



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 294 004**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

C12R 1/05 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

C12R 1/22 (2006.01)

C12R 1/37 (2006.01)

C12R 1/385 (2006.01)

C12R 1/42 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01947123 .4**

(86) Fecha de presentación : **29.06.2001**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1300471**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **09.04.2003**

(54) Título: **Mezcla nutritiva y procedimiento para la identificación y recuento rápidos de organismos Gram-negativos.**

(30) Prioridad: **29.06.2000 CU 1602000**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2008

(73) Titular/es:
CENTRO NACIONAL DE BIOPREPARADOS
Carretera Beltrán Km. 1 1/2, Bejucal
Provincia La Habana 6048, CU

(72) Inventor/es: **Tsoraeva, Anna;**
Rodriguez Martinez, Claudio y
Quesada Muniz, Vivian de Jesus

(74) Agente: **Durán Moya, Carlos**

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

Mezcla nutritiva y procedimiento para la identificación y recuento rápidos de organismos Gram-negativos.

5 Sector técnico

La presente invención se refiere a la Microbiología y particularmente a una mezcla nutritiva y un método para la identificación y el recuento diferenciado y rápido o temprano de organismos Gram-negativos.

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

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

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

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

Por otra parte existe un grupo de medios de cultivo para la detección de *Salmonella* que utilizan, como mínimo, dos características bioquímicas de este género que se manifiestan por presencia o ausencia de color en el medio de cultivo o en la colonia. Entre ellos se puede mencionar Agar Desoxicolato Citrato, Agar Entérico Hektoen, Agar S.
35 S., Agar XLD, Agar de Christensen y Agar Verde Brillante (Soria Melquizo, F. Manual Difco. Décima edición. 1984; Manual MERCK de Medios de Cultivo. 1990; Manual de Medios de Cultivo OXOID. 1995).

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

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

El producto permite sólo identificar las bacterias coliformes y *Salmonella* no *typhi* de *Proteus* y otras bacterias Gram-negativas. Además, en la práctica alrededor del 9% de las cepas de *Salmonella* pueden poseer la enzima β -galactosidasa y alrededor de 30% no fermenta el propilenglicol (Kaluzewski y Tomczuk, Med. Dosw. Mikrobiol.,
55 1995, 47: 155-168).

Roth y colaboradores recibieron la aprobación de la Patente U.S.A. Nº 5 393 662, mediante la cual dan a conocer un medio y un método para la identificación y recuento de *E. coli* y coliformes aplicando sustratos con diferentes grupos cromóforos. Este medio no permite la identificación y conteo de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* y otras enterobacterias
60 no coliformes. Por otra parte, la *Shigella sonnei* provoca falsos resultados positivos puesto que desarrolla colonias con las mismas características cromáticas que *E. coli*.

En 1995 fue concedida una patente a Monget y otros (Patente U.S.A. Nº 4 277 561), por un método para el análisis bacteriológico, y un medio para la detección de *Salmonella*. Este método se basa en la capacidad específica de
65 *Salmonella* en fermentar ácido glucurónico o una de sus sales y no producir la enzima β -galactosidasa. El medio a su vez incluye nutrientes, un compuesto fluorogénico o cromogénico para la enzima β -galactosidasa, ácido glucurónico o una de sus sales e indicador de pH. Este medio de cultivo contiene, además, las sustancias inhibitoras de las especies diferentes de *Salmonella* (verde brillante y desoxicolato de sodio), lo que limita su habilidad de detectar otros organis-

mos Gram-negativos e imposibilita su utilización para el recuento de microorganismos. El medio de cultivo incluye glucuronato de sodio en forma de suplemento después de esterilización. Según Denis y colaboradores, la especificidad de este medio de cultivo es de 93,3%, mientras que la del otro medio tradicional para la detección de *Salmonella* (Agar Enterico Hektoen) es de 85,3% (Denis y otros, Revue française des laboratoires, Diciembre 1994, N° 271).

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

Roth y colaboradores, en marzo de 1998 recibieron la aprobación de la Patente U.S.A. N° 5.726.031. En la patente se describe un medio de ensayo y un método cuantitativo para la identificación y diferenciación de materiales biológicos en una muestra a ensayar. El método consiste en emplear un sustrato cromogénico, específico del primer material biológico y que produce el primer color; otro sustrato cromogénico que es específico del segundo material biológico y produce el segundo color, y un tercer material biológico es capaz de dividir uno de los sustratos. El primer y segundo materiales biológicos son capaces de degradar un azúcar, y el tercer material biológico no corta este azúcar. Además, en la composición del medio se incluye un indicador de pH, que cambia el color del medio alrededor de las colonias, coloreadas por los sustratos cromogénicos, cuando el azúcar es degradado.

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

El medio debería incluir en su formulación un inductor de las reacciones enzimáticas: el isopropil- β -D-tiogalactopiranosido.

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

- El medio permite la identificación y enumeración de *E. coli*, *E. coli* O157:H7 y coliformes, pero es difícil realizar una identificación adecuada de *Salmonella* e incluso imposible para algunas cepas, ya que éstas pueden presentar color blanco, al igual que otras bacterias Gram-negativas, tales como *Proteus*. En el caso de coexistir varias especies, es difícil detectar la presencia de la zona amarilla alrededor de la colonia, que es característica de la *Salmonella*, ya que ésta se produce por la acidificación del medio.
- No se pueden diferenciar *Salmonella typhi* de *Salmonella no typhi*.
- Los coliformes no pueden ser diferenciados en el medio, y se precisa del empleo de otros medios diagnósticos adicionales para la ulterior identificación de patógenos de gran importancia, tales como *Klebsiella*.
- El medio no permite la identificación y recuento de bacterias Gram-negativas no coliformes, tales como *Pseudomonas*.
- El método empleado precisa de 24 a 48 horas para la identificación y recuento de los microorganismos reivindicados, lo que lo hace tan lento como los métodos de cultivo tradicionales.
- La inclusión del sodio dodecilsulfato, acriflavina y/o antibióticos hace más compleja, de mayor costo y menor estabilidad la composición del medio. Esto ocurre principalmente por la presencia de antibióticos que deben ser añadidos como suplementos, pues son termosensibles y no pueden ser añadidos a la formulación deshidratada en polvo.
- Los ingredientes favorecedores del crecimiento en este medio no son suficientes para permitir, por sí solos, el desarrollo rápido (antes de 24 horas) de las reacciones que permiten la identificación de los microorganismos. El medio incluso necesita un inductor para la β -galactosidasa, tal como IPTG.
- El método prevé que las reacciones tengan lugar hasta 40°C, más bien 44°C, establecidos en los métodos tradicionales. Este hecho requiere establecer un nuevo parámetro en el equipo o técnicas que se utilizan de rutina.
- Los análisis microbiológicos rutinarios no prevén la temperatura de incubación de 40°C, por lo que requeriría de una extensa validación y aprobación como método oficial.

Descripción de la invención

El objetivo de la presente invención consiste en dar a conocer una mezcla nutritiva y un procedimiento para la identificación y recuento rápido de organismos Gram-negativos.

La novedad de la invención consiste en que por primera vez se da a conocer una mezcla nutritiva para la identificación y recuento rápido de organismos Gram-negativos y un procedimiento que la utiliza, basado en la aparición de al menos cinco colores diferentes, a la luz visible y de tres emisiones de color fluorescentes en las colonias; halos de 3 colores diferentes y una zona de precipitación alrededor de dichas colonias, y/o la combinación de todos estos elementos y cambios en el color del medio de cultivo.

Se aportan elementos novedosos proporcionando cantidades suficientes de triptófano. Este aminoácido esencial interviene en un número considerable de reacciones metabólicas, que sirven de base a la identificación. Dichas cantidades son suministradas, teniendo en cuenta la relación de estas con las sales orgánicas e inorgánicas y las sustancias que proporcionan la aparición de color y/o fluorescencia. El objetivo de esta mezcla es que aparezcan de manera rápida reacciones claras.

Se evidenciaron elementos nuevos e inesperados, cuando determinados organismos diana desarrollaron coloraciones no descritas previamente o emiten fluorescencia de colores no indicados anteriormente, o presentan zonas oscuras alrededor de la colonia (halo) de colores no descritos, como el caso de, por ejemplo, *Enterobacter* (fluorescencia amarillenta y centro de colonia verde grisáceo), *Citrobacter freundii* (colonia violeta oscuro con halo azul), *Salmonella* no *typhi* (centro y fluorescencia amarilla después de 24 horas), *Salmonella typhi* (zona de precipitado opaco alrededor de la colonia).

Las relaciones entre los componentes de la mezcla fueron establecidas de manera experimental, y constituyen elementos que garantizan una nueva mezcla. Esta relación de componentes no ha sido nunca descrita anteriormente.

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

- Toda la identificación y diferenciación de los organismos diana se realiza sólo con la mezcla preparada, y no se requieren pruebas adicionales o medio de cultivo.
- Al no poseer inhibidores de bacterias Gram-negativas, la composición permite el crecimiento de éstas y la identificación de las especies más importantes desde el punto de vista clínico y/o sanitario, tales como *E. coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, y además, el recuento de *E. coli* y organismos coliformes.
- La identificación de los diferentes organismos es muy segura gracias a la mezcla, pues se realiza combinando varias reacciones que tienen lugar simultáneamente. Estas reacciones están basadas en las especificidades del metabolismo de dichos organismos, y se producen gracias a proporciones adecuadas de componentes de la mezcla. Algunas de estas reacciones se han utilizado por primera vez y constituyen hallazgos, como en el caso de *Enterobacter* (*E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *E. cloacae*), que aparecen con un color de la colonias de rosa a rojo y centro verde grisáceo; y *Salmonella* no *typhi*, que aparece como una colonia de color rojo o rojo con el centro amarillo. Ambos géneros emiten fluorescencia amarillenta (después de 24 horas de incubación). Estas características permiten identificar sin riesgo de equivocación los organismos.
- La composición permite la identificación y recuento rápido de un amplio espectro de organismos Gram-negativos. Permite la identificación de *E. coli* y la diferenciación *Salmonella typhi* de no *typhi*, y organismos coliformes de mayor interés sanitario y otras bacterias Gram-negativas no coliformes tal como *Pseudomonas*. Todos estos organismos se pueden diferenciar en un solo procedimiento, en una sola placa y en un período máximo de 22 horas.
- La identificación se realiza fundamentalmente por la combinación de la aparición de 5 colores diferentes de las colonias, de 3 fluorescencias de diferentes colores, la aparición de halos de 3 colores diferentes alrededor de las colonias y de una zona de precipitado opaco alrededor de las colonias. Los cambios de color del medio pueden jugar un papel secundario, o incluso no jugarlo para identificar determinados géneros, como en el caso de *Shigella sonnei*, *E. coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa*. Este hecho disminuye el riesgo de una falsa identificación de diferentes organismos en muestras contaminadas con diferentes gérmenes.
- La composición es muy sencilla de preparar, no necesita de esterilización en autoclave, ni la adición de suplementos que aumentan el riesgo de contaminación de la muestra.
- Al prescindir de la esterilización en autoclave, se conservan mejor los nutrientes y favorecedores del crecimiento y se mantiene más estable el pH de la composición.
- Los nutrientes y favorecedores del crecimiento incorporados en la mezcla, sobre todo los ricos en triptófano, se encuentran en proporciones y cantidades absolutas tales en la composición, que garantizan la aparición de las reacciones cromáticas y bioquímicas rápidamente, en la mayoría de los casos antes de las 22 horas.

- Los componentes sólidos, que conforman las capas de la composición, son de tal naturaleza que permiten que las emanaciones fluorescentes se concentren en la zona circundante de la colonia y no difundan al resto de la placa. La mezcla permite el recuento seguro de organismos fluorescentes, dado que la fluorescencia no se difunde a la superficie del medio.
- La selección de los inhibidores del crecimiento de los organismos Gram-positivos, su contenido absoluto y la relación con los demás componentes, permiten el crecimiento adecuado de los organismos diana, a la vez que se logra la total inhibición (ausencia de crecimiento) de esos organismos Gram-positivos.
- La amplia gama de sustancias, precursores o sustratos para las reacciones enzimáticas permiten que, al añadir una tercera capa con indicadores o reveladores de reacciones, a la composición en una porción de las placas, puedan ocurrir otras reacciones que permitan la ulterior identificación de otros organismos Gram-negativos.
- La especificidad diagnóstica de la composición resultó del 100% para los organismos ensayados y la sensibilidad analítica alcanzó 10^{-6} CFU/mL a partir de una suspensión estandarizada al 50% de transmitancia.
- El balance entre nutrientes e inhibidores permite la identificación rápida y el crecimiento exuberante de los organismos diana, incluso de aquellos que generalmente crecen después de 24 horas, tal como *Salmonella*.
- Los resultados pueden ser fácilmente interpretados por personal no especializado, ya que la identificación o la diferenciación no se basa en las características morfológicas de los organismos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención da a conocer una mezcla nutritiva para la identificación y recuento rápido de organismos Gram-negativos, la cual contiene los siguientes componentes esenciales:

- una mezcla de fracciones proteicas ricas en triptófano o triptófano libre, la cual se encuentra en cantidades entre 22 y 46% de la mezcla total (peso/peso);
- una mezcla de sales orgánicas y/o inorgánicas seleccionadas que se encuentra en cantidades entre 15 y 20% de la mezcla total (peso/peso);
- una mezcla de sustancias que proporcionan la aparición de color o fluorescencia, que se encuentra en cantidades entre 0,3 y 37% de la mezcla total (peso/peso);
- sustancias inhibidoras de los organismos Gram positivos, que se encuentra en cantidades entre 2 y 4,5% de la mezcla total (peso/peso);
- y una mezcla de sustancias para dar la estructura sólida al medio, en cantidades entre 20 y 50%.

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

En la mezcla nutritiva de la invención, la mezcla de fracciones ricas en proteínas contiene dicho aminoácido triptófano en cantidades que oscilan entre 0,25 y 3,8% de dicha mezcla.

Asimismo, la mezcla de la presente invención contiene una mezcla de sales orgánicas y/o inorgánicas las cuales son seleccionadas entre NaCl, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, Na_2CO_3 y piruvato de sodio y sus mezclas, seleccionándose realizaciones preferidas de la invención NaCl y Na_2CO_3 .

Dicha mezcla de sales orgánicas y/o inorgánicas contiene las siguientes cantidades (peso/peso) con respecto a la mezcla total:

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

ES 2 294 004 T3

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

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

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

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

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

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

Otro aspecto de la invención es que la misma proporciona un procedimiento para la identificación y el recuento rápido de dichos organismos Gram-negativos, en el cual la mezcla nutritiva, una vez solidificada y en contacto con los microorganismos o las muestras que los contienen, es incubada por un período de 12 a 22 horas y a una temperatura de 30 a 45°C, a partir del cual es posible la identificación de los microorganismos a simple vista, mientras que la detección de la fluorescencia es llevada a cabo con luz ultravioleta de 360 a 366 nm.

El procedimiento de la invención permite la identificación de los microorganismos por el aspecto de cinco diferentes colores de las colonias, de emisiones fluorescentes de tres colores, de halos de tres colores, de cambios de color en el medio, y por la aparición de zonas de precipitación que rodean las colonias, y también como combinaciones de estas características.

La identificación de los organismos, empleando el procedimiento de la invención es como sigue:

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

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

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

Escherichia coli, excepto cepas verotoxigénicas - Se identifica por la aparición de colonias de color violeta claro, fluorescencia azul y medio de color rojo;

Escherichia coli O157:H7 - Se identifica por la aparición de colonias de color azul verdoso y medio naranja;

Citrobacter freundii - Se identifica por la aparición de colonias de color violeta oscuro con halo azul y medio de color rojo;

Klebsiella pneumoniae - Se identifica por la aparición de colonias de color violeta claro y medio de color rojo;

Salmonella typhi - Se identifica por la aparición de colonias de color rojo y medio de color rojo con zona de precipitado opaco;

Salmonella "no typhi" - Se identifica por la aparición de colonias de color rojo y medio de color rojo, con aparición, después de 24 horas de incubación, de color del centro y fluorescencia amarillos;

ES 2 294 004 T3

Pseudomonas aeruginosa - Se identifica por la aparición de colonias de color rosa pálido, fluorescencia verdosa antes de 24 horas de incubación y medio naranja; colonias de color pardo verdoso y zona circundante verdosa, fluorescencia verdosa después de 24 horas de incubación;

- 5 *Proteus, Providencia, Alcaligenes* y otros organismos Gram-negativos - Se identifican por la aparición de colonias incoloras o transparentes y medio naranja.

10 En una realización particular de la presente invención, cuando se utilizan X-gal y MUG como únicos componentes de la mezcla que proporciona el color o fluorescencia, la identificación de coliformes totales se realiza por el color de las colonias azul verdoso, y específicamente para *E. coli*, además por la fluorescencia azul.

Para la conformación de la mezcla nutritiva se realizan las operaciones siguientes:

- 15 Las sustancias que aportan las fracciones proteicas ricas en triptófano y/o triptófano libre en cantidad de 22 a 46%, se pesan en un frasco cónico, teniendo en cuenta que la mezcla debe contener entre 0,25 y 3,8% de este aminoácido respecto a su peso seco. Este frasco debe tener un volumen nominal dos veces mayor al de la mezcla nutritiva a preparar.

- 20 Seguidamente se pesa el conjunto de sales orgánicas e inorgánicas y se añade a la mezcla anterior, en cantidad de 15 a 20% con respecto al peso seco de la mezcla nutritiva.

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

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

- 30 Separadamente, en la balanza analítica, se pesa la premezcla de las sustancias que proporcionan la aparición de color o fluorescencia, en cantidad de 0,3 a 37%.

35 La premezcla de estas sustancias debería contener sorbitol en cantidades de 15 a 36,5%, MUG de 0,16 a 0,18%, X-GAL de 0,16 a 0,36% y rojo neutro de 0,09 a 0,11%, con respecto al peso seco de la mezcla nutritiva.

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

- 40 Finalmente la solución preparada se añade a la mezcla de agarosa y agarpectina y/o se vierte sobre estructuras formadas por las diferentes formas de las mezclas de celulosa y hemicelulosa.

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

50 En caso de utilizar la mezcla de celulosa y hemicelulosa, primero se esteriliza esta (con vapor húmedo a 121°C durante 15 minutos o con óxido de etileno o mediante irradiación). Posteriormente se coloca en los recipientes finales de ensayo y se le añade la solución anteriormente preparada en una cantidad de 2 a 4 mL (por cada recipiente).

55 En ambos casos pueden ser colocadas otras capas formadas por nitrato de celulosa y/u otros derivados de la celulosa, tales como el acetato de celulosa, tanto durante como después de la inoculación, para proporcionar una superficie sólida para el desarrollo de colonias de organismos diana, o para revelar una reacción específica.

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

- 60 La interpretación de los resultados se realiza observando el color de la colonia aislada, el color del medio de cultivo y la presencia de un precipitado opaco o colonias con zona circundante coloreada (halo), la presencia y color de emisiones fluorescentes y también es posible observar la morfología colonial.

65

ES 2 294 004 T3

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

TABLA 1

Características de las colonias y del medio

Microorganismo	Color de la colonia	Bordes de la colonia	Color del medio	Precipitado o zona coloreada	Fluorescencia
<i>Escherichia coli</i> , excepto verotoxigénica	violeta claro	redondos	rojo	-	+ azul
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	verde azul	redondos	naranja	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	verde azul	irregulares	naranja	-	+ azul
<i>Shigella flexneri</i>	rosa pálido	redondos	naranja	-	azul en ocasiones
<i>Enterobacter spp.</i>	rojo con centro verde grisáceo	redondos	rojo	-	+ amarilla
<i>Citrobacter freundii</i>	violeta oscuro	redondos	rojo	halo azul	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	violeta claro	redondos	rojo	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	rojo	redondos	rojo	precipitado opaco	-
<i>Salmonella</i> no <i>typhi</i>	rojo (con centro amarillo)	redondos	rojo	-	(+ amarilla)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	rosa pálido a [pardo verdoso]	irregulares	naranja	(halo verdoso)	+ verdosa
<i>Proteus</i> , <i>Providencia</i> y otros organismos Gram-negativos	incolora	-	naranja	-	-
() Características que pueden observarse después de 24 horas de incubación					

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

(Tabla pasa a página siguiente)

Ejemplos

Ejemplo N° 1

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

TABLA 2

Composición de la mezcla

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

40 48 g de esta mezcla se suspendieron en 1 L de agua destilada o desionizada.

El ensayo se realizó comprobando el comportamiento de diferentes cepas de enterobacterias respecto a las pruebas bioquímicas predeterminadas.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 294 004 T3

Los resultados obtenidos (tabla 3) fueron los siguientes:

TABLA 3

Resultado del crecimiento en la mezcla

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

Después de incubar 24 horas a 35±2°C, se colocó en las tapas de los recipientes utilizados, una capa delgada de celulosa impregnada con el reactivo de Kovacs. En los contenedores en los que se inocularon los microorganismos productores de indol (*E. coli*, *P. vulgaris* y *Aeromonas hydrophila*) el color de la capa de celulosa se tornó rosada en un intervalo de 30 minutos.

Ejemplo N° 2

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

TABLA 4

Composición de la mezcla descrita en el ejemplo 2

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

La siembra de diferentes organismos de colección ATCC se realizó mediante el método de siembra de la superficie para obtener colonias aisladas.

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

ES 2 294 004 T3

TABLA 5

Crecimiento a las 6 horas de incubación

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

TABLA 6

Crecimiento a las 11 horas de incubación

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

TABLA 7

Crecimiento a las 19 horas de incubación

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

TABLA 8

Crecimiento a las 24 horas de incubación

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

ES 2 294 004 T3

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

A continuación la misma formulación de mezcla nutritiva (identificada en adelante como exp) se inoculó con las diluciones 10^{-6} a partir de las suspensiones (estandarizadas a 50% de transmitancia) de organismos ensayados seleccionados.

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

La observación de los resultados de crecimiento se realizó a las 6, 12, 19, 24 y 40 horas de incubación (tablas 9, 10 y 11). Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

TABLA 9

Crecimiento a las 6 horas de incubación

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

TABLA 10

Crecimiento a las 12 horas de incubación

Microorganismo	Var	Color (Medio)	Color (Colonia)	CFU
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	exp	No se observa crecimiento		
	C			
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	exp	Rojo	rojo	9,5
	C	Amarillo	azul	22
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 23355	exp	Rojo	rojo	9
	C	Amarillo	azul	19
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	exp	No se observa crecimiento		
	C			
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	exp	Rojo	rojo	11
	C	Amarillo	incolora	1
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430	exp	No se observa crecimiento		
	C			
exp. : experimental				
C: control				

TABLA 11

Crecimiento a las 19 horas de incubación

Microorganismo	Var	Color del medio	Color de la colonia	CFU
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	exp	Rojo	violeta	$5 \pm 3,5$
	C	Amarillo	azul	$30 \pm 2,5$
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	exp	Rojo	rojo con centro verde	$20 \pm 16,3$
	C	Amarillo	azul	$26 \pm 2,1$
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 23355	exp	Rojo	rojo con centro grisáceo	$20 \pm 4,9$
	C	Amarillo	azul	$21 \pm 4,2$
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	Exp	Rojo	violeta	$11 \pm 0,3$
	C	Amarillo	azul	$6 \pm 2,8$
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	exp	Rojo	rojo	$56 \pm 9,2$
	C	Amarillo	incolora	$4 \pm 0,7$
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430	exp	Rojo	rojo	$34 \pm 33,9$
	C	Amarillo	incolora	$25 \pm 17,6$
c. : centro exp. : experimental C: control				

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

Crecimiento a las 24 horas de incubación

El número de colonias no ha cambiado y el color azul en los centros de las colonias se ve más intenso.

Crecimiento a las 40 horas de incubación

Desaparece el color rojo y predomina el color azul en coliformes y las colonias rojas de *Salmonella* se volvieron amarillas.

Ejemplo N° 3

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

Escherichia coli ATCC 10536

Streptococcus faecalis ATCC 29212

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

Las composiciones experimentales (MN) tomadas como factores experimentales diferentes se muestran en la tabla 12.

TABLA 12

Composición según el ejemplo 3

Ingrediente	% de peso seco				
	MN1	MN2	MN3	MN4	MN5
Composición proteica obtenida por extracción de levaduras	18,5	17	12,5	17,3	11
Digerido de proteínas animales con un alto contenido de caseína	18,5	17	12,5	17,3	16,5
Composición libre de proteínas y rica en fracciones proteicas de origen animal	7,4	15	17,8	6,9	16,5
Desoxicolato de sodio	3,6	3,3	0	3,5	0
Sales biliares	0	0	4,5	0	4,4
Piruvato de sodio	0	1,7	0	0	0
Sulfato de amonio	0	0	0	3,5	0
Sorbitol	35	29	35	34,5	34,4
Cloruro de sodio	17	17	17,7	17	17,2

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

Como se observa en la figura 1, sólo en la mezcla nutritiva MN3 la gama de crecimiento de *E. coli* es menor que en las mezclas de referencia, mientras que la variante MN2 promueve al máximo su crecimiento a las 3 horas de incubación. A las 6 horas, prácticamente no hay diferencias en la promoción del crecimiento entre las variantes, a excepción de la mezcla MN3.

En la figura 2 se observa que en todas las composiciones propuestas en la presente invención *Streptococcus faecalis* se encuentra mejor inhibido en comparación con el medio de diagnóstico de referencia.

Ejemplo N° 4

En este ensayo se utilizó la formulación mostrada en la tabla 13:

TABLA 13

Mezcla correspondiente al ejemplo 4

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

En este estudio, para la inoculación se utilizó el método de inundación de superficie ("spread plating").

ES 2 294 004 T3

Todos los recipientes se incubaron a 35°C durante 24 horas.

Se inocularon suspensiones diluidas 10^{-6} de las cepas de los microorganismos coliformes, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, y la suspensión diluida 10^{-1} de *Streptococcus faecalis* ATCC 29212.

El Caldo EC con MUG (Difco) con adición de agar (13,0 g/L), se utilizó como medio de referencia y fue denominado como "control" (C).

Los resultados obtenidos fueron los siguientes (tabla 14):

TABLA 14

Resultados del crecimiento de los microorganismos en las mezclas experimental y control

Microorganismo	Var	Color (Medio)	Color (Colonia)	Fluoresc.	CFU/mL
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (dil. 10^{-5})	exp	Rojo	roja con centro Azul	+	$361 \pm 23,4$
	C	amarillo	Blanca	+	$313 \pm 44,6$
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 (dil. 10^{-5})	exp	rojo	roja con centro Verde	-	$284 \pm 33,4$
	C	amarillo	blanca	-	$137 \pm 18,3$
exp: mezcla descrita en la presente invención					
C: formulación control					

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

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

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

Seguidamente se inocularon 10 mL de la muestra de agua potable de un depósito de almacenamiento en las mismas variantes de mezcla nutritiva (tabla 15).

TABLA 15

Detección de crecimiento en muestra de agua potable

Microorganismo	Var	Color (Medio)	Color (Colonia)	Fluoresc.	CFU/mL
Agua potable estancada	exp	rojo	rojo con centro verdoso	-	$44 \pm 4,6$
	C	amarillo	verde grisáceo	-	$16 \pm 4,2$
exp: mezcla descrita en la presente invención					
C: formulación control					

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

ES 2 294 004 T3

Prueba	Resultado
Utilización del citrato	+
Descarboxilación de la lisina	+
Descarboxilación de la ornitina	+
Descarboxilación de la arginina	-
Agar Hierro Kligler	A/A Gas + H ₂ S-
Ureasa	-
Movilidad	+
Producción de indol	-
Rojo de metilo	-
Voges-Proskauer	+

Existe diferencia significativa ($p < 0,05$) en el contejo de colonias, a favor de la variante experimental de la mezcla nutritiva y frente al medio de referencia (Difco) con adición de agar (13 g/L) y X-GAL (1,0 g/L).

Ejemplo N° 5

Se preparó la misma mezcla nutritiva que en el Ejemplo N° 4, pero la cantidad total de las fracciones proteicas ricas en triptófano se estableció en: 40,4; 37,7 y 34,8% en peso seco (V1, V2 y V3, respectivamente).

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

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 16.

TABLA 16

Crecimiento de diferentes organismos en la mezcla experimental

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

El contejo de colonias de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 llevado a cabo en todas las variantes fue similar ($p > 0,05$).

Paralelamente las otras tres variantes sin la mezcla de agarosa y agarpectina, se utilizaron para el análisis de curva de crecimiento de los microorganismos Gram-negativos (control positivo) y Gram-positivos (control negativo). El medio de referencia utilizado fue Caldo EC con MUG de la firma Difco.

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

Ejemplo N° 6

Se preparó la mezcla nutritiva como la variante V2 del ejemplo N° 5, con concentraciones de cadena recta doble de rojo neutro de MUG. La mezcla de agarosa y agarpectina se substituyó por la mezcla de celulosa y hemicelulosa para proporcionar una estructura sólida para el desarrollo de las colonias (exp) del organismo diana. Todos los ingredientes mencionados conforma la primera capa de la mezcla nutritiva.

ES 2 294 004 T3

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

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

Los resultados de la lectura a las 18 h de incubación se muestran a continuación en la tabla 17:

TABLA 17

Crecimiento de diferentes cepas en la mezcla descrita en el ejemplo 6

Microorganismo	Var	Color (Medio)	Color (Colonias)	Fluoresc.	CFU
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	exp	rojo	violeta claro	+azul	$170 \pm 7,8$
	C	rojo	rojo	-	$167 \pm 23,3$
<i>Escherichia coli</i> O157 H:7 ATCC 35150	exp	naranja	azul verdoso	-	$192 \pm 11,5$
	C	rojo	rojo	-	$103 \pm 18,7$
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC13048	exp	rojo	roja con centro verde	+ amarilla	$272 \pm 37,5$
	C	rojo	rojo	-	$99 \pm 76,8$
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	exp	rojo	Rojo	-	$26 \pm 11,1$
	C	sin cambio	Incolora	-	$24 \pm 23,6$
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	exp	rojo	violeta oscuro con halo azul	-	$205 \pm 6,43$
	C	rojo	rojo	-	$166 \pm 13,7$
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	exp	rojo	violeta oscuro	-	$115 \pm 40,3$
	C	rojo	rojo	-	$277 \pm 98,5$
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	exp	naranja	azul verdoso	+ azul	$159 \pm 28,6$
	C	sin cambio	Incolora	-	$92 \pm 13,6$
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	exp	naranja	incolora o rosada pálida	-	$181 \pm 52,9$
	C	sin cambio	Incolora	-	$9 \pm 1,5$
exp: mezcla descrita en la invención					
C: medio control					

Escherichia coli, *Salmonella typhimurium* *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*.

El número de colonias de *Shigella sonnei* y *Enterobacter aerogenes* en la mezcla nutritiva experimental y el Agar Bílico de Rojo Violeta no eran significativamente distintos ($p < 0,05$). Si bien los números de colonias de *Escherichia coli* O157:H7 y *Shigella flexneri* eran significativamente más elevados en la mezcla nutritiva. La suspensión de baja dilución (10^{-1}) de *Staphylococcus aureus* se mostró completamente inhibida (incubación hasta 48 h).

Se llevó a cabo un estudio comparativo de recuperación de diferentes bacterias Gram-negativas en el mismo compuesto de la mezcla nutritiva y en el caldo m-Endo (Difco). Ambos medios fueron inoculados por el método de filtrado de membrana obteniendo los siguientes resultados (tabla 18):

TABLA 18

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

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

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

Inesperadamente se detectó la formación de un halo azul (zona circundante a la colonia) alrededor de las colonias de *Citrobacter freundii* en esta composición de la mezcla nutritiva.

Los contajes de colonias de *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 13883, y *S. typhimurium* ATCC 14028 en la mezcla experimental fueron significativamente mayores ($p < 0,05$), mientras que el número de colonias de los microorganismos restantes en ambas mezclas fue similar. Estos resultados se pueden apreciar en la Fig. 7 que se muestra en los anexos.

Ejemplo N° 7

Se inocularon en paralelo la mezcla nutritiva con la misma composición de la variante V2 del Ejemplo N° 5 y el Agar S.S.

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

El inóculo se preparó del siguiente modo:

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

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

El enriquecimiento se realizó en 10 mL de Caldo Selenito inoculado con 1 mL de esta mezcla, y se incubó durante 24 horas a 43°C.

ES 2 294 004 T3

Una muestra tomada con un bucle calibrado del Caldo Selenito se inoculó en las placas de Petri con la mezcla nutritiva según la invención y Agar S.S. Todas las placas se incubaron a 43°C.

Los resultados de crecimiento se analizaron tras 24 horas de incubación. En las placas con la mezcla nutritiva se observaron tres tipos de colonias:

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

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

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

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

TABLA 19
Pruebas bioquímicas de confirmación

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

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

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

Ejemplo 8

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

TABLA 20

Composición de la mezcla correspondiente al ejemplo 8

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

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

A continuación en la tabla 21 se resumen los valores de las incidencias de los patógenos identificados.

TABLA 21

Incidencia de los patógenos identificados por pruebas bioquímicas

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

Se determinó la sensibilidad diagnóstica y la especificidad diagnóstica de la mezcla experimental.

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

Breve descripción de las figuras

figura 1: Resultados del crecimiento de *E. coli* ATCC 10536. Se observa que sólo en la mezcla nutritiva MN3, el crecimiento de *E. coli* fue menor que en las mezclas de referencia, mientras que la variante MN2 a las 3 horas de incubación promueve mejor su crecimiento. A las 6 horas, prácticamente no hay diferencias en la promoción del crecimiento entre las variantes, a excepción de la mezcla MN3.

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

ES 2 294 004 T3

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

5 figura 4: Crecimiento de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 en las mezclas V1, V2 y V3 y en el medio de referencia

figura 5: Crecimiento de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 en las mezclas V1, V2 y V3 y en el medio de referencia.

10 figura 6: Crecimiento de *Streptococcus faecalis* ATCC 29212 en las mezclas V1, V2 y V3 y en el medio de referencia

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

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Mezcla nutritiva para la identificación y recuento rápido de organismos Gram-negativos que contiene:

- una mezcla de fracciones proteicas ricas en triptófano o triptófano libre, la cual se encuentra en cantidades entre el 22 y el 46% de la mezcla total (peso/peso), y en el que dicho triptófano aminoácido se encuentra en cantidades de 0,25 a 3,8% de dicha mezcla;
- una mezcla de sales orgánicas y/o inorgánicas en cantidades entre el 15 y el 20% de la mezcla total (peso/peso) en la que dicha mezcla de sales orgánicas y/o inorgánicas son seleccionadas entre el grupo que consiste en NaCl, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, Na_2CO_3 y piruvato sódico y sus mezclas, preferentemente seleccionadas entre NaCl y Na_2CO_3 , interviniendo en dicha mezcla en las siguientes proporciones:
 - NaCl de 7 a 18%;
 - K_2HPO_4 de 6 a 11%;
 - KH_2PO_4 de 2 a 5%;
 - $(NH_4)_2SO_4$ de 1 a 4%;
 - Na_2CO_3 de 0,1 a 0,4%; y
 - Piruvato sódico de 0,7 a 3%.
- una mezcla de sustancias que proporcionan color o fluorescencia en cantidades comprendidas entre 0,3 y 37% de la mezcla total (peso/peso) de manera que dichas sustancias son seleccionadas entre el grupo que consiste en X-GAL, MUG, Sorbitol y Rojo Neutro, siendo seleccionadas preferentemente entre X-GAL y MUG, y encontrándose en dicha mezcla en las siguientes cantidades:
 - X-GAL de 0,16 a 0,36%;
 - MUG de 0,16 a 0,18%;
 - Sorbitol de 15 a 36,5%; y
 - Rojo Neutro de 0,09 a 0,11%;
- sustancias inhibidoras de los organismos Gram-positivos en cantidades de 2 a 4,5% de la mezcla total (peso/peso); y
- una mezcla de sustancias que proporcionan estructura sólida al medio, en cantidades de 20 a 50%;

teniendo dicha mezcla nutritiva una vez preparada un pH comprendido entre 6,6 y 7, 2.

2. Mezcla nutritiva, según la reivindicación 1, en la que las sustancias inhibidoras de los organismos Gram-positivos son desoxicolato sódico y sales bílicas.

3. Mezcla nutritiva, según la reivindicación 1, en la que la mezcla de sustancias que proporcionan estructura sólida al medio comprende las siguientes combinaciones y cantidades con respecto a la mezcla total (peso/peso):

- agarosa y agarpectina en cantidades de 19 a 48%, con nitrato de celulosa en cantidades de 0,1 a 0,4%; o bien
- celulosa y hemicelulosa en cantidades de 1,4 a 3%, con nitrato de celulosa en cantidades de 0,1 a 0,4%; o bien
- agarosa y agarpectina solamente, en cantidades desde 19 a 48%.

4. Procedimiento para la identificación y conteo rápido de organismos Gram-negativos, en el que la mezcla nutritiva de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, después de su solidificación y encontrándose en contacto con los microorganismos o mezclas que contienen los mismos, es incubada durante un período de tiempo de 12 a 22 horas, a una temperatura de 30 a 45°C, a partir de la cual es posible la identificación de dichos microorganismos por observación inmediata, mientras que la detección de fluorescencia es llevada a cabo con luz ultravioleta de 360 a 366 nm.

5. Procedimiento, según la reivindicación 4, en el que la identificación de los microorganismos es posible por la aparición de cinco diferentes colores de colonias, de emisiones fluorescentes de tres colores, de halos de tres colo-

ES 2 294 004 T3

res, de cambios de color del medio, y de la aparición de zonas de precipitación que rodean las colonias, así como combinaciones de estas características.

6. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que la identificación de los organismos a detectar es llevada a cabo del modo siguiente:

Shigella sonnei - Por el aspecto de las colonias azul verdoso con fluorescencia azul y medio naranja;

Shigella flexneri - Por aparición de colonias de color rosa pálido, halo amarillento y el color del medio es naranja;

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

Escherichia coli, excepto cepas verotoxigénicas - Por aparición de colonias violeta pálido, fluorescencia azul y medio rojo;

Escherichia coli O157:H7 - Por el aspecto de colonias de color azul verdoso y medio de color naranja;

Citrobacter freundii - Por la aparición de colonias violeta oscuro con halo azul y medio rojo;

Klebsiella pneumoniae - Por la aparición de colonias de color violeta claro y medio rojo;

Salmonella typhi - Por la aparición de colonias de color rojo y medio rojo con una zona de precipitado opaco;

Salmonella “no typhi” - Por la aparición de colonias de color rojo y medio rojo; después de 24 h de incubación el color del centro pasa a amarillo y muestra fluorescencia de color amarillo;

Pseudomonas aeruginosa - Por la aparición de colonias rosa pálido, fluorescencia verdosa antes de 24 h de incubación y medio de color naranja; colonias de color marrón verdoso y zona verdosa circundante, fluorescencia de color verdoso después de las 24 h de incubación;

Proteus, *Providencia*, *Alcaligenes* y otros organismos Gram-negativos - Por la aparición de colonias incoloras o transparentes y medio de color naranja.

7. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que cuando se utiliza X-gal y MUG como componentes únicos de una mezcla que proporcionan el color o la fluorescencia, la identificación total se realiza por el color azul verdoso de las colonias, y específicamente para *E. coli*, también por su fluorescencia azul.

Figura 1

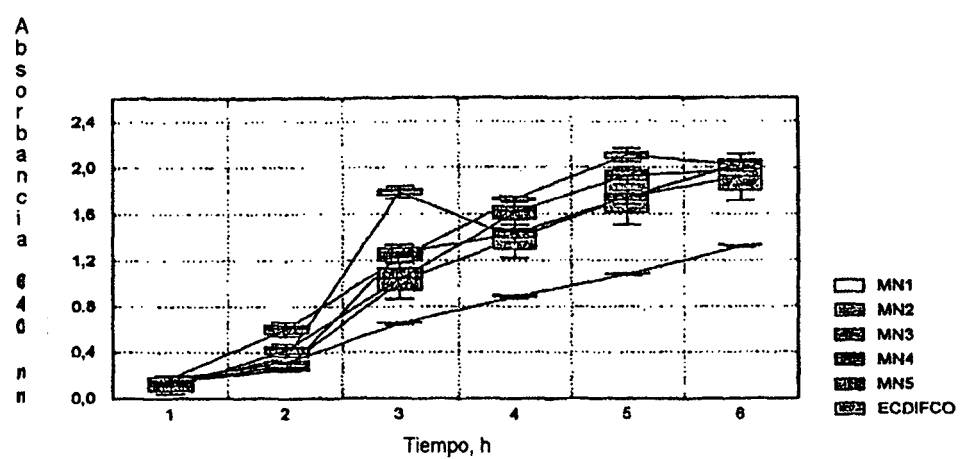


Figura 2

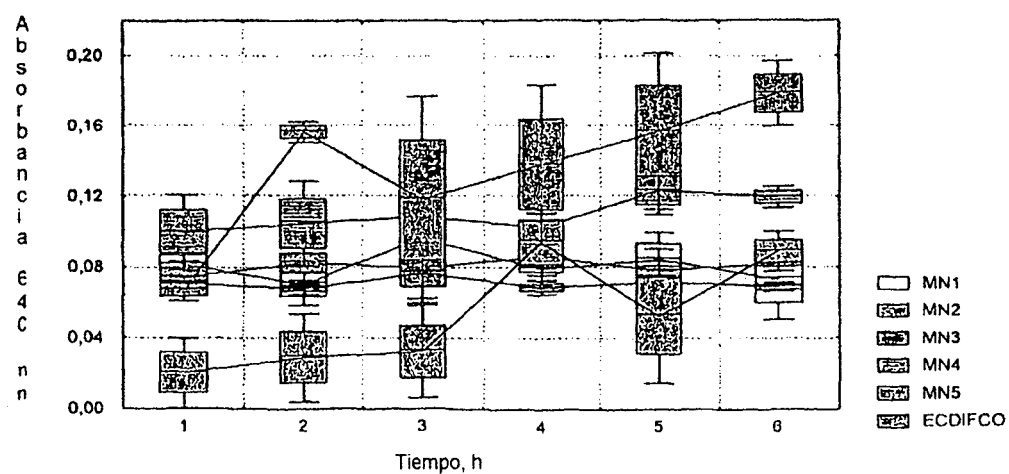


Figura 3

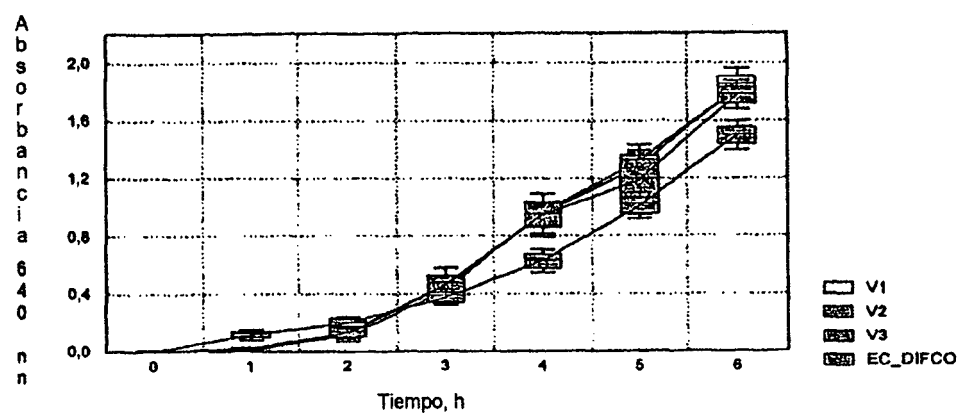


Figura 4

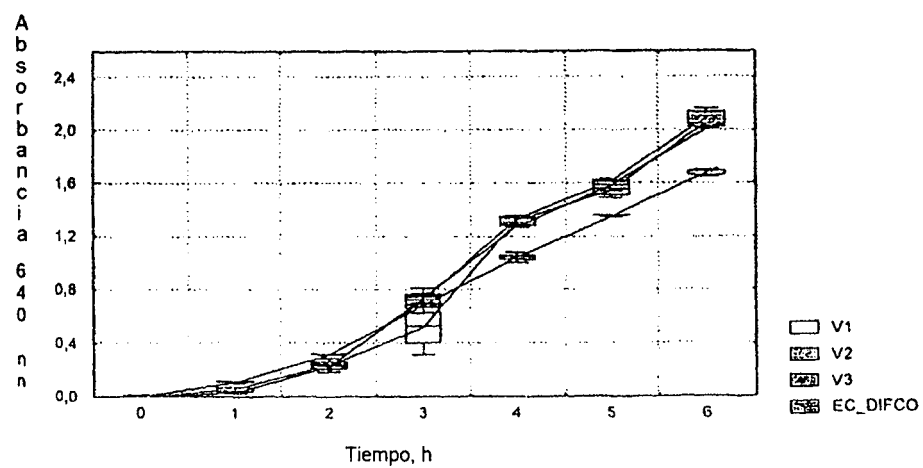


Figura 5

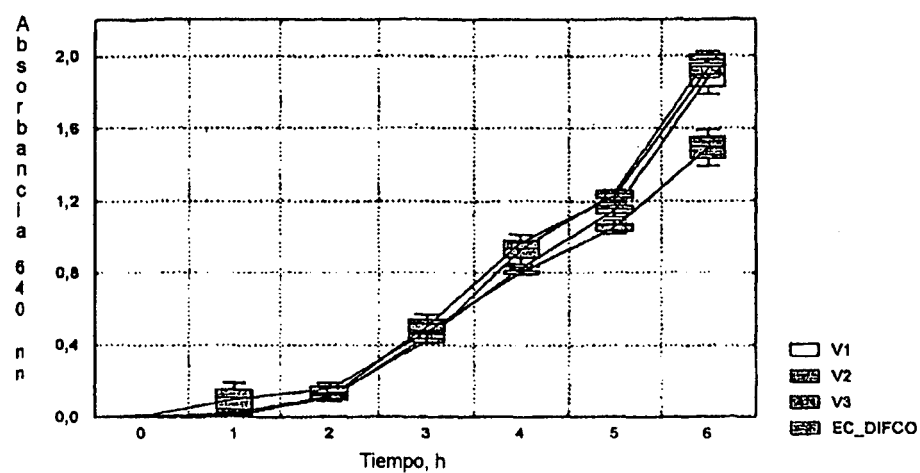


Figura 6

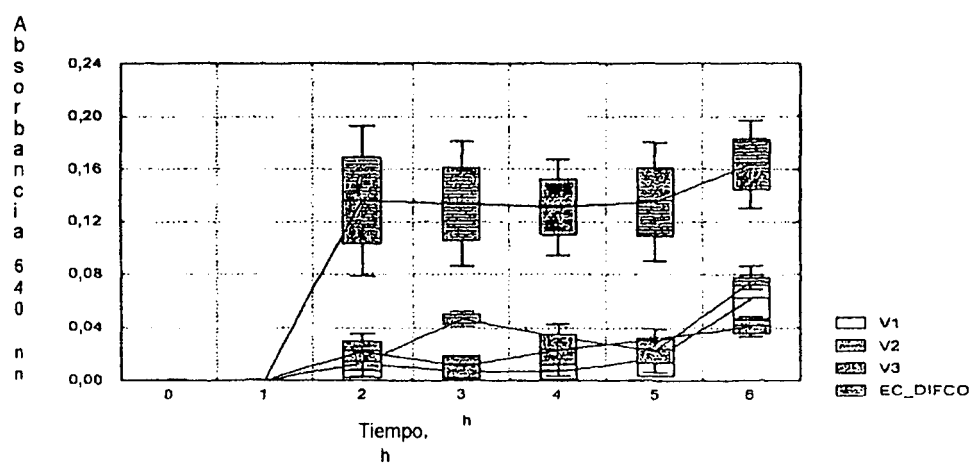


Figura 7

