

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 900 493**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/06 (2006.01)

C12Q 1/10 (2006.01)

C12Q 1/40 (2006.01)

C12M 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.04.2018** **PCT/US2018/025641**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2018** **WO18187197**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2018** **E 18720694 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.11.2021** **EP 3607083**

54 Título: **Detección rápida de E. coli en un dispositivo de cultivo de película fina**

30 Prioridad:

03.04.2017 US 201762480633 P

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

17.03.2022

73 Titular/es:

3M INNOVATIVE PROPERTIES COMPANY
(100.0%)

3M Center Post Office Box 33427
Saint Paul, Minnesota 55133-3427, US

72 Inventor/es:

CHANDRAPATI, SAILAJA;
TEAGARDEN, ALEC J. y
SADDORIS, HALEY A.

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 900 493 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

Detección rápida de *E. coli* en un dispositivo de cultivo de película fina

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de los EE. UU. núm. 62/480.633, presentada el 3 de abril de 2017.

10 Antecedentes

En las pruebas de seguridad de alimentos y bebidas, la presencia o ausencia de bacterias coliformes se considera una prueba importante de calidad. La cantidad de bacterias coliformes permitidas en las bebidas y en determinados alimentos (por ejemplo, productos lácteos) está regulada en muchos países en todo el mundo. Las bacterias coliformes incluyen coliformes fecales, tales como *Escherichia coli*. La presencia de coliformes fecales en una muestra de alimento o agua se usa como un indicador principal de contaminación fecal del alimento o agua y de la posible presencia de otros microorganismos patógenos.

Los métodos para detectar, identificar y/o enumerar microorganismos en las muestras de alimento varían frecuentemente según la naturaleza del alimento y los tipos de microorganismos que probablemente se encuentren en las muestras. Los compendios de los métodos de ensayo de muestras de alimento incluyen *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, 27ª edición sup., publicada por The American Public Health Association, Washington, D.C., y el *Bacteriological Analytical Manual* ("BAM"), publicado por la U.S. Food and Drug Administration, Washington, D.C. Los alimentos sólidos usualmente se suspenden en medios acuosos y se mezclan y/o pulverizan para obtener un homogenato líquido del material alimenticio, que puede usarse en métodos de análisis microbiano cuantitativo.

Las placas de recuento de *E. coli*/Coliformes 3M™ PETRIFILM™ constituyen un sistema de medio de cultivo preparado listo para la enumeración de bacterias *E. coli* y coliformes. Contienen nutriente de lactosa biliar rojo violeta, un agente gelificante en agua fría, cloruro de trifeniltetrazolio, un indicador que colorea las colonias bacterianas en rojo y BCIG, un indicador que colorea de azul *E. coli*.

La patente US-5.510.243 describe un proceso y un medio para la determinación simultánea del número y presencia de coliformes fecales vivos y *Escherichia coli* en una muestra que comprende 6-O-alfa-D-galactopiranosil-D-glucosa o isopropil-beta-D-tiogalactosido como un inductor de galactosidasa y metil-beta-D-glucurónido como un inductor de glucuronidasa. El medio semisólido estéril comprende también inhibidores bacterianos no objetivo, potenciadores bacterianos objetivo y múltiples sustratos fluorógenos y/o cromógenos que producen color y fluorescencia tras la escisión por una enzima específica expresada por las bacterias objetivo.

La patente US-6090541A describe el uso conjunto de un colorante precipitable y un colorante de contraste para mejorar la visualización de placas en lechos confluentes de bacterias en ensayos de bacteriófagos y bacterias. El medio puede comprender un inductor para una enzima capaz de escindir enzimáticamente el colorante precipitable.

Los métodos mencionados anteriormente, sin embargo, generalmente son relativamente caros, conllevan múltiples etapas, requieren períodos de incubación de aproximadamente 24 a 48 horas antes de poder contar las colonias, y/o requieren instrumentación relativamente sofisticada y/o personal relativamente muy cualificado.

Se necesitan métodos más rápidos para enumerar microorganismos coliformes y *E. coli* viables en muestras de alimentos y bebidas.

50 Resumen

Generalmente, la presente descripción se refiere a la detección y enumeración opcional de microorganismos en una muestra. Particularmente, la presente invención se refiere a dispositivos de cultivo que pueden usarse para cultivar unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias coliformes en un medio de cultivo semisólido y para enumerar diferencialmente las UFC de coliformes y las UFC de *E. coli*. El dispositivo de cultivo de la invención incluye una pluralidad de compuestos que mejoran la actividad de β -glucuronidasa en *E. coli* y es particularmente útil para detectar y diferenciar colonias de *E. coli* I positivas a la β -glucuronidasa, por ejemplo *E. coli* positivas a la β -glucuronidasa inducibles y constitutivas, proporcionando, de esta manera, recuentos más precisos de los microorganismos presentes en una muestra. El medio de cultivo contiene, típicamente, TTC, que puede permitir la diferenciación y visualización de bacterias coliformes no productoras de beta glucuronidasa. Además, el medio de cultivo usado en el dispositivo proporciona, típicamente, una detección y enumeración más rápidas de bacterias coliformes y *E. coli* que los dispositivos de cultivo de película fina anteriores

La presente descripción también describe métodos para usar los dispositivos de cultivo. Los métodos descritos en la presente descripción proporcionan crecimiento, detección y diferenciación de bacterias coliformes y *E. coli*. Los métodos permiten una enumeración más rápida y más precisa de colonias de coliformes y de *E. coli* a múltiples

temperaturas (p. ej., 35-37 y 42-44C) que los métodos anteriores que usaban dispositivos de cultivo de película delgada para enumerar colonias de coliformes y de *E. coli*. En un aspecto, la presente descripción proporciona un dispositivo para enumerar diferencialmente colonias de microorganismos coliformes y de *Escherichia coli*. El dispositivo puede comprender una primera lámina impermeable al agua; una segunda lámina impermeable al agua unida a la primera lámina; un medio de cultivo seco y rehidratable que comprende un primer agente gelificante soluble en agua fría adherido a la primera lámina; una zona de crecimiento microbiano dispuesta entre la primera lámina y la segunda lámina; y un segundo agente gelificante soluble en agua fría adherido a la segunda lámina. El medio de cultivo puede comprender nutrientes organonitrogenados que facilitan el crecimiento de microorganismos coliformes, un sistema indicador de fermentación de lactosa, un sistema indicador de β -D-glucuronidasa, indicador de cloruro de tetrazolio y una cantidad eficaz de al menos un agente que inhibe selectivamente el crecimiento de microorganismos no coliformes. Un área del medio de cultivo adherida a la primera lámina define la zona de crecimiento. El sistema indicador de fermentación de lactosa comprende D-lactosa, un primer compuesto inductor que mejora la producción de β -galactosidasa y un indicador de pH. El sistema indicador de β -D-glucuronidasa comprende 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido y una pluralidad de compuestos que potencian la actividad enzimática de β -glucuronidasa en *E. coli*. La primera lámina se une a la segunda lámina de manera que el medio de cultivo se orienta hacia el segundo agente gelificante soluble en agua fría. La primera lámina y la segunda lámina se configuran para retardar el paso de dióxido de carbono a través de ellas.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, al menos uno de la pluralidad de compuestos que mejoran la actividad enzimática de β -glucuronidasa en *E. coli* es el ácido D-glucurónico. En cualquiera de las realizaciones anteriores, la primera lámina y/o la segunda lámina pueden comprender una película de poliéster. En cualquiera de las realizaciones anteriores, la segunda lámina puede comprender tereftalato de polietileno. En cualquiera de las realizaciones anteriores, la zona de crecimiento puede definirse por un espaciador adherido a la primera lámina. En cualquiera de las realizaciones anteriores, el medio de cultivo comprende además un reactivo para tamponar el medio de cultivo, cuando se reconstituye con un líquido acuoso, a un pH entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 8. En cualquiera de las realizaciones anteriores, los nutrientes organonitrogenados se seleccionan de un grupo que consiste en extracto de levadura, peptonas porcinas, un digesto enzimático de gelatina, un digesto enzimático de peptona animal y una combinación de dos o más de los nutrientes organonitrogenados anteriores. En cualquiera de las realizaciones anteriores, el agente se puede seleccionar de un grupo que consiste en sales biliares, dodecilsulfato de sodio y combinaciones de los mismos.

La presente descripción describe un método para enumerar diferencialmente colonias de microorganismos coliformes y *Escherichia coli* a través de la reducción de TTC y la expresión de beta glucuronidasa constitutiva e inducible, respectivamente.

Las palabras “preferido” y “preferible” se refieren a las realizaciones de la invención que pueden dar como resultado determinados beneficios, en determinadas circunstancias. No obstante, otras realizaciones también pueden ser preferidas en las mismas u otras circunstancias. Además, la enumeración de una o más realizaciones preferidas no implica que otras realizaciones no sean útiles y no se prevé que excluyan otras realizaciones del alcance de la invención.

Los términos “comprende” y variaciones de los mismos no tienen un significado limitativo cuando estos términos aparecen en la descripción y en las reivindicaciones.

Como se utiliza en la presente memoria, “un”, “uno”, “el”, “al menos uno”, y “uno o más” se usan indistintamente. Por tanto, por ejemplo, un nutriente puede interpretarse con el significado de “uno o más” nutrientes.

El término “y/o” significa uno o todos los elementos relacionados o una combinación de dos cualquiera o más de los elementos relacionados.

También en la presente memoria, la enumeración de intervalos numéricos mediante puntos extremos incluye todos los números subsumidos dentro de ese intervalo (p. ej. 1 a 5 incluye 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,80, 4, 5, etc.).

El resumen anterior de la presente invención no pretende describir cada realización descrita ni cada implementación de la presente invención. La descripción que se ofrece a continuación muestra de un modo más concreto las realizaciones ilustrativas. En algunos puntos de la solicitud se proporcionan directrices mediante listas de ejemplos, cuyos ejemplos se pueden utilizar en varias combinaciones. En cada caso, la lista enumerada sirve únicamente de grupo representativo y no debe interpretarse como una lista exclusiva.

En los dibujos adjuntos y la descripción que se da más adelante se exponen detalles adicionales de estas u otras realizaciones. Otras características, objetos y ventajas resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención puede ilustrarse en mayor detalle mediante referencia a los dibujos adjuntos, en donde:

La Fig. 1 es una vista en perspectiva superior, parcialmente en sección, de un dispositivo de cultivo microbiológico preferido de la presente descripción;

5 la Fig. 2 es una vista en sección transversal del dispositivo de la Fig. 1;

la Fig. 3 es una vista superior de un patrón de cuadrículas que puede imprimirse sobre la primera lámina o la segunda lámina del dispositivo de la Fig. 1.

10 Si bien las figuras arriba identificadas exponen varias realizaciones de la presente descripción, se contemplan también otras realizaciones, como se indica en la descripción. En todos los casos, esta exposición presenta la invención por vía de la representación y no de la limitación. Debe comprenderse que los expertos en la técnica pueden concebir muchas otras modificaciones y realizaciones que forman parte del alcance y espíritu de los principios de la invención. Las figuras pueden no estar dibujadas a escala.

15 Descripción detallada

Antes de que se explique cualquiera de las realizaciones de la presente descripción con detalle, se entenderá que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y la disposición de los componentes
20 expuesta en la siguiente descripción o ilustrada en los siguientes dibujos. La invención es capaz de otras realizaciones y se puede poner en práctica o se puede realizar de diversas maneras. Asimismo, debe entenderse que la redacción y terminología usadas en la presente memoria tienen fines de descripción y no deben considerarse como una limitación. En la presente memoria, el uso de “que incluye”, “que comprende”, o “que tiene” y variaciones de los mismos abarca los artículos que se indican a continuación y equivalentes de los mismos así como los
25 artículos adicionales. Salvo que se indique o se limite de otra forma, los términos “conectado” y “acoplado”, y variaciones de los mismos, se usan de forma amplia y abarcan conexiones y acoplamientos, tanto directos como indirectos. Además, “conectado” y “acoplado” no están restringidos a las conexiones o acoplamientos físicos o mecánicos. Cabe entenderse que pueden utilizarse otras realizaciones y hacerse cambios estructurales o lógicos sin abandonar el ámbito de la presente descripción. Además, términos tales como “delante”, “detrás”, “arriba”, “abajo”,
30 y similares se utilizan solamente para describir elementos según se relacionan entre sí, pero en forma alguna obligan a indicar orientaciones específicas del aparato, a indicar o implicar orientaciones necesarias o requeridas del aparato, o especificar cómo la invención descrita en la presente memoria se va a usar, montar, visualizar o colocar durante el uso.

35 El término “cultivo” o “crecimiento” de microorganismos, como se usa en la presente descripción, se refiere al método de multiplicación de organismos microbianos dejando que se reproduzcan en medios de cultivo predeterminados en condiciones que favorecen su crecimiento. Más particularmente, es el método para proporcionar un medio de cultivo y condiciones adecuadas para facilitar al menos una división celular de un microorganismo. Los medios de cultivo son medios sólidos, semisólidos o líquidos que contienen todos los
40 nutrientes y los parámetros de crecimiento físico necesarios para el crecimiento microbiano.

El término “enriquecimiento”, como se usa en la presente descripción, se refiere al método de cultivo para enriquecer selectivamente el crecimiento de un microorganismo específico proporcionando un medio y condiciones con propiedades específicas y conocidas que favorecen el crecimiento de ese determinado
45 microorganismo. El ambiente del cultivo de enriquecimiento influirá positivamente en el crecimiento de un microorganismo seleccionado y/o influirá negativamente en el crecimiento de otros microorganismos.

La presente descripción se refiere generalmente a métodos de cultivo y detección y enumeración diferenciada de colonias de coliformes y *E. coli* en un dispositivo de cultivo de película delgada que contiene un agente gelificante
50 soluble en agua fría.

“Bacterias coliformes” se refiere en conjunto a un grupo de varios géneros (p.ej., *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Escherichia*) de bacterias que tienen la capacidad de fermentar lactosa con una producción resultante de ácido y gas. La mayoría de las bacterias coliformes se consideran generalmente no
55 patógenas para los seres humanos. Sin embargo, algunas bacterias coliformes (p. ej., *Escherichia coli*) incluyen cepas que son altamente patógenas. Los coliformes se encuentran en la materia fecal de los mamíferos y se usan comúnmente como indicador de la contaminación fecal de alimentos y/o agua.

Los materiales de muestra adecuados pueden obtenerse o derivarse de diversas fuentes. El término “fuente” se usa, generalmente, para referirse al alimento o no alimento cuyo análisis de microorganismos se desea llevar a cabo. La fuente
60 puede ser un material sólido, líquido, semisólido, gelatinoso, un gas (p. ej., aire) y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la fuente puede proporcionarse mediante un elemento de captura que se ha usado, por ejemplo, para recolectar la fuente de una superficie de interés o del aire. En algunas realizaciones, la composición líquida puede incluir el elemento de captura, que puede fraccionarse además (p. ej., durante un proceso de agitación o disolución) para
65 mejorar la recuperación de la fuente y los microorganismos de interés. La superficie de interés puede incluir al menos una parte de diversas superficies, incluidas, aunque no de forma limitativa, paredes (incluidas puertas), suelos, techos,

drenajes, sistemas de refrigeración, conductos (p. ej., conductos de aire), ventilaciones, asientos de inodoro, mangos, pomos de puerta, pasamanos, encimeras, superficies de mesas, superficies para comer (p. ej., bandejas, platos, etc.), superficies de trabajo, superficies de equipos, ropa, etc., y combinaciones de los mismos. En el método puede usarse la totalidad o una parte de la fuente. Cuando se usa una parte de la fuente, algunas veces puede denominarse como una “muestra” de la fuente. Sin embargo, el término “muestra” se usa generalmente en la presente descripción en referencia a la parte de volumen o masa de material que se obtiene de la fuente y se introduce en un dispositivo de prueba para la detección de microorganismos.

El término “alimento” se usa generalmente en referencia a una composición comestible sólida, líquida (p. ej., incluidas, aunque no de forma limitativa, soluciones, dispersiones, emulsiones, suspensiones, etc., y combinaciones de las mismas) y/o semisólida. Los ejemplos de alimentos incluyen, aunque no de forma limitativa, carnes, aves de corral, huevos, pescado, mariscos, vegetales, frutas, alimentos preparados (p. ej., sopas, salsas, pastas), productos de grano (p. ej., harina, cereales, panes), alimentos enlatados, leche, otros productos lácteos (p. ej., queso, yogur, crema agria), grasas, aceites, postres, condimentos, especias, pastas, bebidas, agua, cerveza, alimento para animales, otros materiales comestibles adecuados y combinaciones de los mismos.

El término “TTC” es una abreviatura del colorante triphenyl tetrazolium chloride (cloruro de trifeniltetrazolio).

Un tipo de dispositivos de cultivo de película fina conocido en la técnica, que comprende dos láminas contiguas con medio de cultivo seco adherido entre ellas, se describe en la patente US-4.565.783. Estos dispositivos son útiles para cultivar, detectar y enumerar diversos microorganismos incluidos, por ejemplo, bacterias aerobias totales o bacterias coliformes.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un dispositivo. Las Figs. 1 y 2 ilustran una realización de un dispositivo según la presente descripción. El dispositivo 10 de crecimiento microbiológico incluye un miembro de cuerpo que comprende una primera lámina 12 autoportante impermeable que tiene superficies superior e inferior. La primera lámina 12 preferiblemente es una película relativamente rígida de un material como poliéster, polipropileno o poliestireno que no absorberá ni se verá afectado de cualquier otra manera por el agua. Se ha descubierto que funcionan bien las películas de poliéster de aproximadamente 0,1 mm a 0,18 mm de espesor, películas de polipropileno de aproximadamente 0,1 mm a 0,2 mm de espesor y películas de poliestireno de aproximadamente 0,38 mm de espesor. Otras primeras láminas adecuadas incluyen papel fotográfico con un polietileno u otro recubrimiento impermeable, como se describe en la patente US-4.565.783. La primera lámina 12 puede ser transparente u opaca, dependiendo de si se desea ver colonias bacterianas a través de la primera lámina. Para facilitar el recuento de colonias bacterianas, la primera lámina 12 puede tener un patrón (p. ej., un patrón de rejilla cuadrada) impreso en ella, como se muestra en la Fig. 3.

Adherido a la primera lámina 12 se encuentra un medio 16 de cultivo que comprende un primer agente gelificante soluble en agua fría descrito en la presente descripción. Además, adherida (ya sea directa o indirectamente) a la primera lámina 12 del dispositivo 10 se encuentra una segunda lámina 22. La segunda lámina 22 preferiblemente es transparente para facilitar el recuento de las colonias bacterianas en el dispositivo y es sustancialmente impermeable a las bacterias y al vapor de agua. Como se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, “sustancialmente impermeable a las bacterias y al vapor de humedad” designa segundas láminas que evitan la contaminación no deseada (p. ej., contaminación microbiana) del medio deshidratado durante el transporte, almacenamiento y uso de los dispositivos y que proporcionan un ambiente que favorecerá el crecimiento de microorganismos durante el período de incubación.

Por lo general, la segunda lámina 22 tendrá propiedades similares a la primera lámina 12, pero no tiene por qué ser tan rígida. Los materiales adecuados para la segunda lámina 22 incluyen películas plásticas tales como, por ejemplo, polipropileno (p. ej., biaxially-oriented polypropylene [polipropileno orientado biaxialmente – BOPP] de 40 μm de espesor) y poliéster (p. ej., polyethylene terephthalate [tereftalato de polietileno – PET] que tiene un espesor de aproximadamente 70 μm). La densidad del PET (p. ej., aproximadamente 1,38 g/mm³) es, frecuentemente, mayor que la densidad del BOPP (p. ej., aproximadamente 0,92 g/mm³). Opcionalmente, la primera lámina 12 y la segunda lámina 22 se configuran para retardar el paso de dióxido de carbono a través de ellas. De forma ventajosa, un dispositivo construido con la primera y segunda láminas que están configuradas para retardar el paso de dióxido de carbono a través de ellas es más eficaz para atrapar dióxido de carbono biogénico (p. ej., dióxido de carbono producido por la fermentación de un carbohidrato) adyacente a una colonia en el dispositivo que ha producido el dióxido de carbono biogénico (p. ej., por la fermentación de lactosa presente en el dispositivo).

Opcionalmente, la primera lámina 12 se recubre en una de sus superficies principales con una capa de un adhesivo 14 que sirve para mantener un medio 16 de cultivo seco y rehidratable sobre la primera lámina en una monocapa uniforme para facilitar la hidratación. Alternativamente, el adhesivo 14 puede revestirse sobre la segunda lámina 22 y el medio de cultivo revestirse sobre la primera lámina 12. En cualquier caso, el adhesivo 14 y el adhesivo 24 preferiblemente son insolubles en agua y no inhiben el crecimiento de microorganismos. Preferiblemente, los adhesivos son lo suficientemente transparentes cuando están húmedos como para permitir la visualización de colonias bacterianas a través de la película recubierta con el adhesivo. Los adhesivos adecuados para usar en el adhesivo 14 y el adhesivo 24 incluyen, por ejemplo, adhesivos sensibles a la presión. Sin embargo, pueden usarse también adhesivos activados por calor en donde una

sustancia de punto de fusión más bajo recubre una sustancia de punto de fusión más alto. También pueden ser útiles los adhesivos activados con agua, tales como mucilago. El adhesivo 14 contiene preferiblemente TTC, aunque ocasionalmente se usan otros aditivos o colorantes. A diferencia de algunos casos de los que se ha escrito previamente, los dispositivos de cultivo de la invención y los métodos descritos en la presente descripción no requieren la adición de ácido pirúvico ni piruvatos. En muchos casos preferidos, los dispositivos de cultivo de la invención descritos en la presente descripción, así como los métodos en los que se usan, están libres de ácido pirúvico y sus sales. El adhesivo 14 (que contiene usualmente TTC) debe recubrirse sobre la primera lámina 12 o la segunda lámina 22, según sea el caso, en un espesor que no interfiera sustancialmente con o evite la observación (p. ej., observación manual o mecánica) de colonias microbianas que crecen en el dispositivo y/o no interfiera sustancialmente con o evite la transmisión de radiación electromagnética (p. ej., luz visible) que se usa para observar las colonias microbianas. Típicamente, cuando la primera lámina 12 se recubre con el adhesivo 14, sigue un segundo recubrimiento de medio de cultivo celular. Un ejemplo no limitativo de un adhesivo adecuado para usar en un dispositivo de la presente descripción es un copolímero de isooctilacrilato/acrilamida (en una relación molar de 94/6). Otros adhesivos sensibles a la presión que pueden usarse incluyen isooctilacrilato/ácido acrílico (en una relación molar de 95/5 o 94/6) y caucho de silicona. Los adhesivos que se vuelven lechosos al exponerse al agua son menos preferidos, pero pueden usarse en conjunto con una primera lámina no transparente o cuando no se requiere visualización de colonias.

Recubierto sobre al menos una parte del adhesivo opcional 14 (que usualmente contiene TTC y/o directamente sobre la primera lámina 12 se encuentra un recubrimiento que comprende un medio 16 de cultivo seco y rehidratable. El medio 16 de cultivo seco está sustancialmente exento de agua. Como se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la expresión “sustancialmente exento de agua” designa un recubrimiento que tiene un contenido de agua no superior a aproximadamente el contenido de agua del recubrimiento deshidratado una vez que se ha dejado equilibrar con el medio ambiente. Se desea una monocapa uniforme de medio 16 de cultivo seco para garantizar la uniformidad de los medios de cultivo rehidratados. El medio de cultivo seco y rehidratable debe tener suficiente área superficial expuesta en una zona de crecimiento microbiano para la hidratación durante el uso. Generalmente, es adecuada una capa adhesiva en el intervalo de espesor de aproximadamente 5 µm a aproximadamente 13 µm.

Como alternativa a la realización ilustrativa de las Figs. 1 y 2, se contempla que un dispositivo de la presente descripción pueda comprender un pedestal con el medio de cultivo dispuesto sobre él y pueda ensamblarse de manera similar al dispositivo de cultivo descrito en la patente US-6.632.661.

La segunda lámina 22, como se ilustra, se recubre con capas de adhesivo 24 (adhesivo 24 que contiene preferiblemente y más comúnmente TTC) y polvo 26. El adhesivo 24 debe recubrirse sobre la segunda lámina 22 en un espesor que no interfiera sustancialmente con o evite la observación (p. ej., observación manual o mecánica) de colonias microbianas que crecen en el dispositivo y/o no interfiera sustancialmente con o evite la transmisión de radiación electromagnética (p. ej., luz visible) que se usa para observar las colonias microbianas. Generalmente, es adecuada una capa adhesiva en el intervalo de espesor de aproximadamente 5 µm a aproximadamente 13 µm.

El polvo 26 comprende un segundo agente gelificante soluble en agua fría seco. El segundo agente gelificante soluble en agua fría tiene propiedades similares al primer agente gelificante soluble en agua fría y puede comprender un agente gelificante soluble en agua fría que es idéntico al primer agente gelificante soluble en agua fría. El polvo 26 se adhiere a la segunda lámina 22 (p. ej., se adhiere al adhesivo 24 que se adhiere a la segunda lámina 22). El polvo 26 se recubre sobre el adhesivo 24 como se describe en la patente US-4.565.783. Se prefiere una monocapa uniforme de polvo seco 26. El polvo 26 debe tener suficiente área de superficie expuesta en una zona de crecimiento microbiano para actuar en combinación con el medio 16 de cultivo seco absorber un volumen predefinido de un líquido acuoso depositado en la zona de crecimiento durante el uso del dispositivo.

Como se utiliza en la especificación y en las reivindicaciones, el término “polvo” designa un material en forma de partículas finamente dividido que tiene un diámetro promedio inferior a 400 micrómetros. Como se utiliza en la especificación y en las reivindicaciones, el término “soluble en agua fría” designa un material que forma una solución en agua a temperatura ambiente.

La zona de crecimiento microbiano es la región en el dispositivo en la cual se coloca la muestra durante la inoculación del dispositivo. La primera lámina 12 y la segunda lámina 22 encierran la zona de crecimiento microbiano, con el medio de cultivo 16 y el polvo 26 uno frente al otro en la zona de crecimiento microbiano. Típicamente, la zona de crecimiento microbiano se separa de los bordes de la primera lámina 12 y la segunda lámina 22 para evitar la contaminación de la muestra y/o evitar fugas de la muestra fuera del dispositivo. Después de colocar un líquido acuoso (p. ej., que contiene la muestra que se va a analizar) en la zona de crecimiento microbiano, el medio 16 de cultivo seco y rehidratable y el polvo 26 en la zona de crecimiento microbiano se hidratan mediante el líquido para formar un medio de cultivo semisólido para cultivar colonias bacterianas coliformes. La zona de crecimiento microbiano está libre de matrices que evitan la visualización de las colonias bacterianas.

En cualquier realización, la zona de crecimiento microbiano viene definida opcionalmente por un elemento espaciador aplicado a la superficie de la primera lámina 12 sobre la cual se recubre el medio 16 de cultivo seco. El elemento espaciador comprende una pieza de espaciador 18 que tiene una abertura 20 (p. ej., una abertura circular, una abertura cuadrada, una abertura rectangular) cortada a través del centro para exponer el medio 16 de cultivo seco. Las paredes de la abertura 20 proporcionan una cavidad de tamaño y forma predeterminados para confinar el medio después de la hidratación. El espaciador 18 debe ser lo suficientemente grueso como para formar un pocillo del volumen deseado, p. ej., aproximadamente 1 mililitro, aproximadamente 2 mililitros, aproximadamente 3 mililitros o aproximadamente 5 mililitros. La espuma de polietileno de celda cerrada es un ejemplo de un material adecuado para el espaciador 18, pero puede usarse cualquier material que sea hidrófobo (no humectante), inerte a los microorganismos y capaz de soportar la esterilización. La abertura 20 forma un perímetro de la zona de crecimiento microbiano en el dispositivo de cultivo. Al recibir el volumen deseado (predeterminado), el dispositivo forma un medio de cultivo hidratado que facilita el crecimiento y la enumeración de colonias de coliformes.

El medio 16 de cultivo seco y rehidratable comprende nutrientes organonitrogenados que facilitan el crecimiento de microorganismos coliformes, una cantidad eficaz de al menos un agente que inhibe selectivamente el crecimiento de microorganismos no coliformes, y un primer agente gelificante soluble en agua fría.

Los nutrientes organonitrogenados del medio 16 de cultivo proporcionan una recuperación rápida (p. ej., a partir del estrés por calor, estrés por pH, estrés por agua) y el crecimiento de microorganismos coliformes. Los nutrientes organonitrogenados proporcionan, por ejemplo, aminoácidos y/u oligopéptidos y/o vitaminas. Los ejemplos no limitativos de nutrientes organonitrogenados adecuados en cualquier realización de un dispositivo según la presente descripción incluyen extracto de levadura, peptonas porcinas, un digesto enzimático de gelatina, un digesto enzimático de peptona animal y una combinación de cualesquiera dos o más de los nutrientes organonitrogenados anteriores.

El medio 16 de cultivo de los dispositivos de la presente descripción incluye una cantidad eficaz de al menos un agente que inhibe selectivamente el crecimiento de microorganismos no coliformes. El agente proporciona una ventaja competitiva para el crecimiento de microorganismos coliformes, con respecto al menos a un microorganismo no coliforme, en el dispositivo de la presente descripción. Estos agentes selectivos, que incluyen antibióticos, por ejemplo, son muy conocidos para una persona con experiencia en la técnica. En cualquier realización, el agente comprende sales biliares, dodecilsulfato de sodio, o una combinación de sales biliares y dodecilsulfato de sodio. La cantidad eficaz se selecciona de manera que, cuando un volumen predeterminado de líquido acuoso se deposita en la zona de crecimiento, el medio de cultivo rehidratado tiene una concentración del al menos un agente suficientemente alta como para inhibir selectivamente el crecimiento de microorganismos no coliformes, pero no tan alta como para inhibir sustancialmente el crecimiento de microorganismos coliformes (es decir, los microorganismos coliformes forman colonias observables e identificables en un período de aproximadamente 24 horas de incubación a una temperatura de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 45 °C).

El medio 16 de cultivo de los dispositivos de la presente descripción es soluble en agua fría. La "solubilidad en agua fría" del medio de cultivo empleado en los dispositivos de la presente invención incluye un primer agente gelificante soluble en agua fría en el medio de cultivo. Los primeros agentes gelificantes solubles en agua fría adecuados para su inclusión en el medio 16 de cultivo incluyen tanto agentes gelificantes naturales como sintéticos que forman soluciones en agua a temperatura ambiente. Los agentes gelificantes tales como goma guar, poliácridamida, goma de algarrobo y agar, por ejemplo, forman soluciones en agua a temperatura ambiente y son primeros agentes gelificantes solubles en agua fría adecuados para proporcionar un medio de cultivo seco y rehidratable que es "soluble en agua fría" según la presente descripción. Los primeros agentes gelificantes solubles en agua fría preferidos para el medio 16 de cultivo incluyen, por ejemplo, goma guar y goma xantano, siendo estos agentes gelificantes útiles individualmente o en combinación entre sí y en combinación con otros agentes gelificantes solubles en agua fría. Los nutrientes organonitrogenados para el crecimiento de microorganismos coliformes forman soluciones en agua a temperatura ambiente.

Después de recubrir el medio de cultivo sobre la primera lámina y secarlo sobre ella, el medio de cultivo seco adherido a la primera lámina tiene un peso de recubrimiento. El peso de recubrimiento del medio de cultivo seco se selecciona de manera que, cuando la zona de crecimiento se rehidrata con un volumen predefinido de líquido acuoso (p. ej., un líquido acuoso que comprende una muestra a analizar para los microorganismos coliformes y *E. coli*), el medio de cultivo rehidratado tiene la concentración apropiada de cada ingrediente para facilitar el crecimiento y la enumeración diferencial de los microorganismos coliformes y *E. coli*. En cualquier realización, el peso de recubrimiento del medio de cultivo seco adherido a la primera lámina puede ser de aproximadamente 130 mg/100 cm² a aproximadamente 195 mg/100 cm².

El medio de cultivo seco y rehidratable de un dispositivo según la presente descripción comprende un sistema indicador de fermentación de lactosa dispuesto en la zona de crecimiento microbiano. El sistema indicador de fermentación de lactosa proporciona dos indicaciones de colonias de bacterias coliformes que crecen en el dispositivo: una primera indicación (producción de ácido) debido a la fermentación de lactosa y una segunda indicación (producción de gas) debido a la fermentación de lactosa. La producción de tanto ácido como gas (CO₂)

procedentes de la fermentación de lactosa confirma la presencia de una colonia de microorganismos coliformes en crecimiento en el dispositivo. La presencia de ácido y gas en combinación con la precipitación del producto de reducción de TTC “formazan” durante el crecimiento de colonias puede proporcionar la diferenciación de bacterias coliformes frente a organismos de *E. coli* inducibles y constitutivos. En consecuencia, el sistema indicador de fermentación de lactosa comprende D-lactosa y un indicador de pH. El indicador de pH tiene un intervalo de transición alrededor de 7,0. Los indicadores de pH adecuados incluyen indicadores de pH de sulfoneftaleína, tales como rojo de fenol y rojo de clorofenol, por ejemplo.

El sistema indicador de fermentación de lactosa incluye, además, un primer compuesto inductor que mejora la producción de enzimas (p. ej., β -galactosidasa) para usar lactosa. Los ejemplos no limitativos de los primeros compuestos inductores adecuados incluyen isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) y fenil- β -D-galactósido.

El sistema indicador de fermentación de lactosa se dispone (p. ej., en el medio de cultivo seco y rehidratable) en la zona de crecimiento microbiano del dispositivo de cultivo. Por lo tanto, en cualquier realización, al menos uno de los componentes del sistema indicador de fermentación de lactosa puede añadirse al medio de cultivo antes de recubrir el medio de cultivo sobre la primera lámina 12 y/o el primer adhesivo 14. Alternativamente, al menos un componente del sistema indicador de fermentación de lactosa puede incluirse en un líquido acuoso (p. ej., agua, un tampón y/o la muestra) que se deposita en o sobre la zona de crecimiento microbiano cuando el medio de cultivo se rehidrata para su uso. En cualquier realización en donde la lactosa se dispone en el dispositivo en el medio de cultivo seco, la lactosa está presente en el medio de cultivo seco a un peso de recubrimiento de aproximadamente 8,5 mg/100 cm² a aproximadamente 27 mg/100 cm².

El medio de cultivo seco y rehidratable de un dispositivo según la presente descripción comprende un sistema indicador de β -D-glucuronidasa dispuesto en la zona de crecimiento microbiano. El sistema indicador de β -D-glucuronidasa proporciona una indicación de colonias, tales como colonias de *E. coli*, que producen actividad enzimática de β -D-glucuronidasa. Por lo tanto, el sistema indicador de β -D-glucuronidasa proporciona un medio para distinguir colonias de *E. coli* presentes en el dispositivo frente a colonias de coliformes no *E. coli* presentes en el dispositivo. En consecuencia, el sistema indicador de β -D-glucuronidasa comprende un sustrato enzimático de β -D-glucuronidasa cromogénico (p. ej., 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido). Además, el sistema indicador β -D-glucuronidasa comprende además una pluralidad de compuestos que potencian la actividad enzimática de β -glucuronidasa en *E. coli*. Los ejemplos no limitativos de compuestos adecuados que mejoran la actividad enzimática de β -glucuronidasa en *E. coli* incluyen metil- β -D-glucurónido, fenil- β -D-glucurónido, y ácido D-glucurónico. En cualquier realización, un primer compuesto que mejora la actividad enzimática de β -glucuronidasa en *E. coli* se selecciona de metil- β -D-glucurónido y fenil- β -D-glucurónido. En cualquier realización, un segundo compuesto que mejora la actividad enzimática de β -glucuronidasa en *E. coli* es ácido D-glucurónico. Sorprendentemente, un dispositivo que tiene una combinación del primer y segundo compuestos que mejora la actividad enzimática de β -glucuronidasa en *E. coli* tiene mayor capacidad de detección de *E. coli* positiva a la β -glucuronidasa. Dicha combinación de compuestos para detectar este tipo de microorganismo no se ha conocido anteriormente.

Sin limitaciones teóricas de ninguna especie, se cree que al menos uno de la pluralidad de compuestos que mejoran la actividad enzimática de β -glucuronidasa en *E. coli* puede inducir la producción de más enzima β -glucuronidasa por parte de las células. Alternativamente, o de forma adicional, al menos uno de la pluralidad de compuestos que mejoran la actividad enzimática de β -glucuronidasa en *E. coli* puede mejorar la actividad de las moléculas enzimáticas de β -glucuronidasa cuando reaccionan con un sustrato enzimático cromogénico (p. ej., 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido).

El sistema indicador de β -D-glucuronidasa se dispone (p. ej., en el medio de cultivo seco y rehidratable) en la zona de crecimiento microbiano del dispositivo de cultivo. Por lo tanto, en cualquier realización, al menos uno de los componentes del sistema indicador de β -D-glucuronidasa puede añadirse al medio de cultivo antes de recubrir el medio de cultivo sobre la primera lámina 12, el primer adhesivo 14 o segunda lámina 22. Alternativamente, al menos un componente del sistema indicador de β -D-glucuronidasa puede incluirse en un líquido acuoso (p. ej., agua, un tampón y/o la muestra) que se deposita en o sobre la zona de crecimiento microbiano cuando el medio de cultivo se rehidrata para su uso.

En cualquier realización, un dispositivo de la presente descripción puede comprender un reactivo para tamponar el medio de cultivo cuando el medio de cultivo se reconstituye con un líquido acuoso durante el uso. El reactivo puede regular el medio de cultivo (cuando se hidrata durante el uso) a un pH entre aproximadamente 6,5 y 7,5. Un ejemplo no limitativo de un reactivo adecuado para tamponar el medio de cultivo una sal de fosfato (p. ej., Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, K₂HPO₄, KH₂PO₄, o una combinación de cualesquiera dos o más de los reactivos anteriores). El reactivo se coloca (p. ej., en el medio de cultivo seco y rehidratable) en la zona de crecimiento microbiano del dispositivo de cultivo. Por lo tanto, en cualquier realización, el reactivo puede añadirse al medio de cultivo antes de recubrir el medio de cultivo sobre la primera lámina 12 y/o el primer adhesivo 14. Alternativamente, el reactivo puede incluirse en un líquido acuoso (p. ej., agua, un tampón y/o la muestra) que se deposita en o sobre la zona de crecimiento microbiano cuando el medio de cultivo se rehidrata para su uso.

Los componentes del medio de cultivo pueden mezclarse juntos en un líquido acuoso y recubrirse sobre la primera lámina, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 12 de la patente US-4.565.783. Después de revestir el medio de cultivo sobre la primera lámina, la capa del medio de cultivo se seca hasta que esté esencialmente libre de agua. Opcionalmente, antes de recubrir el medio de cultivo sobre la primera lámina, la primera lámina se recubre con una capa de un adhesivo como se describe en la presente descripción. Después, el medio de cultivo se recubre sobre la capa adhesiva y se seca hasta que la capa de medio de cultivo esté esencialmente libre de agua.

En cualquier realización, puede ser deseable incorporar un indicador no específico (p. ej., un colorante) en la zona de crecimiento microbiano para indicar una presencia de una colonia microbiana en crecimiento en el dispositivo. En algunas realizaciones, el indicador puede incorporarse en el medio de cultivo. Alternativamente, el indicador puede incorporarse en el adhesivo 14. Los indicadores adecuados son los que son metabolizados por los microorganismos en crecimiento y que hacen que las colonias se colorean para facilitar la visualización. Los ejemplos de tales indicadores incluyen cloruro de trifeniltetrazolio, rojo de p-toliltetrazolio, violeta de tetrazolio, azul de tetrazolio y colorantes relacionados.

Opcionalmente, en cualquier realización, un dispositivo de la presente descripción comprende además la fórmula para bebés en polvo dispuesta en la zona de crecimiento microbiano. La fórmula para bebés puede proporcionarse en la zona de crecimiento como un componente del medio de cultivo seco o, alternativamente, puede mezclarse con el segundo agente gelificante soluble en agua fría adherido a la capa adhesiva 24 sobre la segunda lámina. La fórmula para bebés proporciona una pluralidad de nutrientes (p. ej., proteínas, carbohidratos, minerales y vitaminas) que pueden facilitar el crecimiento de microorganismos coliformes. Un ejemplo no limitativo de una fórmula para bebés en polvo adecuada para usar en un dispositivo de la presente descripción es la fórmula para bebés GERBER® GOOD START® Gentle (Etapa 1) comercializada por Nestle Infant Nutrition; Florham Park, NJ.

En cualquier realización en donde la fórmula para bebés se dispone en el dispositivo en el medio de cultivo seco, la fórmula para bebés está presente en el medio de cultivo seco a un peso de recubrimiento de hasta aproximadamente 27 mg/100 cm². En cualquier realización, la fórmula para bebés puede estar presente en el medio de cultivo seco a un peso de recubrimiento de hasta aproximadamente 14 mg/100 cm². En cualquier realización, la fórmula para bebés puede estar presente en el medio de cultivo seco a un peso de recubrimiento de hasta aproximadamente 19 mg/100 cm².

Los dispositivos de cultivo de película fina se han usado para cultivar y enumerar colonias de microorganismos (p. ej., especies de *E. coli*) patógenos y, posteriormente, las colonias se han transferido (p. ej., mediante la técnica "blott") sobre una membrana para la identificación de los microorganismos, por ejemplo, como se describe en la patente US-5.137.812. Se contempla que, en algunas realizaciones, los dispositivos de cultivo de película fina según la presente descripción puedan usarse además para cultivar y enumerar colonias de microorganismos que se transfieren posteriormente (p. ej., mediante la técnica "blott") sobre una membrana para la identificación de los microorganismos.

En cualquier realización, un dispositivo de cultivo de la presente descripción puede comprender un medio de cultivo seco y rehidratable adherido a la primera lámina, en donde el medio de cultivo seco y rehidratable comprende los componentes enumerados en la Tabla 1.

Tabla 1. Lista de componentes de un medio de cultivo seco y rehidratable ilustrativo de la presente descripción.

Compuestos organonitrogenados: Extracto de levadura; Peptona porcina; Lactosa; Digestos enzimáticos de tejido animal; digestos enzimáticos de gelatina, indicador de pH de fórmula para bebés; rojo de fenol

Sales: MgC12, FAC, Sales Biliares, KH2PO4; K2HPO4

Inductores: metil glucurónido; Ácido D-glucurónico, IPTG

Indicadores: BCIglucurónido

Agentes gelificantes: Goma guar

Componente
Extracto de levadura
Peptona porcina
Rojo de fenol
Sales biliares
Dodecilsulfato de sodio
MgCl ₂
Lactosa
Metil glucurónido
Ácido D-glucurónico
BCIG
K ₂ HPO ₄
KH ₂ PO ₄
Fórmula para bebés en polvo
Digesto enzimático de gelatina
Digesto enzimático de tejido animal
Citrato férrico amónico
CaCl ₂
IPTG
Goma guar reextraída

La presente descripción describe un método para enumerar diferencialmente colonias de microorganismos coliformes y de *Escherichia coli*. El método comprende poner en contacto una muestra y un líquido acuoso en la zona de crecimiento microbiano de cualquier realización del dispositivo de cultivo de la presente descripción para formar un dispositivo de cultivo inoculado. En cualquier realización, la muestra puede comprender el líquido acuoso. Generalmente, las cantidades de agente gelificante; agentes indicadores (TTC y BCIG); y el medio de cultivo seco en la zona de crecimiento microbiano del dispositivo de cultivo se seleccionan para proporcionar una concentración eficaz para detectar y distinguir colonias de bacterias coliformes y de *E. coli* cuando estas (es decir, el agente gelificante, los agentes indicadores y el nutriente) se reconstituyen con un volumen predeterminado (p. ej., 1 mililitro, 2 mililitros, 5 mililitros) de líquido acuoso. El líquido acuoso puede añadirse con los materiales de muestra (p. ej., el material de muestra puede disolverse, homogeneizarse, suspenderse y/o diluirse en un líquido acuoso tal como agua estéril, un regulador acuoso, o un medio nutriente acuoso, por ejemplo). Cuando la muestra comprende materiales sólidos (p. ej., un filtro de membrana que tiene material retenido sobre él o en él) o semisólidos, el volumen predeterminado de líquido (p. ej., agua estéril, un medio nutriente acuoso) puede usarse para reconstituir el dispositivo de cultivo antes o después de usar la muestra sólida o semisólida para inocular el dispositivo.

El uso de los dispositivos de la presente invención se describirá con referencia específica al dispositivo de las Figs. 1 y 2. Para usar el dispositivo de las Figs. 1 y 3 como una placa de vertido, la segunda lámina 22 se retira y una cantidad predeterminada de agua o una muestra de prueba acuosa se coloca sobre la primera lámina 12 en la zona de crecimiento microbiano definida por el miembro espaciador 18. Los componentes del medio 16 de cultivo seco adheridos a la primera lámina 12 por medio del adhesivo 14 se hidratan o disuelven rápidamente y se forma un gel nutriente. La segunda lámina 22 se reemplaza, a continuación, sobre la primera lámina, y una placa pesada se coloca en la parte superior para esparcir la muestra completamente por toda la zona de crecimiento microbiano. Después, el dispositivo se incuba durante un período de tiempo predeterminado.

La muestra puede ponerse en contacto con la zona de crecimiento microbiano del dispositivo de cultivo mediante el uso de métodos conocidos en la técnica (p. ej., vertiendo o pipeteando una muestra líquida en el dispositivo de cultivo). La segunda lámina se levanta, típicamente, (p. ej., como se muestra en la Fig. 1) para permitir el depósito de la muestra entre la primera lámina y la segunda lámina; preferiblemente en la abertura de un espaciador, si está presente, en el dispositivo de cultivo. Poniendo en contacto una muestra y un líquido acuoso con el agente gelificante en la zona de crecimiento microbiano se forma un dispositivo de cultivo inoculado. Después de formar el dispositivo de cultivo inoculado, la segunda lámina se reduce para formar una barrera protectora contra la contaminación y/o evaporación excesiva del líquido acuoso durante la incubación. La muestra puede esparcirse uniformemente sobre la región de crecimiento microbiano, por ejemplo, colocando una placa pesada en la parte superior del dispositivo cubierto.

El método comprende además incubar (p. ej., en una cámara ambiental de temperatura controlada) el dispositivo de cultivo inoculado durante un período de tiempo. Las condiciones de incubación (p. ej., la temperatura de incubación) pueden influir en la velocidad de crecimiento de las bacterias coliformes presentes en la muestra. Una persona con experiencia en la técnica reconocerá las temperaturas de incubación adecuadas para detectar

bacterias coliformes. Un dispositivo de cultivo inoculado de la presente descripción puede incubarse, por ejemplo, a temperaturas de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 45 °C, inclusive, por ejemplo. El dispositivo de cultivo puede incubarse en un ambiente gaseoso aerobio (p. ej., ambiente atmosférico normal).

El dispositivo de cultivo inoculado se incuba durante un período de tiempo suficiente para permitir el crecimiento de bacterias coliformes. El período de incubación mínimo necesario para detectar bacterias coliformes se relaciona con la temperatura a la que se incuba el dispositivo de cultivo. Por ejemplo, cuando el dispositivo de cultivo se incuba a aproximadamente 35°, el período de tiempo puede ser de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 24 horas, inclusive; cuando el dispositivo de cultivo se incuba a aproximadamente 42°, el período de tiempo puede ser de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 18 horas, inclusive; cuando en donde el dispositivo de cultivo se incuba a aproximadamente 42°, el periodo de tiempo puede ser de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 12 horas, inclusive.

El método de la presente descripción comprende además detectar una colonia de bacterias coliformes y/o detectar una colonia de bacterias *E. coli* en el dispositivo de cultivo (p. ej., observar una colonia de bacterias coliformes y/o detectar una colonia de bacterias *E. coli* en el dispositivo de cultivo). Detectar una colonia de bacterias coliformes en el dispositivo de cultivo puede comprender detectar colonias en el dispositivo de cultivo que han reaccionado con al menos uno de los sistemas indicadores (p. ej., el sistema indicador de fermentación de lactosa y el sistema indicador de β -D-glucuronidasa). Una colonia de bacterias coliformes se distingue por su capacidad de fermentar lactosa a productos finales ácidos y gaseosos. Por lo tanto, detectar una colonia de coliformes comprende observar una o ambas de la reducción de formazan como un precipitado en la colonia y una zona ácida (como evidencia el indicador de pH en el dispositivo; p. ej., una zona amarilla en donde el indicador de pH es rojo de fenol) próximo a la colonia (p. ej., dentro de aproximadamente 1-2 mm del perímetro de la colonia) y observar también una burbuja de gas atrapada en el medio de cultivo semisólido próximo a la colonia (p. ej., tocando el perímetro de la colonia o dentro de aproximadamente 1 mm del perímetro de la colonia).

Además de observar la zona ácida y la(s) burbuja(s) de gas próximas a la colonia, detectar y distinguir una colonia de bacterias *E. coli* comprende además detectar un producto de la actividad enzimática de β -glucuronidasa. Por ejemplo, cuando el sistema indicador de β -glucuronidasa comprende BCIG, las colonias de *E. coli* tendrán un aspecto azul (o verde azulado) con o sin una pequeña zona azul (o azulada) rodeando cada una de las colonias.

El método de la presente descripción comprende además enumerar colonias de bacterias coliformes, si están presentes, y/o colonias de *E. coli*, si están presentes, en el dispositivo de cultivo inoculado después de incubar el dispositivo de cultivo inoculado. Por lo tanto, después de detectar las colonias de bacterias coliformes y de *E. coli* como se describe en la presente descripción, el número de colonias detectadas se determina manualmente o mediante el uso de procesos automatizados conocidos en la técnica (p. ej., mediante el uso de un contador de colonias automatizado tal como, por ejemplo, un lector de placas PETRIFILM comercializado por 3M Company; St. Paul, MN).

Los objetos y ventajas de esta invención se ilustran además por los siguientes ejemplos, pero los materiales y cantidades particulares de los mismos citados en estos ejemplos, así como otras condiciones y detalles, no deberán tomarse como una limitación indebida de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplos 1-13 Fabricación de artículos para la detección microbiana.

Preparación de medios de cultivo.

Las mezclas mostradas en la Tabla 1 se prepararon en recipientes separados. El volumen líquido de la mezcla se llevó a 1000 ml con agua desionizada.

Preparación de las primeras láminas.

Las mezclas mostradas en las Tablas 2 y 3 se prepararon añadiendo primero la goma guar al agua seguido de la adición posterior de los componentes restantes y se calentaron a 80 °C para permitir la pasteurización del medio de cultivo. Después de la etapa de calentamiento, la mezcla se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Las mezclas líquidas se calentaron hasta alcanzar la temperatura ambiente y se recubrieron sobre una película de poliéster, y la capa recubierta se secó tal como se describe en el Ejemplo 1 de la patente US-5.384.766. El peso de recubrimiento seco de cada medio de cultivo separado recubierto sobre películas individuales fue de aproximadamente 0,2 a 0,3 g/155 cm². Las láminas recubiertas se cortaron en rectángulos de 10,2 cm x 7,6 cm.

La espuma de poliestireno (0,51 mm de espesor), obtenida de American FujiSeal (Shaumburg, IL) se usó para fabricar los elementos espaciadores. La cara de las láminas de espuma se adhirió a un recubrimiento desprendible recubierto con adhesivo (adhesivo de transferencia 3M 927). Los círculos (aproximadamente 6 cm de diámetro) se cortaron a troquel a partir de las láminas de espuma. Las láminas de espuma se cortaron en rectángulos de 10,2 cm x 7,6 cm, con los orificios circulares aproximadamente centrados en los rectángulos. Los recubrimientos desprendibles se retiraron, y los elementos espaciadores se adhirieron (a través del adhesivo sobre la lámina de espuma) a las láminas recubiertas con medio de cultivo seco de manera que el medio de cultivo quedó expuesto en la abertura circular de la lámina de espuma.

Preparación de las segundas láminas.

Bi-axially oriented polypropylene (Polipropileno orientado biaxialmente - BOPP) recubierto con adhesivo (adhesivo de transferencia 3M 927) que contiene 5 veces el triphenyl tetrazolium chloride (cloruro de trifeniltetrazolio - TTC, núm. part. 17779; Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO) descrito en el Ejemplo 11 de la patente US-4.565.783. Posteriormente, la película de BOPP recubierta con adhesivo se recubrió en polvo con goma guar, como se describe en el Ejemplo 11 de la patente US-4.565.783. Las segundas láminas se cortaron en rectángulos de 10,6 cm x 7,6 cm

Montaje de los dispositivos de cultivo.

Se aplicó cinta adhesiva doble a lo largo de uno de los bordes (a lo largo de la dimensión más estrecha) del espaciador de espuma sobre cada una de las primeras láminas. Se superpuso una segunda lámina sobre la primera lámina (como se muestra en la Fig. 1) de manera que la superficie recubierta de la segunda lámina quedara orientada hacia el espaciador de espuma adherido a la primera lámina y las láminas se presionaron entre sí para fijar la segunda lámina a la cinta adhesiva doble.

Tabla 2. Medios de cultivo. Todos los valores de la tabla se indican en gramos. Cada mezcla se disolvió en un total de 1000 ml de agua desionizada.

Componente	Medio 87	Medio 83	Medio 84	Medio 88	Medio 89	Medio 72	Medio 66	Medio 63
Extracto de levadura	5	5	10	5	5	10	10	5
Peptona porcina	5	5	10	5	5	10	10	5
Rojo de fenol	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Sales biliares	5	5	5	5	5	5	5	3
Dodecilsulfato de sodio	0,1	0,1	0,15	0,1	0,1	0,05	0,05	0,05
MgCl ₂	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,45	0,45	0,45
Lactosa	3	5	5	6	10	10	3,5	7,5
Metil glucurónico	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Ácido D-glucurónico	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
BCIG	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
K ₂ HPO ₄	6	6	6	6	6	6	6	6
KH ₂ PO ₄	2	2	2	2	2	2	2	2
Fórmula para bebés en polvo	0	0	0	0	0	0	0	5
Digesto enzimático de gelatina	1	1	5	2	5	5	5	2,5
Digesto enzimático de tejido animal	1	1	5	2	5	5	5	2,5
Citrato férrico amónico	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
CaCl ₂	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
IPTG	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Goma guar reextraída	16	16	16	16	16	16	16	16

Tabla 3. Medios de cultivo. Todos los valores de la tabla se indican en gramos. Cada mezcla se disolvió en un total de 1000 ml de agua desionizada.

Componente	Medio 62	Medio 69	Medio 64	Medio 70
Extracto de levadura	10	7,5	10	10
Peptona porcina	10	7,5	10	10
Rojo de fenol	1	0,75	0,75	0,75
Sales biliares	5	5	5	5
Dodecilsulfato de sodio	0,05	0,1	0,05	0,1
MgCl ₂	0,45	0,5	0,45	0,5
Lactosa	7,5	7	5	10
Metil glucurónido	0,2	0,2	0,2	0,2
Ácido D-glucurónico	0,2	0,2	0,2	0,2
BCIG	0,5	0,5	0,5	0,5
K ₂ HPO ₄	6	6	6	6
KH ₂ PO ₄	2	2	2	2
Fórmula para bebés en polvo	5	7	10	10
Digesto enzimático de gelatina	5	5	5	5
Digesto enzimático de tejido animal	5	5	5	5
Citrato férrico amónico	0,5	0,5	0,5	0,5
CaCl ₂	0,5	0,5	0,5	0,5
IPTG	0,2	0,2	0,2	0,2
Goma guar reextraída	16	16	16	16

- 5 Ejemplo 1.
- Los dispositivos se elaboraron adhiriendo primeras láminas recubiertas con medio 87 a segundas láminas preparadas como se ha descrito anteriormente.
- 10 Ejemplo 2.
- Los dispositivos se elaboraron adhiriendo primeras láminas recubiertas con medio 83 a segundas láminas preparadas como se ha descrito anteriormente.
- 15 Ejemplo 3.
- Los dispositivos se elaboraron adhiriendo primeras láminas recubiertas con medio 84 a segundas láminas preparadas como se ha descrito anteriormente.
- 20 Ejemplo 4.
- Los dispositivos se elaboraron adhiriendo primeras láminas recubiertas con medio 88 a segundas láminas preparadas como se ha descrito anteriormente.
- 25 Ejemplo 5.
- Los dispositivos se elaboraron adhiriendo primeras láminas recubiertas con medio 89 a segundas láminas preparadas como se ha descrito anteriormente.
- 30 Ejemplo 6.
- Los dispositivos se elaboraron adhiriendo primeras láminas recubiertas con medio 72 a segundas láminas preparadas como se ha descrito anteriormente.
- 35 Ejemplo 7.
- Los dispositivos se elaboraron adhiriendo primeras láminas recubiertas con medio 66 a segundas láminas preparadas como se ha descrito anteriormente.
- 40

Ejemplo 8.

Los dispositivos se elaboraron adhiriendo primeras láminas recubiertas con medio 63 a segundas láminas preparadas como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 9.

Los dispositivos se elaboraron adhiriendo primeras láminas recubiertas con medio 62 a segundas láminas preparadas como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 10.

Los dispositivos se elaboraron adhiriendo primeras láminas recubiertas con medio 69 a segundas láminas preparadas como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 11.

Los dispositivos se elaboraron adhiriendo primeras láminas recubiertas con medio 64 a segundas láminas preparadas como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 12.

Los dispositivos se elaboraron adhiriendo primeras láminas recubiertas con medio 70 a segundas láminas preparadas como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 13. Uso de dispositivos de cultivo para cultivar y enumerar colonias de coliformes o de *E. coli*.

E. coli ATCC 51813 se obtuvo de Microbiologies (St. Cloud, MN) y, posteriormente, se aisló y almacenó como soluciones madre de glicerol congeladas en cultivo puro. REC1, una cepa natural de *E. coli* aislada de queso Mozzarella que presentaba un comportamiento inducible de beta glucuronidasa se almacenó en glicerol hasta su uso.

Los cultivos durante la noche de *E. coli* ATCC 51813 y *E. coli* REC1 se diluyeron en serie en tampón de Butterfield según fue necesario para proporcionar colonias cuyo recuento (p. ej., 15-150 UFC/ml) pudiera realizarse en los dispositivos de cultivo. Se inoculó 1 ml de la muestra diluida en las placas prototipo. Las placas inoculadas se incubaron a dos temperaturas (35 °C y 42 °C) y las placas se observaron al cabo de 24 ± 6 horas.

Como controles, los cultivos diluidos se inocularon en placas de recuento de *E. coli*/coliformes 3M™ PETRIFILM™ (PFEC) y placas de recuento de *E. coli* 3M™ PETRIFILM™ Select (PSEC) (ambas obtenidas de 3M Health Care; St. Paul, MN) según las instrucciones del fabricante, se incubaron durante 24 ± 2 horas o 48+/-3 horas, y se llevó a cabo el recuento de las colonias según las instrucciones del fabricante.

Después del período de incubación, se observó que los dispositivos de cultivo de los Ejemplos 1-12 detectaban y enumeraban colonias visibles que tenían un aspecto azul (es decir, positivo a la glucuronidasa, indicando una colonia de *E. coli*) rodeadas por una zona ácida de color amarillo (es decir, colonia fermentadora de lactosa) con una o más burbujas de gas adyacentes (es decir, colonia fermentadora de lactosa). Los recuentos de colonias para cada uno de los Ejemplos 1-12 fueron similares a los recuentos en los recuentos de placa PETRIFILM de control

Además, se analizaron cualitativamente las colonias de cada una de las placa para determinar la actividad de β-glucuronidasa y la fermentación de lactosa en cada uno de los dispositivos de cultivo. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Observaciones de actividad de β -glucuronidasa y fermentación de lactosa.

	<i>E. coli</i> REC1		<i>E. coli</i> ATCC 51813	
	Reacción de β -glucuronidasa	Producción de gas	Reacción de β -glucuronidasa	Producción de gas
Ejemplo 1	+++	+++	+++	+++
Ejemplo 2	+++	+++	+++	+++
Ejemplo 3	+++	+++	+++	+++
Ejemplo 4	+++	+++	+++	+++
Ejemplo 5	+	+++	+++	+++
Ejemplo 6	+	+++	+++	+++
Ejemplo 7	+	+++	+++	+++
Ejemplo 8	+++	+++	+++	+++
Ejemplo 9	+	+++	+++	+++
Ejemplo 10	+	+++	+++	+++
Ejemplo 11	+	+++	+++	+++
Ejemplo 12	+	+++	+++	+++
Control - PFEC	+	+++	+++	+++
Control - PSEC	+++	+++	+++	+

Para la reacción de β -glucuronidasa: +++ = colonia Azul/Verde, + = colonia Roja/Morada, y - = colonia Roja.

Para la producción de Gas: +++ = burbujas de gas grandes adyacentes a las colonias, - = Burbujas de gas muy pequeñas adyacentes a las colonias.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo para enumerar diferencialmente colonias de microorganismos coliformes y *Escherichia coli*, comprendiendo el dispositivo:
 - una primera lámina impermeable al agua;
 - una segunda lámina impermeable al agua unida a la primera lámina;
 - un medio de cultivo seco, rehidratable adherido a la primera lámina;
 - en donde el medio de cultivo comprende:
 - nutrientes organonitrogenados que facilitan el crecimiento de microorganismos coliformes;
 - un sistema indicador de fermentación de lactosa dispuesto en la zona de crecimiento microbiano, comprendiendo el sistema indicador de fermentación de lactosa D-lactosa, un primer compuesto inductor que mejora la producción de β -galactosidasa, y un indicador de pH;
 - un sistema indicador de β -D-glucuronidasa dispuesto en la zona de crecimiento, comprendiendo el sistema indicador de β -D-glucuronidasa 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido y una pluralidad de compuestos que potencian la actividad enzimática de β -glucuronidasa en *E. coli*;
 - un indicador redox;
 - una cantidad eficaz de al menos un agente que inhibe selectivamente el crecimiento de microorganismos no coliformes; y
 - un primer agente gelificante soluble en agua fría;
 - una zona de crecimiento microbiano dispuesta entre la primera lámina y la segunda lámina, en donde un área del medio de cultivo adherido a la primera lámina define la zona de crecimiento;
 - y
 - un segundo agente gelificante soluble en agua fría adherido a la segunda lámina;
 - en donde la primera lámina se une a la segunda lámina de manera que el medio de cultivo se orienta hacia el segundo agente gelificante soluble en agua fría.
2. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde un primer compuesto de la pluralidad de compuestos que mejoran la actividad enzimática de β -glucuronidasa en *E. coli* se selecciona de metil- β -D-glucurónido y fenil- β -D-glucurónido.
3. El dispositivo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde un segundo compuesto de la pluralidad de compuestos que mejoran la actividad enzimática de β -glucuronidasa en *E. coli* es ácido D-glucurónico.
4. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la segunda lámina comprende una película de poliéster.
5. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la primera lámina y la segunda lámina se configuran para retardar el paso de dióxido de carbono a través de ellas.
6. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además ácido D-glucurónico dispuesto en la zona de crecimiento microbiano.
7. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la primera lámina, la segunda lámina, o ambas, comprenden una película de poliéster.
8. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la zona de crecimiento viene definida por un espaciador adherido a la primera lámina.
9. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el medio de cultivo adherido a la primera lámina tiene un peso de recubrimiento de aproximadamente 130 mg/100 cm² a aproximadamente 195 mg/100 cm².
10. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la lactosa se dispone en el medio de cultivo seco adherido a la primera lámina, en donde la lactosa está presente en el medio de cultivo seco a un peso de recubrimiento de aproximadamente 8,5 mg/100 cm² a aproximadamente 27 mg/100 cm².

11. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el medio de cultivo comprende además un reactivo para tamponar el medio de cultivo, cuando se reconstituye con un líquido acuoso, a un pH entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5.
- 5 12. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la zona de crecimiento está configurada para recibir un líquido acuoso que tiene un volumen predeterminado de aproximadamente 1 mililitro a aproximadamente 5 mililitros y, después de recibir el volumen predeterminado, forma un medio de cultivo hidratado que facilita el crecimiento y la enumeración de colonias de coliformes.
- 10 13. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el segundo gelificante soluble en agua fría se dispone sobre la segunda lámina en forma de partículas secas o partículas aglomeradas secas.
14. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el primer compuesto inductor que mejora la producción de β -galactosidasa comprende isopropil- β -D-tiogalactopiranosido.
- 15 15. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además fórmula para bebés seca dispuesta en la zona de crecimiento microbiano.

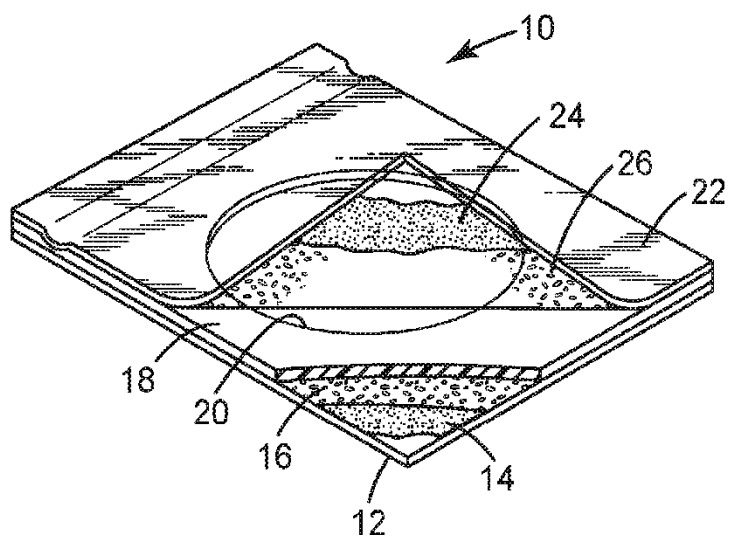


Fig. 1

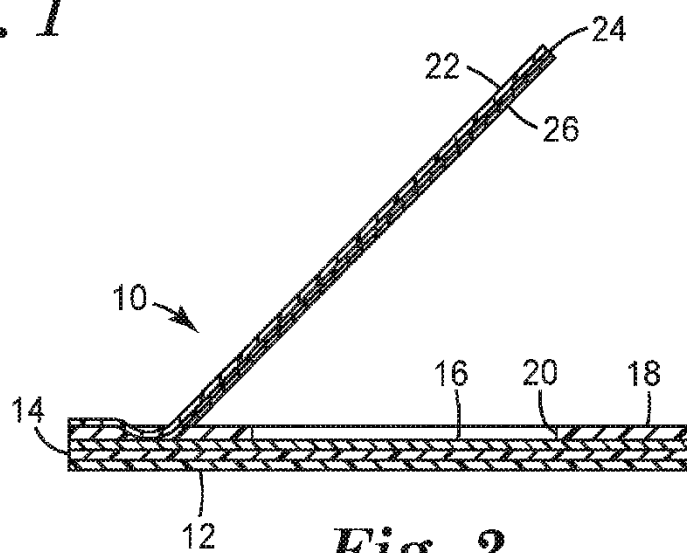


Fig. 2

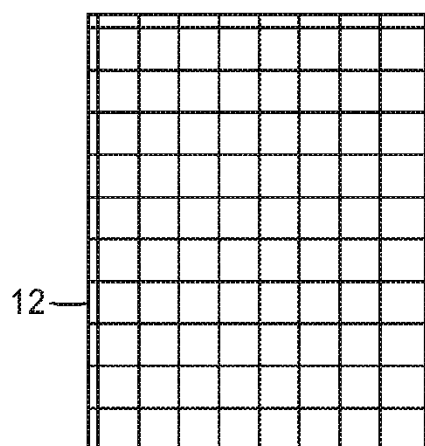


Fig. 3