



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 346 958**

51 Int. Cl.:  
**C12N 1/20** (2006.01)  
**C12Q 1/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02710944 .6**  
96 Fecha de presentación : **04.01.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1348018**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2003**

54 Título: **Medio de cultivo para la detección de las bacterias del género *Listeria*.**

30 Prioridad: **05.01.2001 FR 01 00121**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.10.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.10.2010**

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

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

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 346 958 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

Medio de cultivo para la detección de las bacterias del género *Listeria*.

5 La presente invención se refiere a un medio de cultivo cromógeno destinado a poner en evidencia las bacterias del género *Listeria*, en particular *Listeria monocytogenes*, siendo dicho medio un medio de cultivo sólido para la detección y/o la discriminación de bacterias del género *Listeria*, caracterizado porque comprende, en un medio de cultivo de *Listeria*, por lo menos un agente cromógeno seleccionado de entre los sustratos de la  $\alpha$ -manosidasa, y porque dicho agente cromógeno libera mediante hidrólisis un cromóforo precipitable seleccionado de entre los derivados indoxilo, 10 halógeno-indoxilo (bromo-indoxilo, cloro-indoxilo, fluoro-indoxilo, yodo-indoxilo, dicloro-indoxilo, cloro-bromo-indoxilo, tri-cloro-indoxilo), metil-indoxilo, o hidroxiquinolina.

15 Tanto en el campo clínico como en el campo agroalimentario, la búsqueda de *Listeria*, y en particular de *Listeria monocytogenes* es cada vez más importante, debido a que estas bacterias están diseminadas frecuentemente en unos productos agroalimentarios y conducen a unas infecciones graves en los pacientes sensibles (embarazadas, personas mayores, etc.).

20 De hecho, desde hace unos años, los gobiernos implantan unas redes de vigilancia cada vez más estrictas, en particular para los productos de la industria agroalimentaria. Así, se observa una generalización de la vigilancia epidemiológica de *Listeria monocytogenes*.

Por lo tanto, es importante disponer de un ensayo fiable y rápido que permita detectar las contaminaciones por estas bacterias, ensayo que debe de ser al mismo tiempo sensible y específico.

25 Existen hoy en día ciertos medios de cultivo para la detección de *Listeria*, tales como el PALCAM o el medio OXFORD más o menos selectivos que permiten detectar la presencia de *Listeria* en unas muestras. Los resultados obtenidos utilizando estos medios pueden presentar ciertas imprecisiones que implican la necesidad de efectuar otros ensayos para confirmar la presencia de *L. monocytogenes*.

30 Estos medios se basan en efecto en una combinación de antimicrobianos que aportan una selectividad y la detección de enzimas que aportan una especificidad. Sin embargo, al mismo tiempo la selectividad y la especificidad de estos medios pueden ser mejoradas, puesto que conducen en particular a la presencia de numerosos falsos positivos o falsos negativos. Una desventaja de estos medios es que no permiten la distinción de la especie *L. monocytogenes*.

35 Existen asimismo unos medios que incluyen un ensayo que se basa en la detección de fosfolipasas para detectar directamente *L. monocytogenes* mediante una coloración específica de la colonia o mediante un halo específico que rodea la colonia. Así, Restaino *et al.* (J Food Prot. marzo de 1999; 62(3): 244-51) describe un procedimiento de detección y/o de discriminación de las bacterias del género *Listeria* que comprende un medio de cultivo de *Listeria* que contiene un sustrato cromógeno y fluorógeno específico de identificación de la enzima fosfatidilinositol fosfolipasa C (PI-PLC). Sin embargo, estos ensayos son asimismo positivos para *L. ivanovii*, que presenta asimismo un carácter fosfolipasa +.

40 Se sugería diferenciar *L. monocytogenes* de *L. ivanovii* en una etapa de identificación según la etapa de aislamiento, utilizando en particular un ensayo basado en una diferencia en un fenotipo "aminopeptidasa".

45 Así, la patente US nº 5.330.889 se refiere a un procedimiento y a un medio de identificación de bacterias del género *Listeria* y en particular *Listeria monocytogenes*, comprendiendo dicho medio un sustrato cromógeno o fluorógeno capaz de ser hidrolizado por una glicina aminopeptidasa.

50 Por otro lado, Kämpfer (J Clin Microbiol. mayo de 1992; 30(5):1097-71) describe la utilización de un medio líquido que comprende un sustrato de la  $\alpha$ -manosidasa para la detección de bacterias del género *Listeria*. La composición específica del medio utilizado se da a conocer en Kämpfer *et al.* (J Clin Microbiol. diciembre de 1991; 29(12):2877-9), siendo el sustrato de la  $\alpha$ -manosidasa utilizado el agente fluorógeno 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-manopiranosido, que no es precipitable. Al contrario, es capaz de difundirse en el interior del medio sólido y por lo tanto no se puede utilizar en medio sólido.

55 Kerr *et al.* (J Med Microbiol. octubre de 1991; 35(4):193-6) describe asimismo la utilización de un medio líquido que comprende un sustrato de la  $\alpha$ -manosidasa para la detección de bacterias del género *Listeria*. En este caso, el sustrato de la  $\alpha$ -manosidasa utilizado es el *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosido, que tampoco es precipitable, pero que por el contrario, es capaz de difundirse en el interior del medio sólido y por lo tanto no se puede utilizar en medio sólido.

60 Con el fin de diferenciar *L. monocytogenes* de *L. ivanovii*, la presente invención se basa en la detección de la alfa manosidasa, un carácter positivo para *L. monocytogenes* y negativo para *L. ivanovii*. Este carácter puede ser revelado por ejemplo en unos cultivos puros con la ayuda del sustrato enzimático nitrofenil- $\alpha$ -manósido, que es incoloro y que libera un nitrofenilo coloreado en amarillo cuando el ensayo es positivo.

65 La presente invención demuestra que se puede revelar la  $\alpha$ -manosidasa a nivel de las colonias sobre medio sólido detectando la  $\alpha$ -manosidasa con un sustrato cromógeno en el medio sólido. La utilización de un sustrato de la  $\alpha$ -manosidasa en un medio sólido, descrita por primera vez en la presente solicitud, presenta en particular la ventaja de

## ES 2 346 958 T3

preparar unos medios sólidos en los que se pueden diferenciar a partir del aislamiento, sin tener que efectuar unos ensayos suplementarios, *L. monocytogenes* de *L. ivanovii*.

Así, la presente invención se refiere a un nuevo medio de cultivo sólido, para la detección y/o la discriminación de bacterias del género *Listeria*, caracterizado porque comprende, en un medio de cultivo de *Listeria*, por lo menos un agente cromógeno seleccionado de entre los sustratos de la  $\alpha$ -manosidasa, y porque dicho agente cromógeno libera mediante hidrólisis un cromóforo precipitable seleccionado de entre los derivados indoxilo, halógeno-indoxilo (bromo-indoxilo, cloro-indoxilo, fluoro-indoxilo, yodo-indoxilo, dicloro-indoxilo, cloro-bromo-indoxilo, tri-cloro-indoxilo), metil-indoxilo, o hidroxiquinolina. Así, la colonia bacteriana se colorea en función del cromóforo liberado, siendo el cromóforo liberado sólido en el medio de cultivo, y permaneciendo por lo tanto localizado a nivel de la colonia en la que ha sido liberado.

Unos derivados preferidos se seleccionan en particular de entre los derivados siguientes: 6-cloro-indoxilo, 5-bromo-indoxilo, 3-bromo-indoxilo, 6-fluoro-indoxilo, 5-yodo-indoxilo, 4,6-dicloro-indoxilo, 6,7-dicloro-indoxilo, 5-bromo-4-cloro-indoxilo, 5-bromo-6-cloro-indoxilo, 4,6,7-tricloro-indoxilo, N-metil-indoxilo y 8-hidroxiquinolina.

De manera preferida, el sustrato de la  $\alpha$ -manosidasa es el indoxil- $\alpha$ -manósido. La concentración del agente cromógeno en el medio está comprendida entre aproximadamente 0,01 y 0,5 g/l. Una concentración preferida es 0,05 g/l.

Asimismo, puede ser interesante añadir un activador de reacción coloreado, en el medio, con el fin de mejorar la calidad de la reacción observada. Un activador apropiado para dicha utilización es el metil- $\alpha$ -manósido, que se integra en el medio a una concentración comprendida entre aproximadamente 0,01 y 0,5 g/l, preferentemente 0,25 g/l.

El medio según la presente invención permite así detectar *L. monocytogenes*, y discriminar esta bacteria con relación a *L. ivanovii*, sin efectuar ningún ensayo suplementario. Con el fin de optimizar los resultados proporcionados por el medio según la invención, puede ser interesante añadir unos factores selectivos para *Listeria*, tal como se utiliza en los medios de la técnica anterior. Se obtiene por lo tanto un medio específico para *L. monocytogenes*.

La invención tiene asimismo por objeto la utilización de un medio de cultivo según la invención para la detección y/o la discriminación de las bacterias del género *Listeria*, en particular *L. monocytogenes*.

La presente invención tiene asimismo por objeto un procedimiento de detección y/o de discriminación de las bacterias del género *Listeria* en una muestra, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

- a. inocular un medio de cultivo según la invención con dicha muestra o un inóculo derivado de la muestra,
- b. detectar la presencia de bacterias del género *Listeria* en dicho medio de cultivo,
- c. de manera opcional, diferenciar *L. monocytogenes* de *L. ivanovii* y otras *Listeria* presentes en dicho medio de cultivo.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

Un medio preferido para la realización de la invención comprende (para un litro):

- Agar	10 g
- Infusión de seso de ternera	12,5 g
- Proteosa peptona	10 g
- Infusión de corazón de buey	5 g
- Cloruro de sodio	5 g
- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4 g
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
- Glucosa	2 g
- Cloruro de litio	7,5 g
- Lecitina	3 g

## ES 2 346 958 T3

	- Ofloxacina	0,0004 g
	- Colistina	0,015 g
5	- Ceftazidima	0,0134 g
	- Metil- $\alpha$ -manósido	0,25 g
10	- Indoxil- $\alpha$ -manósido	0,05 g

### Ejemplo 2

15 El esparcimiento de bacterias sobre el medio según la invención ha dado los resultados siguientes (24 horas de incubación a 37°C).

	Halo	Centro de las colonias
20 <i>L. monocytogenes</i>	blanco	azul
<i>L. ivanovii</i>	blanco	incoloro
25 Otras <i>Listeria</i>	ningún halo	-----

30 La utilización del medio según la invención permite por lo tanto detectar y discriminar *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, y las demás especies de *Listeria*.

REIVINDICACIONES

1. Medio de cultivo sólido para la detección y/o la discriminación de bacterias del género *Listeria*, **caracterizado** porque comprende, en un medio de cultivo de *Listeria*, por lo menos un agente cromógeno seleccionado de entre los sustratos de la  $\alpha$ -manosidasa, y porque dicho agente cromógeno libera mediante hidrólisis un cromóforo precipitable seleccionado de entre los derivados indoxilo, halógeno-indoxilo (bromo-indoxilo, cloro-indoxilo, fluoro-indoxilo, yodo-indoxilo, dicloro-indoxilo, cloro-bromo-indoxilo, tri-cloro-indoxilo), metil-indoxilo, o hidroxiquinolina.

2. Medio de cultivo según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho agente cromógeno libera, mediante hidrólisis, un cromóforo precipitable seleccionado de entre los derivados 6-cloro-indoxilo, 5-bromo-indoxilo, 3-bromo-indoxilo, 6-fluoro-indoxilo, 5-yodo-indoxilo, 4,6-dicloro-indoxilo, 6,7-dicloro-indoxilo, 5-bromo-4-cloro-indoxilo, 5-bromo-6-cloro-indoxilo, 4,6,7-tricloro-indoxilo, N-metil-indoxilo u 8-hidroxiquinolina.

3. Medio de cultivo según una de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado** porque dicho medio contiene asimismo un activador de reacción coloreado.

4. Medio de cultivo según la reivindicación 3, **caracterizado** porque dicho activador es el metil- $\alpha$ -manósido.

5. Medio de cultivo según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque comprende además unos factores selectivos para *Listeria*.

6. Medio de cultivo según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque el sustrato de la  $\alpha$ -manosidasa es el indoxil- $\alpha$ -manósido.

7. Medio de cultivo según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque comprende (para un litro):

- Agar	10 g
- Infusión de seso de ternera	12,5 g
- Proteosa peptona	10 g
- Infusión de corazón de buey	5 g
- Cloruro de sodio	5 g
- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4 g
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
- Glucosa	2 g
- Cloruro de litio	7,5 g
- Lecitina	3 g
- Ofloxacina	0,0004 g
- Colistina	0,015 g
- Ceftazidima	0,0134 g
- Metil- $\alpha$ -manósido	0,25 g
- Indoxil- $\alpha$ -manósido	0,05 g

8. Medio de cultivo según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque es específico de *L. monocytogenes*.

9. Utilización de un medio de cultivo según una de las reivindicaciones 1 a 8, para la detección y/o la discriminación de las bacterias del género *Listeria*.

10. Procedimiento de detección y/o de discriminación de las bacterias del género *Listeria* en una muestra, **caracterizado** porque comprende las etapas que consisten en:

a. inocular un medio de cultivo según una de las reivindicaciones 1 a 8, con dicha muestra o un inóculo derivado de la muestra,

## ES 2 346 958 T3

- b. detectar la presencia de bacterias del género *Listeria* en dicho medio de cultivo,
- c. de manera opcional, diferenciar *L. monocytogenes* de *L. ivanovii* y de las demás *Listeria* presentes en dicho medio de cultivo.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65