ul de caldo de soja Tryptic con 0,0125 % de rojo de fenol.

65 Tabla 28: Configuración de placa n.º 2; Fármacos: Bencilpenicilina como potasio; Cloxacilina como sodio; Ceftiofur como clorhidrato; La concentración de fármaco en cada pocillo (A3 a C8) se basa en 80 µl de composición + 10 µl de solución de fármaco + 20 µl de muestra de leche de mastitis clínica y equivale a la concentración de fármaco indicada en µg/ml; Se añadieron 20ul de muestra de leche de mastitis bovina clínica a cada pocillo (A1 a C8).

pocillo	A	B	C	Concentración de fármaco
1	110 µl de composición 8	100 µl de composición 18	100 µl de composición 2c	µg/ml (libre de)
2	100 µl de composición 11 + 10 µl de solución de fármaco		100 µl de composición 1	
3	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	4 µg/ml (pocillos: A3-C3)
4	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	2 µg/ml (pocillos: A4-C4)
5	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	1 µg/ml (pocillos: A5-C5)
6	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	0,5 µg/ml (pocillos: A6-C6)
7	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	0,1 µg/ml (pocillos: A7-C7)
8	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	80 µl de composición 2c + 10 µl de solución de fármaco	0,05 µg/ml (pocillos: A8-C8)
	Bencilpenicilina	Ceftiofur	Cloxacilina	

Tabla 29: Color del medio en cada pocillo antes de la incubación a 0 horas (Tabla 28, Configuración de la placa n° 2) para los números de identificación (ID) 5, 6, 7 y 8 de las muestras de mastitis bovina clínica

ID 5 a 8 T=0 h

	A	B	C
1	blanco	blanco	rojo
2	rosa	-	rojo
3	rojo	rojo	rojo
4	rojo	rojo	rojo
5	rojo	rojo	rojo
6	rojo	rojo	rojo
7	rojo	rojo	rojo
8	rojo	rojo	rojo

Tabla 30: Color del medio en cada pocillo después de 23 horas de incubación a 37 °C (tabla 28, configuración de la placa n.º 2) para el número de identificación de la muestra de mastitis bovina clínica: ID 5

T=23 h

ID 5	A	B	C
1	blanco	negro	amarillo
2	rosa	-	rojo
3	rojo	rojo	rojo
4	rojo	rojo	rojo
5	rojo	rojo	rojo

6	rojo	rojo	rojo
7	rojo	amarillo	amarillo
8	rojo	amarillo	amarillo

5

10

Tabla 31: Color del medio en cada pocillo después de 23 horas de incubación a 37 °C (tabla 28, configuración de la placa n.º 2) para el número de identificación de la muestra de mastitis bovina clínica: ID 6

T=23 h

ID 6	A	B	C
1	blanco	blanco	amarillo
2	rosa	-	amarillo
3	amarillo	rojo	amarillo
4	amarillo	rojo	amarillo
5	amarillo	amarillo	amarillo
6	amarillo	amarillo	amarillo
7	amarillo	amarillo	amarillo
8	amarillo	amarillo	amarillo

15

20

25

Tabla 32: Color del medio en cada pocillo después de 23 horas de incubación a 37 °C (tabla 28, configuración de la placa n.º 2) para el número de identificación de la muestra de mastitis bovina clínica: ID 7

T=23 h

ID 7	A	B	C
1	negro/w	blanco	amarillo
2	amarillo	-	rojo
3	rojo	rojo	rojo
4	rojo	rojo	rojo
5	rojo	rojo	rojo
6	rojo	amarillo	rojo
7	amarillo	amarillo	amarillo
8	amarillo	amarillo	amarillo

30

35

40

45

50

55

Tabla 33: Color del medio en cada pocillo después de 23 horas de incubación a 37 °C (tabla 28, configuración de la placa n.º 2) para el número de identificación de la muestra de mastitis bovina clínica: ID 8

T=23 h

ID 8	A	B	C
1	blanco	negro	amarillo
2	amarillo	-	rojo
3	rojo	rojo	rojo
4	rojo	rojo	rojo
5	rojo	rojo	rojo

60

65

6	rojo	rojo	rojo
7	rojo	amarillo	amarillo
8	rojo	amarillo	amarillo

5 Tabla 34: Color del medio en cada pocillo después de 7, 11 y 23 horas de incubación a 37 °C (tabla 28, configuración de la placa n.º 2) para el número de identificación de la muestra de mastitis bovina clínica: ID 3

T~7 h

10

ID 3	A	B	C
1	blanco	blanco	amarillo
2	rosa	blanco	rojo
3	rojo	rojo	rojo
4	rojo	rojo	rojo
5	rojo	rojo	rojo
6	rojo	rojo	rojo
7	rojo	rojo	rojo
8	rojo	rojo	rojo

15

20

T=23 h

25

ID 3	A	B	C
1	blanco	blanco	amarillo
2	rosa	blanco	amarillo
3	amarillo	rojo	amarillo
4	amarillo	rojo	amarillo
5	amarillo	rojo	rojo
6	amarillo	amarillo	rojo
7	amarillo	amarillo	amarillo
8	amarillo	rojo	amarillo

30

35

T~11 h

40

ID 3	A	B	C
1	blanco	blanco	amarillo
2	rosa	blanco	rojo
3	rojo	rojo	rojo
4	rojo	rojo	rojo
5	rojo	rojo	rojo
6	rojo	rojo	rojo
7	rojo	rojo	rojo
8	rojo	rojo	rojo

45

50 Tabla 35: Color del medio en cada pocillo después de 7, 11 y 23 horas de incubación a 37 °C (tabla 28, configuración de la placa n.º 2) para el número de identificación de la muestra de mastitis bovina clínica: ID 6

T~7 h

55

ID 6	A	B	C
1	blanco	blanco	amarillo
2	rosa	-	amarillo
3	amarillo	rojo	amarillo
4	amarillo	rojo	amarillo
5	amarillo	amarillo	amarillo
6	amarillo	amarillo	amarillo
7	amarillo	amarillo	amarillo
8	amarillo	amarillo	amarillo

60

65

T~11 h

ID 6	A	B	C
1	blanco	blanco	amarillo
2	rosa	-	amarillo
3	amarillo	rojo	amarillo
4	amarillo	rojo	amarillo
5	amarillo	rojo	amarillo
6	amarillo	amarillo	amarillo
7	amarillo	amarillo	amarillo
8	amarillo	amarillo	amarillo

T~23 h

ID 6	A	B	C
1	blanco	blanco	amarillo
2	rosa	-	amarillo
3	amarillo	rojo	amarillo
4	amarillo	rojo	amarillo
5	amarillo	rojo	amarillo
6	amarillo	amarillo	amarillo
7	amarillo	amarillo	amarillo
8	amarillo	amarillo	amarillo

30 **Identificación de bacterias**

Las columnas A a C y las filas 1 y 2 se usaron para la identificación de bacterias. A1: estafilococo positivo para coagulasa; A2: estafilococos; B1: estreptococo del grupo D; B2: -; C1: medios de enriquecimiento generales (Gram+ y Gram-); C2: bacterias coliformes.

35 **Prueba de susceptibilidad antimicrobiana**

40 Columna A3 a A8: dilución en serie de bencilpenicilina como potasio. Concentraciones de fármaco dadas como forma libre que varían entre 4 ug/ml y 0,05 ug/ml. Columna B3 a B8: dilución en serie de ceftiofur como clorhidrato. Concentraciones de fármaco dadas como forma libre que varían entre 4 ug/ml y 0,05 ug/ml. Columna C3 a C8: dilución en serie de cloxacilina como sodio. Concentraciones de fármaco dadas como forma libre que varían entre 4 ug/ml y 0,05 ug/ml.

45 La tabla 29 indica el color del medio de enriquecimiento en cada pocillo después de la adición de la muestra de mastitis clínica en cada pocillo antes de la incubación (t=0 horas) para las muestras ID 5,6,7,8 (referencia). La tabla 30 muestra los colores de cada medio de enriquecimiento para la muestra ID 5 tras incubación a 37 °C durante 23 horas. El medio de enriquecimiento en el pocillo B1 se volvió negro y C1 se volvió amarillo. Sin cambio de color en el pocillo A1, A2, C2. Por tanto, esta muestra clínica contiene estreptococos del grupo D. Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana muestran la CIM para la bencilpenicilina < 0,05 ug/ml, ceftiofur y cloxacilina 0,5 ug/ml.

50 La tabla 31 muestra los colores de cada medio de enriquecimiento para la muestra ID 6 después de la incubación a 37 °C durante 23 horas. El medio de enriquecimiento en el pocillo C1 y C2 se volvió amarillo. Sin cambio de color en el pocillo A1, A2, B1. Por tanto, esta muestra clínica contiene bacterias coliformes. La prueba de susceptibilidad antimicrobiana muestra la CIM para la penicilina y la cloxacilina >4 ug/ml y ceftiofur 2 ug/ml.

55 La tabla 32 muestra los colores de cada medio de enriquecimiento para la muestra ID 7 después de la incubación a 37 °C durante 23 horas. El medio de enriquecimiento en el pocillo A1 tenía un sedimento de color negro y A2, C1 se volvieron amarillos. Sin cambio de color en el pocillo B1, C2. Por tanto, esta muestra clínica contiene estafilococo positivo para coagulasa. La prueba de susceptibilidad antimicrobiana muestra la CIM para la bencilpenicilina y la cloxacilina 0,5 ug/ml y ceftiofur 1 ug/ml.

60 La tabla 33 muestra los colores de cada medio de enriquecimiento para la muestra ID 8 después de la incubación a 37 °C durante 23 horas. El medio de enriquecimiento en el pocillo B1 se volvió negro y A2, C1 se volvió amarillo. Sin cambio de color en el pocillo A1, C2. Así pues, esta muestra clínica contiene bacterias estafilococos negativos para coagulasa y estreptococos del grupo D. Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana muestran una CIM para la bencilpenicilina <0,05 ug/ml, ceftiofur y cloxacilina 0,5 ug/ml.

Las tablas 34 y 35 muestran el cambio de color de cada medio de enriquecimiento después de la incubación a 37 °C para los puntos de tiempo t=7 horas, t=11 horas y t=22-23 horas para las muestras clínicas ID 3 y 6. Ambas muestras contienen bacterias coliformes. El color de referencia de cada pocillo se da en la tabla 22 y 29.

5

La tabla 34 muestra para la muestra ID 3 que tras 7 horas y 11 horas de incubación no se produce ningún cambio de color en ninguno de los medios de enriquecimiento en comparación con la referencia (t=0 h). A las 22 horas de la incubación se produjo un cambio en los medios de enriquecimiento (véase también la tabla 26 y su descripción).

10

La Tabla 35 muestra la muestra ID 6 que el cambio de color del medio de enriquecimiento se produce a las 7 horas y después permanece sin cambios a las 11 horas y las 23 horas en comparación con las 7 horas. La comparación del cambio de color en las tablas 34 y 35 indica que la muestra ID 6 tenía un inóculo alto y la muestra ID 3 un inóculo bajo. Un examen en serie del color en los pocillos, por ejemplo cada hora o cada 15 minutos, permitiría determinar el punto de inicio del cambio de color. Una curva de calibración de, por ejemplo, E. coli que muestra color en medios de enriquecimiento a lo largo del tiempo permitiría estimar el inóculo de una muestra de E. coli clínica. Esto será el mismo que para cualquier otra bacteria Gram positiva o Gram negativa.

15

Las tablas 36 a 38 que siguen muestran otros ejemplos de pruebas de susceptibilidad antibiótica realizadas según la presente invención. Tabla 36, pruebas de susceptibilidad antibiótica de Staphylococcus aureus en Mueller Hinton y caldo de soja tríptico en preincubación y entre 15-24 h. Tablas 37 y 38, pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de Streptococcus uberis y E. coli con la adición del antibiótico específico Gram negativo aztreonam. Las tablas 38 a 49 muestran ejemplos adicionales de pruebas de susceptibilidad a antibióticos.

20

Tablas 36(1) y (2): Prueba de susceptibilidad a antibióticos; A1 a D10: 70 ul de composición 26 + 20 ul de solución de fármaco + 20 ul de muestra bacteriana 5c; E1 a G10: 70 ul de composición 2c + 10 ul de solución de fármaco + 20 ul de muestra bacteriana 5c; H1 a H10: 20 ul de composición 2c + 10 ul de solución de fármaco + 20 ul de muestra bacteriana 5c

25

1. T = 0 horas (incubación previa)

30

Cono de fármaco, (forma libre) por pocillo		µg/ml	500	100	50	10	5	1	0,5	0,1	0,05	0,01
Antibiótico	Caldo	pocillo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Bencilpenicilina	Mueller Hinton	A	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
Oxitetraciclina	Mueller Hinton	B	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
Cefalexina	Mueller Hinton	C	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
Neomicina	Mueller Hinton	D	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
Dihidroestreptomicina	Soja tríptica	E	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
Aztreonam	Soja tríptica	F	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
Bencilpenicilina	Soja tríptica	G	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
Bencilpenicilina	Soja tríptica	H	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo

35

40

2. T= 15-24 h (tras la incubación a 35 °C; nota: cambio de color entre 15 y 24 horas)

45

Cono de fármaco, (forma libre) por pocillo		µg/ml	500	100	50	10	5	1	0,5	0,1	0,05	0,01
Antibiótico	Caldo	pocillo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Bencilpenicilina	Mueller Hinton	A	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
Oxitetraciclina	Mueller Hinton	B	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	amarillo	amarillo	amarillo
Cefalexina	Mueller Hinton	C	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo
Neomicina	Mueller Hinton	D	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo
Dihidroestreptomicina	Soja tríptica	E	rojo	rojo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo
Aztreonam	Soja tríptica	F	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo
Bencilpenicilina	Soja tríptica	G	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	amarillo
Bencilpenicilina	Soja tríptica	H	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo

50

55

60

65

ES 2 952 442 T3

Tabla 37: Streptococcus uberis en presencia de aztreonam, el volumen total de líquido varió entre 5 µl y 220 µl; Solución de fármaco: 100 µg de Aztreonam por ml de agua.

5	Muestra bacteriana 6d / µl	160	80	40	20	8	4
	Composición 27 / µl	40	20	10	5	2	1
	Solución de fármaco / µl	20	10	5	2,5	1	0,5
	Color de los medios antes de la incubación	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
10	Color de los medios después de 24 horas de incubación a 37 °C	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro

Tabla 38: Escherichia coli en presencia de aztreonam, el volumen total de líquido varió entre 5 µl y 220 µl; Solución de fármaco: 100 µg de Aztreonam por ml de agua.

15	Muestra bacteriana 4d / µl	160	80	40	20	8	4
	Composición 27 / µl	40	20	10	5	2	1
	Solución de fármaco / µl	20	10	5	2,5	1	0,5
	Color de los medios antes de la incubación	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
20	Color de los medios después de 24 horas de incubación a 37 °C	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo

Tabla 39: Configuración de placa n.º 3; Fármacos: Bencilpenicilina como potasio; Cloxacilina como sodio; Aztreonam como forma libre; La concentración de fármaco en cada pocillo (A1 a C6) se basa en 20 µl de composición + 80 µl de muestra de leche de mastitis clínica recogida en el dispositivo de muestreo. Cavidades del dispositivo de muestreo A, B o C 1 a 6, se añadieron 10 µl de solución de fármaco en cada cavidad y luego se secó durante 30min a 75 °C. Después se añadieron 80 µl de muestra bacteriana a 5 cada cavidad; Dimensiones bimétricas de la cavidad: ~4,5 mm, altura de la cavidad ~5 mm.

30	pocillo	A	B	C	Concentración de Aztreonam / (forma libre) / µg/ml	Concentración de Bencilpenicilina o Cloxacilina (forma libre) / µg/ml
	1	20 µl de composición 2e	20 µl de composición 2e	20 µl de composición 2e	10	10,000
35	2	20 µl de composición 2e	20 µl de composición 2e	20 µl de composición 2e	1	1,000
	3	20 µl de composición 2e	20 µl de composición 2e	20 µl de composición 2e	0,1	100
40	4	20 µl de composición 2e	20 µl de composición 2e	20 µl de composición 2e	0,01	10
	5	20 µl de composición 2e	20 µl de composición 2e	20 µl de composición 2e	0,001	1
45	6	20 µl de composición 2e	20 µl de composición 2e	20 µl de composición 2e	0	0
		Aztreonam	Bencilpenicilina	Cloxacilina		

Tabla 40: Color de los medios en cada pocillo tras 0 horas de incubación a 37 °C (tabla 39, configuración de placa n.º 3), para las muestras de bacterias 4c, 4e, 5c, 5e, 6d

50 **T~0 h**

	A	B	C	
55	1	rojo	Rojo	rojo
	2	rojo	Rojo	rojo
	3	rojo	Rojo	rojo
	4	rojo	Rojo	rojo
	5	rojo	Rojo	rojo
60	6	rojo	Rojo	rojo

Tabla 41: Color de los medios en cada pocillo después de ~16 horas de incubación a 37 °C (tabla 39, configuración de placa n.º 3), para las muestras de bacterias 4c

T~16 h

5

	A	B	C
1	amarillo	rojo	rojo
2	amarillo	rojo	amarillo
3	amarillo	rojo	amarillo
4	amarillo	amarillo	amarillo
5	amarillo	amarillo	amarillo
6	amarillo	amarillo	amarillo

10 Tabla 42: Color de los medios en cada pocillo después de ~16 horas de incubación a 37 °C (tabla 39, configuración de placa n.º 3), para las muestras de bacterias 4e

t~16 h

15

	A	B	C
1	rojo	Rojo	rojo
2	rojo	Rojo	rojo
3	amarillo	Rojo	amarillo
4	amarillo	amarillo	amarillo
5	amarillo	amarillo	amarillo
6	amarillo	amarillo	amarillo

20

25 Tabla 43: Color de los medios en cada pocillo después de ~16 horas de incubación a 37 °C (tabla 39, configuración de placa n.º 3), para las muestras de bacterias 5c

T~16 h

30

	A	B	C
1	amarillo	rojo	rojo
2	amarillo	rojo	rojo
3	amarillo	rojo	rojo
4	amarillo	rojo	rojo
5	rojo	rojo	rojo
6	amarillo	amarillo	amarillo

35

40 Tabla 44: Color de los medios en cada pocillo después de ~16 horas de incubación a 37 °C (tabla 39, configuración de placa n.º 3), para las muestras de bacterias 5e

T~16 h

45

	A	B	C
1	amarillo	rojo	rojo
2	amarillo	rojo	rojo
3	amarillo	rojo	rojo
4	amarillo	rojo	rojo
5	amarillo	rojo	rojo
6	amarillo	amarillo	amarillo

50

55 Tabla 45: Color de los medios en cada pocillo después de ~16 horas de incubación a 37 °C (tabla 39, configuración de placa n.º 3), para las muestras de bacterias 6d

T~16 h

60

	A	B	C
1	amarillo	rojo	rojo
2	amarillo	rojo	rojo
3	amarillo	rojo	rojo
4	amarillo	rojo	rojo
5	amarillo	rojo	rojo
6	amarillo	amarillo	amarillo

65

Tabla 46: 80 µl de muestra bacteriana 5c + 20 µl de composición 28a, b, c o d; incubación a 37 °C; La tabla muestra el color de los medios en cada pocillo

		0 h	15 h
5	Composición 28a	Rojo	Amarillo
	Composición 28b	Rojo	Amarillo
	Composición 28c	Rojo	Amarillo
	Composición 28d	Rojo	Amarillo

10
15
Tabla 47: Configuración de placa n.º 4: pocillo A1 a A8: 40 µl de composición 26 + 10 ul de solución de oxitetraciclina + 10 ul de solución de neomicina + 40 ul de muestra bacteriana 5e; pocillo B1 a B8: 45 µl de composición 26 + 10 ul de solución de oxitetraciclina + 15 ul de solución de neomicina + 40 ul de muestra bacteriana 5e; pocillo C1 a C8: 40 µl de composición 26 + 10 ul de solución de bencilpenicilina + 10 ul de solución de cloxacilina + 40 ul de muestra bacteriana 5e; pocillo D1 a D8: 46,7 µl de composición 26 + 10 ul de solución de bencilpenicilina + 3,3 ul de solución de cloxacilina + 40 ul de muestra bacteriana 5e.

pocillo	A	B	C	D	
20	1	50 µg/ml de oxitetraciclina + 50 µg/ml de neomicina	50 µg/ml de oxitetraciclina + 25 µg/ml de neomicina	50 µg/ml de bencilpenicilina + 50 µg/ml de cloxacilina	50 µg/ml de bencilpenicilina + 16,7 µg/ml de cloxacilina
	2	10 µg/ml de oxitetraciclina + 10 µg/ml de neomicina	10 µg/ml de oxitetraciclina + 50 µg/ml de neomicina	10 µg/ml de bencilpenicilina + 10 µg/ml de cloxacilina	10 µg/ml de bencilpenicilina + 3,3 µg/ml de cloxacilina
	3	10 µg/ml de oxitetraciclina + 50 µg/ml de neomicina	10 µg/ml de oxitetraciclina + 2,5 µg/ml de neomicina	5 µg/ml de bencilpenicilina + 5 µg/ml de cloxacilina	5 µg/ml de bencilpenicilina + 1,7 µg/ml de cloxacilina
25	4	1 µg/ml de oxitetraciclina + 1 µg/ml de neomicina	1 µg/ml de oxitetraciclina + 0,5 µg/ml de neomicina	1 µg/ml de bencilpenicilina + 1 µg/ml de cloxacilina	1 µg/ml de bencilpenicilina + 0,33 µg/ml de cloxacilina
	5	0,5 µg/ml de oxitetraciclina + 0,5 µg/ml de neomicina	0,5 µg/ml de oxitetraciclina + 0,25 µg/ml de neomicina	0,5 µg/ml de bencilpenicilina + 0,5 µg/ml de cloxacilina	0,5 µg/ml de bencilpenicilina + 0,17 µg/ml de cloxacilina
	6	0,1 µg/ml de oxitetraciclina + 0,1 µg/ml de neomicina	0,1 µg/ml de oxitetraciclina + 0,05 µg/ml de neomicina	0,1 µg/ml de bencilpenicilina + 0,1 µg/ml de cloxacilina	0,1 µg/ml de bencilpenicilina + 0,033 µg/ml de cloxacilina
30	7	0,05 µg/ml de oxitetraciclina + 0,05 µg/ml de neomicina	0,05 µg/ml de oxitetraciclina + 0,025 µg/ml de neomicina	0,05 µg/ml de bencilpenicilina + 0,05 µg/ml de cloxacilina	0,05 µg/ml de bencilpenicilina + 0,017 µg/ml de cloxacilina
	8	0,01 µg/ml de oxitetraciclina + 0,01 µg/ml de neomicina	0,01 µg/ml de oxitetraciclina + 0,005 µg/ml de neomicina	0,01 µg/ml de bencilpenicilina + 0,01 µg/ml de cloxacilina	0,01 µg/ml de bencilpenicilina + 0,0033 µg/ml de cloxacilina
35		Razón oxitetraciclina/neomicina 1:1 (forma libre)	Razón oxitetraciclina/neomicina 2:1 (forma libre)	Razón bencilpenicilina/cloxacilina 1:1 (forma libre)	Razón bencilpenicilina/cloxacilina 3:1 (forma libre)

40
Tabla 48: Color del medio en cada pocillo tras 0 horas y 24 horas de incubación a 35 °C (tabla 47; configuración de placa n.º 4), para muestras de bacterias 5e

T = 0 h

	A	B	C	D	
45	1	rojo	rojo	rojo	rojo
	2	rojo	rojo	rojo	rojo
	3	rojo	rojo	rojo	rojo
50	4	rojo	rojo	rojo	rojo
	5	rojo	rojo	rojo	rojo
	6	rojo	rojo	rojo	rojo
	7	rojo	rojo	rojo	rojo
55	8	rojo	rojo	rojo	rojo

T = 24 h

	A	B	C	D	
60	1	rojo	rojo	rojo	rojo
	2	rojo	rojo	rojo	rojo
	3	rojo	rojo	rojo	rojo
65	4	rojo	rojo	rojo	rojo

5	5	rojo	rojo	rojo	rojo
	6	rojo	rojo	rojo	rojo
	7	rojo	rojo	rojo	rojo
	8	rojo	rojo	rojo	amarillo

Ejemplo 7: Agentes estabilizantes

10 (ejemplos distintos de los que comprenden rojo de fenol en la mezcla de reacción a entre 0,0035 % y 0,30 % en combinación con el agente estabilizante no forman parte de la invención)

15 La presente invención se basa en gran medida sobre el descubrimiento sorprendente e inesperado de que las bacterias pueden cultivarse en medios de crecimiento que comprenden cantidades de inhibición del crecimiento de medios de identificación y/o indicador de pH en presencia de uno o más agentes estabilizantes. Aumentar la concentración del medio de identificación y/o el indicador de pH conduce a una mayor sensibilidad en la prueba, ya que un cambio fenotípico en la mezcla de reacción puede observarse más fácil y fiable.

20 Los experimentos iniciales de acuerdo con la presente invención se realizaron en presencia de leche con respecto a bacterias Gram positivas y Gram negativas. El solicitante observó que el medio de identificación y/o el medio indicador de pH podrían aumentar a concentraciones que de otro modo inhibirían el crecimiento de bacterias. Por ejemplo, remítase a los resultados en las tablas 49-52 (Staphylococcus aureus, Streptococcus uberis, Staphylococcus epidermidis y Escherichia coli cultivadas en caldo de soja tríplico y rojo de fenol (a una concentración inhibitoria del crecimiento) en comparación con las tablas 53-56 (mismo experimento solo en presencia de leche en polvo). Los resultados demuestran que la leche en polvo tenía un efecto estabilizante contra el efecto inhibitorio del crecimiento de rojo de fenol en el experimento de control (es decir, tablas 49-52). Además, los resultados en las tablas 5, 6, 79-86 (Streptococcus uberis, Staphylococcus epidermidis y Staphylococcus aureus demuestran el efecto estabilizante de la leche cuando las bacterias se cultivan en concentraciones de medios de identificación que de otro modo serían inhibidores de crecimiento.

30 Los componentes principales de la leche (incluyendo la leche en polvo) incluyen proteínas de caseína y carbohidratos. El solicitante luego sometió a prueba el efecto de inhibición del crecimiento de rojo fenol en las mismas bacterias en presencia de caseína sodio (que comprende α -caseína, β -caseína y κ -caseína) y lactosa. Los datos presentados en las tablas 53-64 proporcionan una prueba preliminar de concepto que el efecto estabilizante se proporciona por la proteína de caseína en el caso de bacterias gram positivas (es decir Staphylococcus aureus, Streptococcus uberis, Staphylococcus epidermidis) mientras que el efecto estabilizante se proporciona por el carbohidrato en el caso de bacterias Gram negativas (Escherichia coli).

40 A continuación, el solicitante trató de investigar el efecto estabilizador de diferentes proteínas lácteas y extractos de proteínas lácteas (p. ej. α -caseína, β -caseína (incluyendo una o más de las variantes A1, A2, A3, B, C, D, E y F), κ -caseína, β -lactoglobulina, proteína de suero, lactoalbúmina, lactoferrina y leche o leche en polvo), así como diferentes hidratos de carbono (por ejemplo, dextrosa, manitol, lactosa, trehalosa y sacarosa) sobre el efecto inhibitorio del crecimiento observado. Estos datos se presentan en las tablas 65-86, cuando se leen conjuntamente con la tabla 90 (es decir, las composiciones). Estos datos muestran que la dextrosa, el manitol, la lactosa, la trehalosa y (en menor medida) la sacarosa proporcionan un efecto estabilizador contra la inhibición del crecimiento de las bacterias Gram negativas, mientras que la α -caseína, la β -caseína (incluidas una o más de las variantes A1, A2, A3, B, C, D, E y F), la κ -caseína, la β -lactoglobulina, la proteína de suero de leche, la lactoalbúmina, la lactoferrina y la leche o la leche en polvo, dependiendo de la bacteria que se esté cultivando.

50 Ejemplo 8: Muestras de orina (ejemplos distintos de los que comprenden rojo de fenol en la mezcla de reacción a entre 0,0035 % y 0,30 % en combinación con el agente estabilizador no forman parte de la invención)

55 Los resultados presentados en las tablas 87-89 demuestran la eficacia de los métodos de la presente invención en una muestra no láctea, concretamente orina enriquecida con Escherichia coli y Streptococci uberis. Las tablas 87, 88 muestran que las bacterias Gram negativas (por ejemplo, e. coli) con azúcar presente (es decir, lactosa y/o trehalosa) crecerán en presencia de cantidades de inhibición del crecimiento de rojo de fenol en una muestra casi clínica. Además, la tabla 89 muestra que las bacterias Gram positivas (por ejemplo, Streptococci uberis) con proteína(s) láctea(s) presente(s) (es decir, suero bovino, lactoalbúmina, caseína sódica, etc.) crecerán en presencia de cantidades inhibitorias del crecimiento de rojo de fenol en una muestra casi clínica.

60 Tabla 49 Bacterias: Staph aureus

Medio: caldo de soja tríplico + rojo de fenol

65 Composición en los pocillos: 80 ul de medio + 20 ul de bacterias en TSB

Inóculo					t=0 h			Control
ufc/ml	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	0 (sin bacterias)
5	composición 2d	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 2e	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 2f	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
					t=12 h			
10	composición 2d	amarillo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 2e	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 2f	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
					t=24 h			
15	composición 2d	amarillo	amarillo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 2e	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
20	composición 2f	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo

Tabla 50 Bacterias: Strep uberis

Medio: caldo de soja tríptico + rojo de fenol

25 Composición en los pocillos: 80 ul de medio + 20 ul de bacterias en TSB

Inóculo					t=0 h			Control
ufc/ml	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	0 (sin bacterias)
30	composición 2d	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 2e	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 2f	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
					t=12 h			
35	composición 2d	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 2e	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
40	composición 2f	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
					t=24 h			
	composición 2d	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
45	composición 2e	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 2f	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo

Tabla 51 Bacterias: Staph epidermidis (Staph - CNS negativo para coagulasa)

50 Medio: caldo de soja tríptico + rojo de fenol

Composición en los pocillos: 80 ul de medio + 20 ul de bacterias en TSB

Inóculo					t=0 h			Control
ufc/ml	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	0 (sin bacterias)
55	composición 2d		rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 2e		rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
60	composición 2f		rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
					t=12 h			
	composición 2d		amarillo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 2e		rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
65	composición 2f		rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo

ES 2 952 442 T3

					t=24 h			
5	composición 2d	amarillo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 2e	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 2f	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo

Tabla 52 Bacterias: E-Coli

10 Medio: caldo de soja tríptico + rojo de fenol

Composición en los pocillos: 80 ul de medio + 20 ul de bacterias en TSB

15	Inóculo					t=0 h		Control
	ufc/ml	10⁸	10⁷	10⁶	10⁵	10⁴	10³	10²
20	composición 2d	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 2e	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 2f	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
25						t=12 h		
	composición 2d	naranja	naranja	naranja	naranja	naranja	naranja	rojo
30	composición 2e	naranja	naranja	naranja	naranja	naranja	naranja	rojo
	composición 2f	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	rojo
35						t=24 h		
	composición 2d	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	rojo
	composición 2e	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	naranja/rojo	rojo
40	composición 2f	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo

Tabla 53 Bacterias: Staph aureus

45 Medio: caldo de soja tríptico + rojo de fenol + 10 % de leche entera en polvo esterilizada

Composición en los pocillos: 80 ul de medio + 20 ul de bacterias en TSB

50	Inóculo					t=0 h		Control
	ufc/ml	10⁸	10⁷	10⁶	10⁵	10⁴	10³	10²
55	composición 30a	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 30b	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 30c	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
60						t=12 h		
	composición 30a	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
65	composición 30b	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo

ES 2 952 442 T3

	composición 30c	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo	rojo
						t=24 h			
5	composición 30a	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
	composición 30b	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
10	composición 30c	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo

Tabla 54 Bacterias: Strep uberis

15 Medio: caldo de soja tríptico + rojo de fenol + 10 % de leche entera esterilizada

Composición en los pocillos: 80 ul de medio + 20 ul de bacterias en TSB

	Inóculo					t=0 h			Control
	ufc/ml	10⁸	10⁷	10⁶	10⁵	10⁴	10³	10²	0 (sin bacterias)
	composición 30a	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
25	composición 30b	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 30c	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
30						t=12 h			
	composición 30a	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo	rojo	rojo
	composición 30b	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo	rojo	rojo
35	composición 30c	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo	rojo	rojo	rojo
						t=24 h			
40	composición 30a	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
	composición 30b	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo	rojo
45	composición 30c	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo	rojo

Tabla 55 Bacterias: Staph epidermidis (Staph - CNS negativo para coagulasa)

50 Medio: caldo de soja tríptico + rojo de fenol + 10 % de leche entera en polvo esterilizada

Composición en los pocillos: 80 ul de medio + 20 ul de bacterias en TSB

	Inóculo					t=0 h			Control
	ufc/ml	10⁸	10⁷	10⁶	10⁵	10⁴	10³	10²	0 (sin bacterias)
	composición 30a		rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
60	composición 30b		rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 30c		rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
65						t=12 h			

ES 2 952 442 T3

5	composición 30a		amarillo	amarillo	amarillo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 30b		amarillo	amarillo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 30c		amarillo	amarillo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
						t=24 h			
10	composición 30a		amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo	rojo
	composición 30b		amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo	rojo
15	composición 30c		amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo	rojo

Tabla 56 Bacterias: E-Coli

Medio: caldo de soja triptico + rojo de fenol + 10 % de leche entera en polvo esterilizada

Composición en los pocillos: 80 ul de medio + 20 ul de bacterias en TSB

	Inóculo					t=0 h			Control
25	ufc/ml	10⁸	10⁷	10⁶	10⁵	10⁴	10³	10²	0 (sin bacterias)
	composición 30a	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
30	composición 30b	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 30c	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
						t=12 h			
35	composición 30a	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
	composición 30b	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
40	composición 30c	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
						t=24 h			
45	composición 30a	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
	composición 30b	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
50	composición 30c	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo

Tabla 57 Bacterias: Staph aureus

Medio: caldo de soja triptico + rojo de fenol + 3 % de caseína bovina de sodio

Composición en los pocillos: 80 ul de medio + 20 ul de bacterias en TSB

	Inóculo					t=0 h			Control
60	ufc/ml	10⁸	10⁷	10⁶	10⁵	10⁴	10³	10²	0 (sin bacterias)
	composición 31a	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
65	composición 31b	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo

ES 2 952 442 T3

	composición 31c	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
					t=12 h			
5	composición 31a	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo	rojo
	composición 31b	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo	rojo
10	composición 31c	naranja	naranja	naranja	naranja	naranja	rojo	rojo
					t=24 h			
15	composición 31a	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
	composición 31b	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
20	composición 31c	naranja	naranja	naranja	naranja	naranja	naranja	rojo

Tabla 58 Bacterias: Strep uberis

Medio: caldo de soja tríptico + rojo de fenol + 3 % de caseína bovina de sodio

25 Composición en los pocillos: 80 ul de medio + 20 ul de bacterias en TSB

	Inóculo					t=0 h		Control	
	ufc/ml	10⁸	10⁷	10⁶	10⁵	10⁴	10³	10²	0 (sin bacterias)
30	composición 31a	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 31b	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
35	composición 31c	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
						t=12 h			
40	composición 31a	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 31b	amarillo	amarillo	amarillo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
45	composición 31c	amarillo	amarillo	amarillo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
						t=24 h			
50	composición 31a	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo	rojo
	composición 31b	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
55	composición 31c	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo

Tabla 59 Bacterias: Staph epidermidis (Staph - CNS negativo para coagulasa)

Medio: caldo de soja tríptico + rojo de fenol + 3 % de caseína bovina de sodio

60 Composición en los pocillos: 80 ul de medio + 20 ul de bacterias en TSB

65

ES 2 952 442 T3

Inóculo					t=0 h			Control
ufc/ml	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	0 (sin bacterias)
composición 31a		rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 31b		rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 31c		rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
					t=12 h			
composición 31a		amarillo	amarillo	amarillo	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 31b		amarillo	amarillo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 31c		naranja	naranja	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
					t=24 h			
composición 31a		amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
composición 31b		amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
composición 31c		naranja	naranja	naranja	naranja	naranja	naranja	rojo

Tabla 60 Bacterias: E-Coli

Medio: caldo de soja tríptico + rojo de fenol + 3 % de caseína bovina de sodio

Composición en los pocillos: 80 ul de medio + 20 ul de bacterias en TSB

Inóculo					t=0 h			Control
ufc/ml	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	0 (sin bacterias)
composición 31a	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 31b	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 31c	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
					t=12 h			
composición 31a	amarillo/naranja	amarillo/naranja	amarillo/naranja	amarillo/naranja	amarillo/naranja	amarillo/naranja	amarillo/naranja	rojo
composición 31b	naranja	naranja	naranja	naranja	naranja	naranja	naranja	rojo
composición 31c	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
					t=24 h			
composición 31a	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	rojo
composición 31b	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 31c	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo

Tabla 61 Bacterias: Staph aureus

Medio: caldo de soja tríptico + rojo de fenol + 5 % de lactosa

Composición en los pocillos: 80 ul de medio + 20 ul de bacterias en TSB

ES 2 952 442 T3

Inóculo					t=0 h			Control
ufc/ml	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	0 (sin bacterias)
composición 32a	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 32b	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 33c	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
					t=12 h			
composición 32a	amarillo	amarillo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 32b	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 33c	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
					t=24 h			
composición 32a	amarillo	amarillo	amarillo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 32b	amarillo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 33c	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo

Tabla 62 Bacterias: Strep uberis

Medio: caldo de soja tríptico + rojo de fenol + 5 % de lactosa

Composición en los pocillos: 80 ul de medio + 20 ul de bacterias en TSB

Inóculo					t=0 h			Control
ufc/ml	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	0 (sin bacterias)
composición 32a	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 32b	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 33c	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
					t=12 h			
composición 32a	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 32b	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 33c	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
					t=24 h			
composición 32a	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 32b	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 33c	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo

Tabla 63 Bacterias: Staph epidermidis (Staph - CNS negativo para coagulasa)

Medio: caldo de soja tríptico + rojo de fenol + 5 % de lactosa

Composición en los pocillos: 80 ul de medio + 20 ul de bacterias en TSB

ES 2 952 442 T3

	Inóculo				t=0 h			Control	
	ufc/ml	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	0 (sin bacterias)
5	composición 32a		rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 32b		rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
10	composición 33c		rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
					t=12 h				
15	composición 32a		amarillo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 32b		amarillo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
20	composición 33c		rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
					t=24 h				
25	composición 32a		amarillo	naranja	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 32b		amarillo	amarillo	amarillo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 33c		rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo

30 Tabla 64 Bacterias: E-Coli

Medio: caldo de soja trípico + rojo de fenol + 5 % de lactosa

Composición en los pocillos: 80 ul de medio + 20 ul de bacterias en TSB

	Inóculo				t=0 h			Control	
	ufc/ml	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	0 (sin bacterias)
35	composición 32a	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
40	composición 32b	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
45	composición 33c	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
					t=12 h				
50	composición 32a	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
	composición 32b	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
55	composición 33c	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
					t=24 h				
60	composición 32a	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
	composición 32b	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
	composición 33c	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo

ES 2 952 442 T3

Tabla 65 Bacterias: Staph aureus

80 ul de composición 2d, 46 o 47 + 20 ul de muestra bacteriana 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f o 2g

	Inóculo				t=0 h			Control
5	ufc/ml	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	0 (sin bacterias)
	composición 2d	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
10	composición 46	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 47	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
					t=12 h			
15	composición 2d	amarillo	amarillo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 46	amarillo	amarillo	amarillo	rojo	rojo	rojo	rojo
20	composición 47	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo	rojo
					t=16 h			
25	composición 2d	amarillo	amarillo	naranja	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 46	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	naranja	rojo	rojo
30	composición 47	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
					t=24 h			
	composición 2d	amarillo	amarillo	amarillo	rojo	rojo	rojo	rojo
35	composición 46	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
	composición 47	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo

40 Tabla 66 Bacterias: E-Coli

80 ul de composición 2d, 31a o 32a + 20 ul de muestra bacteriana 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f o 1g

	Inóculo				t=0 h			Control
45	ufc/ml	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	0 (sin bacterias)
	composición 32a	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
50	composición 31a	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 2d	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
55					t=12 h			
	composición 32a	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
60	composición 31a	naranja	naranja	naranja	naranja	naranja	naranja	rojo
	composición 2d	naranja	naranja	naranja	naranja	naranja	naranja	rojo
					t=24 h			
65	composición 32a	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo

ES 2 952 442 T3

composición 31a	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	rojo
composición 2d	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	rojo

Tabla 67 Bacterias: E-Coli

80 ul de composición 43, 44 o 45 + 20 ul de muestra bacteriana 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f o 1g

Inóculo					t=0 h			Control
ufc/ml	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	0 (sin bacterias)
composición 45	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 44	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 43	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
					t=12 h			
composición 45	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
composición 44	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
composición 43	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
					t=24 h			
composición 45	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
composición 44	naranja	naranja	naranja	naranja	naranja	naranja	naranja	rojo
composición 43	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo

Tabla 68 Bacterias: E-Coli

80 ul de composición 40, 41 o 42 + 20 ul de muestra bacteriana 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f o 1g

Inóculo					t=0 h			Control
ufc/ml	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	0 (sin bacterias)
composición 42	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 41	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 40	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
					t=12 h			
composición 42	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
composición 41	naranja	naranja	naranja	naranja	naranja	naranja	naranja	rojo
composición 40	Amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
					t=24 h			
composición 42	Amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo	rojo

ES 2 952 442 T3

composición 41	Naranja	naranja	naranja	naranja	naranja	naranja	naranja	rojo
composición 40	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo	rojo

Tabla 69 Bacterias: Staph aureus

80 ul de composición 48 + 20 ul de muestra bacteriana 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f o 2 g

Inóculo					t=0 h			Control
ufc/ml	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	0 (sin bacterias)
composición 48	Rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo
					t=24 h			
composición 48	Amarillo	amarillo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo	rojo

Tabla 70 Bacterias: E-Coli

80 ul de composición 2e, 33, 34, 38, 39 + 20 ul de muestra bacteriana 1b, 1d o 1f

Inóculo		t=0 h		Control
ufc/ml	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	0 (sin bacterias)
composición 2e	Rojo	rojo	rojo	rojo
composición 33	Rojo	rojo	rojo	rojo
composición 34	Rojo	rojo	rojo	rojo
composición 38	Rojo	rojo	rojo	rojo
composición 39	Rojo	rojo	rojo	rojo
		t=12 h		
composición 2e	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	rojo
composición 33	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	rojo
composición 34	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
composición 38	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	rojo
composición 39	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	rojo
		t=24 h		
composición 2e	Rojo	rojo	rojo	rojo
composición 33	Rojo	rojo	rojo	rojo
composición 34	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
composición 38	Rojo	rojo	rojo	rojo
composición 39	Rojo	rojo	rojo	rojo

Tabla 71 Bacterias: Staph aureus

80 ul de composición 2e, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 + 20 ul muestra bacteriana 2b, 2d o 2f

Inóculo		t=0 h		Control
ufc/ml	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	0 (sin bacterias)
composición 2e	Rojo	rojo	rojo	rojo
composición 33	Rojo	rojo	rojo	rojo
composición 34	Rojo	rojo	rojo	-

	composición 35	-	rojo	-	rojo
	composición 36	Rojo	rojo	rojo	rojo
5	composición 37	Rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 38	Rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 39	Rojo	rojo	rojo	rojo
			t=12 h		
10	composición 2e	Naranja	rojo	rojo	rojo
	composición 33	Amarillo	amarillo	rojo	rojo
	composición 34	Amarillo	amarillo	naranja	-
15	composición 35	-	rojo	-	rojo
	composición 36	Amarillo	amarillo	rojo	rojo
	composición 37	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
20	composición 38	Naranja	naranja	rojo	rojo
	composición 39	Amarillo	amarillo	rojo	rojo
			t=16 h		
	composición 2e	Naranja	rojo	rojo	rojo
25	composición 33	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
	composición 34	Amarillo	amarillo	amarillo	-
	composición 35	-	rojo	-	rojo
30	composición 36	Amarillo	amarillo	naranja	rojo
	composición 37	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
	composición 38	Naranja	naranja	naranja	rojo
	composición 39	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
35			t=24 h		
	composición 2e	Amarillo	rojo	rojo	rojo
	composición 33	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
40	composición 34	Amarillo	amarillo	amarillo	-
	composición 35	-	rojo	-	rojo
	composición 36	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
45	composición 37	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
	composición 38	naranja/rojo	naranja/rojo	naranja/rojo	rojo
	composición 39	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo

50 Tabla 72 Bacterias: Strep uberis

80 ul de composición 2e, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 + 20 ul de muestra bacteriana 3b, 3d o 3f

	Inóculo		t=0 h		Control
55	ufc/ml	10⁷	10⁵	10³	0 (sin bacterias)
	composición 2e	Rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 33	Rojo	rojo	rojo	rojo
60	composición 34	Rojo	rojo	rojo	-
	composición 35	-	rojo	-	rojo
	composición 36	Rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 37	Rojo	rojo	rojo	rojo
65	composición 38	Rojo	rojo	rojo	rojo

ES 2 952 442 T3

	composición 39	Rojo	rojo	rojo	rojo
			t=12 h		
5	composición 2e	Rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 33	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
	composición 34	Amarillo	amarillo	amarillo	-
10	composición 35	-	rojo	-	rojo
	composición 36	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
	composición 37	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
	composición 38	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
15	composición 39	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
			t=16 h		
	composición 2e	Rojo	rojo	rojo	rojo
20	composición 33	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
	composición 34	Amarillo	amarillo	amarillo	-
	composición 35	-	amarillo	-	rojo
	composición 36	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
25	composición 37	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
	composición 38	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
	composición 39	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
30			t=24 h		
	composición 2e	Rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 33	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
35	composición 34	Amarillo	amarillo	amarillo	-
	composición 35	-	amarillo	-	rojo
	composición 36	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
	composición 37	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
40	composición 38	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
	composición 39	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo

Tabla 73 bacterias: E-Coli

45 80 ul de composición 40, 43 o 45 + 20 ul de muestra bacteriana 1b, 1d o 1f

	Inóculo		t=0 h		Control
50	ufc/ml	10⁷	10⁵	10³	0 (sin bacterias)
	composición 49	Rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 50	Rojo	rojo	rojo	rojo
	composición 51	Rojo	rojo	rojo	rojo
55			t=12 h		
	composición 49	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
	composición 50	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
60	composición 51	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
			t=24 h		
	composición 49	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
	composición 50	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo
65	composición 51	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo

ES 2 952 442 T3

Tabla 74 Bacterias: Staph aureus

80 ul de composición 40, 43 o 45 + 20ul muestra bacteriana 2b, 2d o 2f

5

Inóculo		t=0 h		Control
ufc/ml	10⁷	10⁵	10³	0 (sin bacterias)
composición 49	Rojo	rojo	rojo	rojo
composición 50	Rojo	rojo	rojo	rojo
composición 51	Rojo	rojo	rojo	rojo
		t=24 h		
composición 49	Rojo	rojo	rojo	rojo
composición 50	Rojo	rojo	rojo	rojo
composición 51	Rojo	rojo	rojo	rojo

10

15

20

Tabla 75 Bacterias: Strep uberis

80 ul de composición 40, 43 o 45 + 20ul muestra bacteriana 3b, 3d o 3f

25

Inóculo		t=0 h		Control
ufc/ml	10⁷	10⁵	10³	0 (sin bacterias)
composición 49	Rojo	rojo	rojo	rojo
composición 50	Rojo	rojo	rojo	rojo
composición 51	Rojo	rojo	rojo	rojo
		t=24 h		
composición 49	Rojo	rojo	rojo	rojo
composición 50	Rojo	rojo	rojo	rojo

30

35

Tabla 76 Bacterias: E-Coli

80 ul de composición 2e, 53 o 54 + 20 ul de muestra bacteriana 1b, 1d o 1f

40

Inóculo		t=0 h	
ufc/ml	10⁷	10⁵	10³
composición 2e	Rojo	rojo	rojo
composición 53	Rojo	rojo	rojo
composición 54	Rojo	rojo	rojo
		t=24 h	
composición 2e	Rojo	rojo	rojo
composición 53	Rojo	rojo	rojo
composición 54	Rojo	rojo	rojo

45

50

55

Tabla 77 Bacterias: Strep uberis

80 ul de composición 2e, 53 o 54 + 20 ul de muestra bacteriana 3b, 3d o 3f

60

Inóculo		t=0 h	
ufc/ml	10⁷	10⁵	10³
composición 2e	Rojo	rojo	rojo
composición 53	Rojo	rojo	rojo
composición 54	Rojo	rojo	rojo

65

		t=24 h	
composición 2e	Rojo	rojo	rojo
composición 53	Amarillo	amarillo	amarillo
composición 54	Amarillo	amarillo	amarillo

Tabla 78 Bacterias: Staph aureus

80 ul de composición 2e, 53 o 54 + 20 ul de muestra bacteriana 2b, 2d o 2f

		t=0 h	
Inóculo			
ufc/ml	10⁷	10⁵	10³
composición 2e	Rojo	rojo	rojo
composición 53	Rojo	rojo	rojo
composición 54	Rojo	rojo	rojo
		t=24 h	
composición 2e	Rojo	rojo	rojo
composición 53	Amarillo	amarillo	amarillo
composición 54	Amarillo	amarillo	amarillo

Tabla 79 Bacterias: Staph epidermidis

80 ul de composición 55 + 20 ul de muestra bacteriana 12a o 12b

	t=0 h	t=0 h
Inóculo		
ufc/ml	10⁷	10⁵
composición 55	Rojo	rojo
	t=19h	t=19h
composición 55	Rojo	rojo

Tabla 80 Bacterias: Staph epidermidis

80 ul de composición 55 + 20 ul de muestra bacteriana 7b o 7d

	t=0 h	t=0 h
Inóculo		
ufc/ml	10⁷	10⁵
composición 55	Rojo	rojo
	t=19h	t=19h
composición 55	Amarillo	amarillo

Tabla 81 Bacterias: Staph aureus

80 ul de composición 55 + 20 ul de muestra bacteriana 2d o 2f

	t=0 h	t=0 h
Inóculo		
ufc/ml	10⁵	10³
composición 55	Rojo	rojo
	t=19h	t=19h
composición 55	Rojo	rojo

Tabla 82 Bacterias: Staph aureus

80 ul de composición 55 + 20 ul de muestra bacteriana 5d o 5f

Inóculo	t=0 h	t=0 h
ufc/ml	10⁵	10³
composición 55	Rojo	rojo
	t=19h	t=19h
composición 55	Amarillo	amarillo

5

10 Tabla 83 Bacterias: Staph aureus

80 ul de composición 57 + 20 ul de muestra bacteriana 2d o 2f

Inóculo	t=0 h	t=0 h
ufc/ml	10⁵	10³
composición 57	amarillo claro	amarillo claro
	t=19h	t=19h
composición 57	amarillo claro	amarillo claro

15

20

Tabla 84 Bacterias: Staph aureus

25 80 ul de composición 57 + 20 ul de muestra bacteriana 5d o 5f

Inóculo	t=0 h	t=0 h
ufc/ml	10⁵	10³
composición 57	Blanco	blanco
	t=19h	t=19h
composición 57	Negro	negro

30

35 Tabla 85 Bacterias: Staph aureus

80 ul de composición liofilizada 59 + 80 ul de muestra bacteriana 2c, 2d, 2e, 2f o 2g

Inóculo		t=0 h			
ufc/ml	10⁶	10⁵	10⁴	10³	10²
composición 59	amarillo claro	amarillo claro	amarillo claro	amarillo claro	amarillo claro
		t=16 h			
composición 59	marrón claro	marrón claro	amarillo claro	amarillo claro	amarillo claro

40

45

Tabla 86 Bacterias: Staph aureus

50 80 ul de composición liofilizada 59 + 80 ul de muestra de bacterias 5c, 5d, 5e, 5f o 5g

Inóculo		t=0 h			
ufc/ml	10⁶	10⁵	10⁴	10³	10²
composición 59	Blanco	blanco	blanco	blanco	blanco
		t=16 h			
composición 59	Negro	negro	negro	negro	negro

55

60 Tabla 87 Bacterias: E-Coli

80 ul de composición 2e, 33 o 49 + 20 ul de muestra bacteriana 10a, 10b o 10c

65

ES 2 952 442 T3

Inóculo		t=0 h		Control
ufc/ml	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	0 (sin bacterias)
composición 2e	Rojo	rojo	rojo	rojo
composición 39	Rojo	rojo	rojo	rojo
composición 52	Rojo	rojo	rojo	rojo
		t=24 h		
composición 2e	Rojo	rojo	rojo	rojo
composición 39	Rojo	rojo	rojo	rojo
composición 52	Amarillo	amarillo	amarillo	rojo

Tabla 88 Bacterias: E-Coli

80 ul de composición 2e, 36 o 37 + 20 ul de muestra bacteriana 10a, 10b o 10c

Inóculo		t=0 h		Control
ufc/ml	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	0 (sin bacterias)
composición 2e	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 36	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 37	rojo	rojo	rojo	rojo
		t=24 h		
composición 2e	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 36	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 37	rojo	rojo	rojo	rojo

Tabla 89 bacterias: Strep uberis

80 ul de composición 2e, 36, 40, 49, 33 o 52 + 20 ul de muestra bacteriana 11a, 11b u 11c

Inóculo		t=0 h		Control
ufc/ml	10 ⁷	10 ⁵	10 ³	0 (sin bacterias)
composición 2e	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 39	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 52	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 49	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 36	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 37	rojo	rojo	rojo	rojo
		t=24 h		
composición 2e	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 39	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
composición 52	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
composición 49	rojo	rojo	rojo	rojo
composición 36	amarillo	amarillo	amarillo	rojo
composición 37	amarillo	amarillo	amarillo	rojo

ES 2 952 442 T3

Tabla 90: Composiciones

	Caldo de soja triptico	Rojo de fenol	leche entera en polvo	caseína sódica (leche bovina)	α Caseína	β Caseína	κ caseína	β-lacto-globulina	Suero bovino	Lacto-albúmina	Lacto-ferrina	Lactosa	Dextrosa	Manitol	Sacarina	Trehalosa	Comentario
	99,90 %	0,10 %															
	89,975 %	0,025 %	10 %														
	89,95 %	0,05 %	10 %														
5	89,90 %	0,10 %	10 %														
	96,975 %	0,025 %		3 %													
	96,95 %	0,05 %		3 %													
	96,90 %	0,10 %		3 %													
10	94,975 %	0,025 %										5,0 %					
	94,95 %	0,05 %										5,0 %					
	94,90 %	0,10 %										5,0 %					
	98,95 %	0,05 %		1,0 %													
15	91,95 %	0,05 %		5,0 %								3,0 %					
	98,95 %	0,05 %									1,0 %						
20	98,95 %	0,05 %							1,0 %								Centrifugada, sedimento descartado, sobrenadante usado solamente
	98,95 %	0,05 %								1,0 %							Centrifugada, sedimento descartado, sobrenadante usado solamente
25	98,95 %	0,05 %			1,0 %												
	98,95 %	0,05 %				1,0 %											
30	98,95 %	0,05 %								1,0 %							Centrifugada, sedimento descartado, sobrenadante usado solamente
	98,975 %	0,025 %													1,0 %		
	98,975 %	0,025 %												1,0 %			
	98,975 %	0,025 %														1,0 %	
35	98,975 %	0,025 %										0,1 %					
	98,975 %	0,025 %										1,0 %					
	99,875 %	0,025 %		0,1 %													
	99,575 %	0,025 %		0,4 %													
40	94,975 %	0,025 %											5,0 %				
	98,95 %	0,05 %										1,0 %					
	98,95 %	0,05 %										1,0 %					
45	98,95 %	0,05 %		1,0 %												1,0 %	
	97,95 %	0,05 %										1,0 %				1,0 %	
	98,95 %	0,05 %				1,0 %											1,0 %
	98,95 %	0,05 %					1,0 %										1,0 %

REIVINDICACIONES

1. Un método para realizar una prueba de susceptibilidad antimicrobiana en una muestra biológica obtenida de un ser humano o animal no humano, en donde el ser humano o animal no humano puede estar infectado por, o en riesgo de infección por, una o más bacterias causantes de infección, comprendiendo el método,
- 5 (i) proporcionar una mezcla de reacción que comprende una muestra biológica obtenida de un ser humano o animal no humano y medios de susceptibilidad que comprendan medios de crecimiento, un agente antimicrobiano, rojo de fenol y un agente estabilizador; y
- 10 (ii) determinar la susceptibilidad de una o más bacterias de la muestra al agente antimicrobiano observando un cambio de color cuando se mezcla la muestra con el medio de susceptibilidad,
- en donde el rojo de fenol está presente en la mezcla de reacción entre el 0,0035% y el 0,30%, que es en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento de una o más bacterias causantes de infección si no fuera por la presencia del agente estabilizador,
- 15 – y en donde el agente estabilizador comprende una proteína derivada de la leche o un extracto de proteína derivada de la leche para bacterias Gram positivas, y
- el agente estabilizador comprende un hidrato de carbono para bacterias Gram negativas.
2. El método según la reivindicación 1, en donde la proteína derivada de la leche o el extracto de proteína derivada de la leche se selecciona de uno o más del grupo que consiste en α -caseína, β -caseína (incluyendo una o más de las variantes A1, A2, A3, B, C, D, E y F), caseína sódica (por ejemplo, que comprende α -caseína, β -caseína y κ -caseína), κ -caseína, β -lactoglobulina, proteína de suero, lactoalbúmina, lactoferrina, leche y leche en polvo, y combinaciones de las mismas.
- 20 3. El método según la reivindicación 1, en donde el carbohidrato se selecciona de uno o más del grupo que consiste en dextrosa, manitol, lactosa, trehalosa y sacarosa.
- 25 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en leche, muestra de líquido del útero, muestra de sangre entera, plasma, suero, muestra de líquido folicular ovárico, muestra de líquido seminal, líquido cefalorraquídeo, saliva, esputo, orina, efusiones pleurales, líquido intersticial, líquido sinovial, linfa y lágrimas.
- 30 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el medio de susceptibilidad comprende uno o más medios de crecimiento seleccionados del grupo que consiste en caldo de soja triptico, caldo Mueller Hinton.
- 35 6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el método comprende identificar bacterias Gram positivas y/o Gram negativas en la muestra y el agente estabilizante es leche.
- 40 7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde cuando la muestra biológica es leche no es necesario que la mezcla de reacción comprenda un agente estabilizante.
8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la infección es mastitis o metritis.
9. Un método según la reivindicación 8, en donde la mastitis o metritis es mastitis bovina o metritis bovina, y en donde la bacteria causante de la mastitis bovina o metritis bovina se selecciona de uno o más de los géneros consistentes en Streptococcus, Staphylococcus y bacterias Gram negativas.
- 45 10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el método comprende además una etapa de identificación de bacterias previa, paralela o posterior a la prueba de susceptibilidad antimicrobiana.
- 50 11. Un kit de prueba para realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en bacterias Gram positivas que causan infección en un ser humano o un animal no humano, comprendiendo el kit de prueba reactivos para realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en una muestra de prueba de un ser humano o un animal no humano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, junto con instrucciones de uso, en donde los reactivos comprenden un medio de crecimiento, un agente antimicrobiano, rojo de fenol y un agente estabilizador que comprende una proteína derivada de la leche o un extracto de proteína derivada de la leche, y en donde el rojo de fenol está presente en la mezcla de reacción del kit de prueba entre el 0,0035% y el 0,30%.
- 55 12. Un kit de prueba para realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en bacterias Gram negativas que causan infección en un ser humano o un animal no humano, comprendiendo el kit de prueba reactivos para realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en una muestra de prueba de un ser humano o un animal no humano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, junto con instrucciones de uso, en donde los reactivos comprenden un medio de crecimiento, un agente antimicrobiano, rojo de fenol y un agente estabilizador que comprende un hidrato de carbono, y en donde el rojo de fenol está presente en la mezcla de reacción del kit de prueba entre el 0,0035% y el 0,30%.
- 60

FIGURA 1

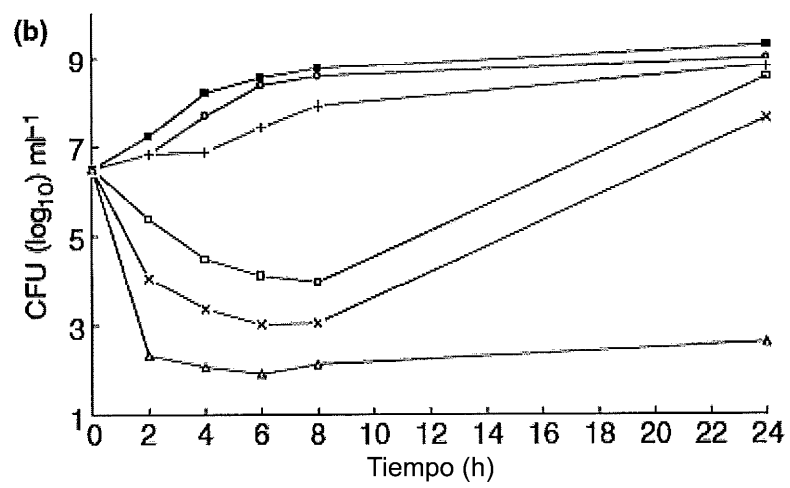


FIGURA 2

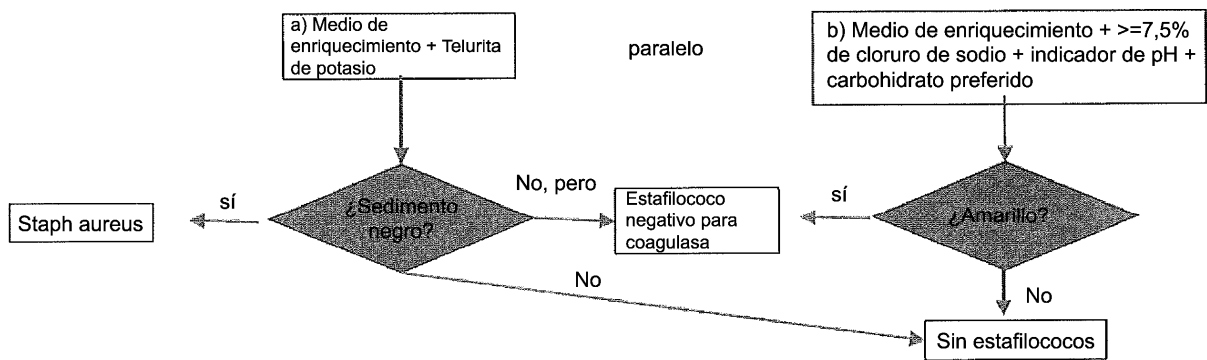


FIGURA 3

