



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 358 076**

(51) Int. Cl.:

**C12Q 1/04** (2006.01)

**C12N 1/16** (2006.01)

**C12R 1/72** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06846928 .7**

(96) Fecha de presentación : **19.12.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1970450**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **17.09.2008**

(54) Título: **Medio nutritivo para el cultivo de levaduras.**

(30) Prioridad: **19.12.2005 CU 2702005**  
**05.12.2006 CU 2382006**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.05.2011**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.05.2011**

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

(72) Inventor/es: **Lobaina Rodríguez, Tamara;**  
**Rodríguez Martínez, Claudio;**  
**Zhurbenko, Raisa;**  
**García Marichal, José Miguel y**  
**Zayas Ruiz, Yordania**

(74) Agente: **Aznárez Urbieto, Pablo**

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

## DESCRIPCIÓN

Medio nutritivo para el cultivo de levaduras

Objeto de la invención y estado de la técnica

5 La presente invención se relaciona con el campo del diagnóstico microbiológico y más específicamente con el cultivo e identificación de levaduras de importancia clínica y, en particular, de diferentes especies del género *Candida*.

10 En la patente de Estados Unidos No. 4144133, se reivindica el uso de bilis de buey, saponina purificada y un sustrato para la detección de la enzima fenol oxidasa, que posibilita la identificación de hongos patógenos, específicamente *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*. Sin embargo, este método no permite el crecimiento, identificación y diferenciación de todas las especies de *Candida* de importancia clínica o ambiental.

15 Komatsu Osamu, en la patente de Japón JP2003310298, describe un método para discriminar *Candida albicans* y *Candida tropicalis* de otros hongos, utilizando el sustrato X-glc. La especificidad de este sustrato no garantiza la adecuada diferenciación de todas las especies de *Candida* de interés clínico y/o ambiental.

20 Beckford, O. A. y colaboradores, en la patente No. 4030980, describen un aparato para el aislamiento e identificación de levaduras de origen médico que comprende el uso de varias pruebas bioquímicas y medios de cultivo para la identificación de especies de *Candida*, entre otros microorganismos. El aparato y la técnica para su empleo presentan como inconvenientes fundamentales: la complejidad para la producción de dicho dispositivo, complejidad en la inoculación de cada uno de los pocillos y la necesidad de aislamiento de las colonias, entre otras desventajas. Las desventajas relevantes consisten en que los pocillos con las pruebas bioquímicas no contienen sustancias nutritivas suficientes ni apropiadas para el crecimiento de las especies de *Candida*, y la identificación se realiza teniendo en cuenta múltiples respuestas bioquímicas, por lo que una respuesta atípica en uno de los pocillos puede conllevar a una identificación errónea.

30 En la patente de Gran Bretaña GB 730763, se describe un medio de cultivo para el aislamiento e identificación de especies del género *Candida* que incluye en la formulación una sal inorgánica de bismuto y sulfito de sodio, en conjunto con un agente solidificante. También se incluyen en el medio un carbohidrato soluble, piruvato de sodio, glicina, fosfato orgánico y extracto de levadura. Este medio de cultivo posee una serie de deficiencias técnicas, específicamente:

- 35 - No posee los nutrientes necesarios para garantizar el crecimiento abundante y rápido de todas las especies de *Candida* de interés, ya que contiene una sola fuente de vitaminas, específicamente el extracto de levadura y cuyo contenido de minerales, en particular de magnesio, no es suficiente para activar de manera significativa el complejo sistema enzimático de estos microorganismos.
- De manera similar, el medio comprende una sola fuente de energía – piruvato de sodio – que no es suficiente para garantizar por igual el crecimiento rápido y abundante de las distintas especies de *Candida*.
- El medio no permite la diferenciación de las distintas especies de *Candida* entre ellas.
- 40 - La glicina por sí sola no es capaz de garantizar el nitrógeno suficiente para la síntesis de aminoácidos, proteínas, enzimas y, por tanto, para un crecimiento rápido y exuberante de las especies de *Candida*.

45 Jesús Ruiz-Aragón y colaboradores (Evaluación de un nuevo medio CHROMOagar *Candida* para la identificación presuntiva de levaduras. Revista de Diagnóstico Biológico. V.52(1), 2003), compararon el nuevo medio CHROM M con los medios CHROM O y CHROM R (Beckton Dickinson). En la tabla 1 de dicho artículo se aprecia que el CHROM O no fue capaz de diferenciar todas las especies de *Candida* evaluadas entre sí. En el caso de CHROM R tampoco todas las especies de interés pueden ser totalmente diferenciadas y en el medio CHROM M varias especies presentan igual o similar coloración. Los autores destacan que los resultados se aprecian mejor solo después de 48 horas de incubación.

50 Además, concluyen que CHROM M no demostró la misma eficacia para la identificación de especies de levaduras ya que presenta menor sensibilidad, necesita mayor tiempo de incubación para que las colonias se desarrollen y dificulta la diferenciación de algunas especies de interés clínico como *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis*.

55 En la patente de Estados Unidos No. 5449612, se describe un método de identificación de cepas de *Candida albicans* y *Torulopsis glabrata*, utilizando sustratos cromogénicos de monoaminoácidos o péptidos sin necesidad de aislar la cepa a identificar. En la composición del medio se incorpora la cicloheximida para inhibir el crecimiento de algunas especies de *Candida* diferente a *Candida albicans* lo

que limita las posibilidades diagnósticas de esta variante del medio. La adición de sustancias antibacterianas, tales como la gentamicina, le restan estabilidad al medio preparado y su conservación no puede ser prolongada. El cloranfenicol, además, interfiere en el desarrollo de las reacciones cromogénicas.

- 5 Además, las bases nutritivas empleadas como fuente de nitrógeno de la invención (Yeast Nitrogen Base, Neopeptone, Proteose Peptone, Bacto Peptone y Extracto de Levadura) por sí solos o en las combinaciones entre ellos no garantizan el contenido de vitaminas y minerales, macro y micro elementos, suficientes para el crecimiento temprano de todas las especies de *Candida*.
- 10 En la patente de Estados Unidos No. 5534415, se describe un medio selectivo y diferencial para el crecimiento y detección de *Candida albicans*. La esencia del medio consiste en poseer una base nutritiva metabolizada por las levaduras, un sustrato cromogénico o fluorogénico capaz de ser hidrolizado por la enzima hexosaminidasa asociada a *Candida albicans* y al menos un compuesto que contiene hexosaminidasa capaz de activar la enzima hexosaminidasa. Los componentes que proporcionan fuente de nitrógeno al medio son las peptonas en cantidades de 0,01 hasta 40 g/L como, por ejemplo, la peptona de carne, la peptona de soya y mezclas de peptonas, y extracto de levadura, en cantidades de 0,01 hasta 15 40 g/L. Estos componentes nitrogenados por sí solos no brindan todos los nutrientes ni las vitaminas necesarias para un crecimiento profuso y temprano de todas las especies de *Candida* y, además, no garantizan de ninguna manera reacciones cromogénicas bien definidas y de coloración intensa en las primeras horas de crecimiento de las especies de *Candida*.
- 20 La inclusión en la formulación de fuentes de carbono, en las concentraciones señaladas por los autores, tales como: glucosa, acetato, lactato, aminobutirato, entre otros, o sus mezclas sólo puede ser empleada en combinación con este tipo de sustrato cromogénico específico, ya que competiría con la actividad enzimática de otras especies de *Candida* y limita, a su vez, la posibilidad de incorporar otros sustratos cromogénicos o fluorogénicos para identificar o diferenciar otras especies de *Candida*. Tal es el caso de la 25 glucosa que impediría o debilitaría la actividad de la glucosidasa. En la composición del medio se incluyen tampones tales como fosfatos, TRIS, HEPES y citratos, los cuales se encuentran en cantidades que garantizan un pH en la región cercana a 7, lo que solo favorece a *Candida albicans*, y no así a otras especies del género de interés sanitario o ambiental.
- 30 Otros activadores pueden ser adicionados al medio como sales de magnesio, manganeso y calcio en cantidades de 0 a 10 mMol/L.
- En la formulación también se incluyen sustancias que aumentan la permeabilidad celular tales como sales biliares, desoxicolato de sodio, polioxietilenglicol y éteres de alquil fenol, sorbitán y ésteres de ácidos grasos en una concentración de 0 a 5 g/L. Algunas de estas sustancias como, por ejemplo, las sales biliares resultan en extremo inhibitorias para algunas especies de *Candida*, incluso para *Candida albicans*.
- 35 También al medio se le adiciona una mezcla de inhibidores de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, tales como gentamicina, penicilina, entre otros. Estas sustancias, en su mayoría, son inestables al calor y deben ser preparados y utilizados con rapidez. Además, los medios preparados, listos para el uso en placas de Petri, deben ser almacenados en refrigeración por períodos de conservación no prolongados y éstos se enmarcan entre los 2 y máximo 30 días.
- 40 Se describe la posibilidad del empleo de telurito y molibdato o sus mezclas que resultan igualmente altamente inhibitorios para algunas especies de *Candida*.
- Dentro de otras desventajas evidentes de los distintos medios descritos en la invención, se puede mencionar que incluso después de 24 horas de incubación no todas las colonias de *Candida albicans* desarrollaron una coloración fuerte y se requirió de más de 48 horas para que la mayoría de *Candida albicans* dieran una respuesta de color intenso, otras especies de *Candida* no dieron respuesta (Tablas II 45 y III del trabajo original).
- Varios autores han reportado el uso de extractos vegetales con diferentes propósitos para el cultivo o diferenciación de especies de *Candida*.
- 50 Zia U. Khan y colaboradores (Tobacco Agar, a New Medium for Differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*, J. Clin. Microb., v. 42(10):4796-4798, 2004), emplearon el agar de semillas de girasol para cultivar *Candida dubliniensis*, igualmente describen el uso de extracto de hojas de tabaco y nicotina en un medio de cultivo. Ninguno de los extractos empleados aporta las vitaminas y los azúcares suficientes y adecuados para el crecimiento de las especies de *Candida* de interés. Tampoco los medios permiten diferenciar todas las especies entre ellas y, por último, la diferenciación e identificación se basa 55 no sólo en los disímiles colores, sino en las características morfológicas de las colonias basadas en la producción de clamidosporas por lo que se requiere de un personal calificado para la lectura e interpretación de los resultados.

- Dostál y colaboradores, en el 2003, describieron el empleo de un medio que contiene hemoglobina bovina, extracto de levadura y azul de bromofenol para detectar actividad proteolítica de *Candida*. (Dostál J., Hamal P., Pavlicková L., Soucek M., Ruml T., Pichova I., Hruskova-H. O. Simple Method for Screening *Candida* Species Isolates for the Presence of Secreted Proteinases: A Tool for the Prediction of Successful Inhibitory Treatment. J. Clin. Microbiol. 2003, Feb., 41 (2):712-716). Los inconvenientes fundamentales radican en que la hemoglobina sólo detecta la actividad asparto-proteasa presente en todas las especies, por lo que no es útil para diferenciarlas entre ellas. Además, se requiere de filtrar la hemoglobina y adicionarla como suplemento en condiciones de asepsia, lo que dificulta el procedimiento. Otras deficiencias consisten en la necesidad de disolver el indicador en etanol, el pH del medio es excesivamente bajo (4-4,5) y no es el óptimo para la promoción del crecimiento de levaduras, la temperatura de incubación es a 30 grados y no resulta óptima y la detección de la actividad proteolítica se puede extender hasta 5-7 días.
- Bramono K. y colaboradores, en el 2006, estudiaron diferentes actividades enzimáticas en especies de *Candida*, específicamente proteinasa, lipasa y alfa glucosidasa en medios mínimos que estaban deficientes en nutrientes. (Bramono K., Yamazaki M., Tsuboi R. y Ogawa H. Comparison of Proteinase, Lipase and Alpha-Glucosidase Activities from the Clinical Isolates of *Candida* Species. Jpn. J. Infect. Dis., v. 59, 73-76, 2006). Los autores encontraron actividad proteinasa extracelular significativa en *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis*. Sin embargo, esta actividad estaba asociada a la hidrólisis de proteínas del suero bovino (albúmina) como fuente de nutrientes para el crecimiento y no jugó un papel como herramienta de identificación o diferenciación, ya que otras especies también presentaron dicha actividad, aunque en menor grado. La adición de albumina como marcador de la actividad proteolítica le resta estabilidad al medio. La actividad lipolítica fue inducida con Tween 80, siendo esta sustancia la única fuente de carbono empleada, y dicha actividad fue significativamente mayor en *Candida tropicalis*, *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*.
- La actividad alfa-glucosidasa se estudió incorporando, en un medio mínimo 0,6 % de maltosa y se empleó p-nitrofenil alfa-D-glucopiranosido, leyendo la densidad óptica en espectrofotómetro. Los resultados demostraron que *Candida tropicalis*, *Candida albicans* y *Candida parapsilosis* poseían la mayor actividad enzimática en un medio líquido mínimo. La reacción no es apreciable a simple vista, y se precisa de equipamiento para la lectura e interpretación de los resultados.
- El objetivo del trabajo mencionado fue ejecutar estudios básicos de la actividad enzimática de *Candida* en condiciones de bajos nutrientes y no con fines de identificación o diferenciación de especies.
- Asmaa Al Mosaid y colaboradores (Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Staib Agar and Caffeic Citrate Agar, J. Clin. Microb., v. 39(1), 323-327, 2001), describen la identificación de *Candida dubliniensis* patogénica en dos medios de cultivo. En uno de ellos se emplea un extracto acuoso de semilla de *Guizotia abyssinica* con la adición de glucosa y creatinina. Otro emplea extracto de levadura, glucosa, sulfato de amonio, citrato férrico y ácido caféico. Ninguno de los medios mencionados es capaz de garantizar el crecimiento de *Candida* de manera temprana debido, fundamentalmente, a que no poseen el contenido de vitaminas, sustancias nitrogenadas y carbohidratos suficientes para promover el crecimiento rápido y abundante de todas las especies de *Candida*.
- Ese mismo autor en su artículo "Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's Agar" (J. Clin. Microb., v. 41(10): 4787-4789, 2003), comparó el empleo del Pal agar utilizando extracto de semillas de girasol desalinizado con el Staib agar. En ambos casos la identificación y diferenciación de *Candida* se logró después de 48-72 horas de incubación. De este trabajo se puede arribar a las mismas conclusiones anteriormente citadas, con respecto a las deficiencias de los medios comparados.
- Venitia M. C. y colaboradores (New Chromogenic Agar Medium for the Identification of *Candida* spp, J. of Virology, v.68(7): 3622-3627, 2002), describen un nuevo medio de cultivo para la identificación de especies de *Candida* basado en el uso del Agar Dextrosa de Sabouraud con la adición de un sustrato cromogénico para la detección de la actividad glucosaminidasa de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*. Este medio fue comparado con el medio Agar candida ID (BioMérieux) y CHROMagar candida (CHROMOagar Company Ltd.) El resultado de la comparación arrojó que Agar candida ID no fue capaz de diferenciar cepas de *Candida tropicalis* de *Candida kefir*. Tampoco diferenció *Candida guilliermondii* de las mencionadas especies. Chromogenic Agar Medium sólo fue capaz de identificar *Candida albicans*.
- El nuevo medio es deficiente en vitaminas y micro elementos necesarios para el crecimiento abundante de todas las especies de *Candida*. La glucosa es la única fuente de carbohidrato y de energía en el medio, la peptona micológica, por sí sola, no garantiza los demás nutrientes necesarios para la mayoría de las especies a cultivar. Tampoco los medios CLED, Agar nutriente, Agar LAB Lemco, Agar para conteo en placas estándar y Agar extracto de levadura, arrojaron resultados satisfactorios por las razones antes mencionadas.
- Una desventaja importante a señalar en todos los medios estudiados en el mencionado trabajo, incluyendo el nuevo medio, consiste en su poca estabilidad de los mismos en su forma de listos para el

uso en placas de Petri que, según se señala, llegaron a un máximo de solo 6 semanas, debido, fundamentalmente, a la naturaleza lábil de algunos sustratos y reactivos empleados, especialmente se destaca el caso del Candida ID agar que debe ser incubado en ausencia de luz según las instrucciones del fabricante. Finalmente se puede señalar que ni el CDA agar, ni Candida ID agar, ni CHROMOagar candida fueron capaces de diferenciar eficientemente las cepas y/o especies de *Candida* entre sí, particularmente la especie *Candida albicans* varía el color de verde a azul púrpura y azul turquesa, confundiendo con *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Candida parapsilosis*, *Candida pelliculosas*, *Candida rugosa* y *Candida tropicalis*. En el medio Candida ID agar hay especies de *Candida* que se confunden según su coloración con otras especies de levaduras.

Los intentos de incorporar el nuevo sustrato cromogénico al Agar harina de maíz, Agar papa y dextrosa, Agar extracto de arroz, no beneficiaron la identificación y diferenciación de las diferentes especies de *Candida*. Esta conclusión de los autores confirma que ninguna de las fuentes de origen vegetal empleadas tradicionalmente en estos medios fue capaz de proporcionar los metabolitos promotores que intervienen en los diferentes ciclos metabólicos de las especies de *Candida* estudiadas, ni las reacciones cromogénicas o fluorogénicas que se han empleado conjuntamente con dichos nutrientes han posibilitado el aislamiento, diferenciación e identificación de todas las especies de *Candida* de interés clínico o ambiental.

#### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El objetivo de la presente invención consiste en proveer una composición de un medio de cultivo para el aislamiento selectivo, la diferenciación y la identificación simultánea de especies fúngicas, en especial, del género *Candida*.

La novedad de la presente invención consiste en la inclusión en la composición del medio nutritivo, de una mezcla de extracto de boniato y extracto de levadura o extracto de tomate, en cantidad de 20 a 30 g/L. Dicha mezcla se compone de 50 a 67 % de extracto de boniato y de 33 a 50 % de extracto de levadura o de 33 a 50 % de extracto de tomate.

No existen reportes anteriores del uso del extracto de boniato para el cultivo de especies de *Candida*, que, sorprendentemente, se vio favorecido por la inclusión de esta base nutritiva en el medio de cultivo.

Otro aspecto novedoso de la invención consiste en combinar la mezcla que contiene extracto de boniato y extracto de levadura o de tomate con otras fuentes de nitrógeno, preferiblemente la glicina de 0 a 3 g/L, peptona bacteriológica de 0 a 5 g/L, hidrolizado enzimático de caseína de 0 a 5 g/L, encontrándose dichas fuentes en total de 0 a 13 g/L en la composición del medio nutritivo, obteniendo de esta manera una nueva combinación de fuentes de nitrógeno anteriormente no reflejadas en la literatura científica.

La combinación de los nutrientes antes señalados con inhibidores de los microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos, que se encuentran en el medio nutritivo resulta diferente a todos los reportes encontrados en el estado del arte para el cultivo de especies de *Candida*. Dichos inhibidores se encuentran en el prototipo objeto de la presente invención en cantidad de 0 a 10 g/L y son preferiblemente seleccionados entre el ácido nalidíxico en cantidades de 0 a 0,05 g/L, la rosa bengala de 0 a 0,05 g/L, desoxicolato de sodio de 0 a 0,5 g/L, sulfito de sodio de 0 a 3 g/L, el citrato de amonio y bismuto de 0 a 5 g/L, el cloruro de tetrafeniltetrazolio de 0 a 0,05 g/L.

Esta combinación resulta novedosa, además porque nunca antes se habían combinado sustancias promotoras del crecimiento microbiano a partir del boniato con los inhibidores mencionados, ni se había logrado la inhibición sin el empleo de sustancias lábiles y sin afectar el crecimiento de *Candida*.

En esta composición, por vez primera en un medio de cultivo, se adiciona ácido nalidíxico en cantidades de 0 a 0,05 g/L para inhibir el crecimiento de bacterias Gram- negativas en presencia de *Candida*, pues hasta el momento se había demostrado su efecto inhibitorio de este antibiótico sobre esta especie fúngica. Esto fue posible, gracias a su combinación con una sal de magnesio (sulfato de magnesio), que de manera inesperada suprimió el efecto inhibidor sobre *Candida*.

Otro aspecto original de la presente invención consiste en la combinación de sustancias que propician la identificación de las diferentes especies de *Candida* basadas en el cambio de color y/o fluorescencia, aparición de halos y morfología de las colonias, y en el cambio de las características del medio, con los nutrientes que aporta el extracto de boniato.

Estas sustancias a combinar con la mezcla de extracto de boniato y levadura son seleccionadas entre los sustratos cromogénicos y fluorogénicos para detectar las actividades enzimáticas.

Se combinan, por primera vez, un grupo de sustratos cromogénicos y/o fluorogénicos y marcadores de actividad proteolítica para la detección simultánea de las actividades enzimáticas presentes en las especies del género *Candida* conjuntamente con la fase de aislamiento selectivo de las muestras de

origen clínico o ambiental, en presencia de activadores de dichas reacciones, que con anterioridad no habían sido reportados para dichos propósitos, tales como la trehalosa o la maltosa en cantidades de 0 a 10 g/L.

5 Por primera vez se prevé emplear la detección de la actividad  $\alpha$ -glucosidasa en una composición de un medio de cultivo agarizado para diferenciar o identificar especies de *Candida* por reacciones cromogénicas o fluorogénicas, en especial de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis*.

10 Para este propósito se incorpora el Metil-umbeliferil-alfa-D-glucopiranosido en cantidades de hasta 0,1 g/L. De manera similar, en el estado del arte no se ha descrito la inclusión en medios de cultivo para levaduras y en especial del género *Candida*, de sustratos cromogénicos y/o fluorogénicos en la composición de medios de cultivo cromogénicos o fluorogénicos para identificar la actividad fosfolipasa presente en especies tales como *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis*, en este caso, la sal de amonio del 5-Bromo-4-Cloro-3-Indoxil-Mio-Inositol-Fosfato, en cantidades de hasta 0,1 g/L.

15 Resultó inesperado el efecto de combinar un conjunto de sustratos para lograr, por primera vez, diferenciar todas las especies de *Candida* de interés clínico, específicamente, *Candida albicans* se identifica por sus actividades fosfolipasa (sal de amonio del 5-Bromo-4-Cloro-3-Indoxil-Mio-Inositol-Fosfato), alfa-glucosidasa (Metil-umbeliferil-alfa-D-glucopiranosido), de las hexosaminidasas (Metil-umbeliferil-N-acetil-beta-D-galactopiranosido y 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-N-acetil-beta-D-glucosaminida) y L-prolina aminopeptidasa (L-prolina-7-amido-4-metil-coumarina hidrobromuro y L-prolina-paranitroalánina); *Candida tropicalis*, se identifica por sus actividades fosfolipasa (sal de amonio del 5-Bromo-4-Cloro-3-Indoxil-Mio-Inositol-Fosfato) y alfa- y beta- glucosidasas (Metil-umbeliferil-alfa-D-glucopiranosido, 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-beta-D-glucopiranosido y 6-Cloro-3-indoxil-beta-D-glucopiranosido); *Candida kefyr*, se identifica por su actividad beta-glucosidasa (5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-beta-D-glucopiranosido y 6-Cloro-3-indoxil-beta-D-glucopiranosido), además de su actividad proteolítica; *Candida parapsilosis* se identifica por sus actividades fosfolipasa (sal de amonio del 5-Bromo-4-Cloro-3-Indoxil-Mio-Inositol-Fosfato), alfa-glucosidasa (Metil-umbeliferil-alfa-D-glucopiranosido) y L-prolina aminopeptidasa (L-prolina-7-amido-4-metil-coumarina hidrobromuro y L-prolina-paranitroalánina) y *Candida glabrata* por su color blanco (opaco y brillante, respectivamente) debido a la ausencia, en estas dos últimas especies, de las mencionadas actividades enzimáticas.

25 Otro elemento novedoso consiste en la inclusión de un marcador de actividad proteolítica presente sólo en *Candida kefyr*, en este caso, de manera sorprendente, la caseína de la leche descremada en polvo en cantidades de hasta 10 g/L fue hidrolizada por este microorganismo a diferencia del resto de las demás especies.

30 La inclusión de maltosa o trehalosa en la composición, con presencia de otras fuentes de carbono, sorpresivamente repercutió en un marcado aumento de la intensidad de la reacción cromogénica (color) de las colonias. Este efecto es contradictorio con la práctica general del mercado, que prevé el empleo de sustratos cromogénicos y fluorogénicos, en medios que, por lo general, no emplean azúcares u otras fuentes de carbono de naturaleza similar a la de los sustratos, para evitar la caída drástica del pH y, en consecuencia, la disminución de la intensidad de la reacción cromogénica, o para evitar la ocurrencia de la disminución de la intensidad del color de las colonias por otros mecanismos de competencia, mediante los cuales, los microorganismos consumen el azúcar más disponible y metabolizan en menor grado el sustrato cromogénico.

35 Resulta igualmente original la combinación del grupo de sustancias cromogénicas y/o fluorogénicas con otros indicadores o colorantes, fuentes de carbono y sales orgánicas e inorgánicas que se encuentran en el medio nutritivo en cantidad de 0 a 26 g/L, como son el glicerol de 0 a 25 mL/L, púrpura de bromocresol de 0 a 0,04 g/L, azul de bromotimol de 0 a 0,08 g/L y sulfato de magnesio de 0 a 0,5 g/L.

40 La combinación de las sustancias reguladoras de pH, en cantidades de 0 a 5 g/L, dentro de las cuales algunas actúan como activadores enzimáticos tales como los fosfatos, preferiblemente el fosfato monopotásico (de 0 a 1 g/L) y el dipotásico (de 0 a 4 g/L), en un ambiente de pH regulado con el empleo de buferantes preferiblemente el 3-Morpholino-propansulfonsaure (MOPS) (de 0 a 0,5 g/L), resulta singular al verse combinada su acción con los micro y macro elementos presentes en el extracto de boniato que sorprendentemente actúan como buferantes y mantienen los valores del pH en un rango apropiado para todas las especies de *Candida*.

45 De esta manera, sorprendentemente, se observó una mayor promoción del crecimiento de todas las especies de *Candida* con la composición descrita en la presente invención (como promedio 113 %), con respecto a los medios tradicionales formulados incluso sin inhibidores, tales como el Agar Dextrosa de Sabouraud, medio por excelencia para promover el crecimiento de los hongos.

50 Este hallazgo no resultó evidente a partir del estudio del estado del arte, que plantea que los inhibidores de bacterias en general inhiben, en cierto grado, el crecimiento microbiano de las especies de interés. Es así que, por lo general, cuando se calculan los índices de recuperación de los medios selectivos contra los

medios especiales sin inhibidores, los recuentos y morfologías coloniales son inferiores en dichos medios selectivos.

5 El medio nutritivo posee, además, de 13 a 15 g/L de agar para garantizar el desarrollo de las características morfológicas propias de las colonias de las diferentes especies de *Candida*, así como la observación de reacciones cromogénicas o bioquímicas en el medio, como la formación de halos transparentes.

El original medio nutritivo se compone, además, de agua destilada o desionizada, en la cual se disuelven los demás componentes sólidos o líquidos en cantidades de 35 a 50 g/L, ajustando su pH de 6,0 a 6,8.

10 Con ayuda de este medio nutritivo, por primera vez se puede aislar selectivamente, identificar y diferenciar de manera simultánea las especies de *Candida* de interés clínico y ambiental en un período tan temprano como 24-48 horas.

Es de destacar que el medio nutritivo con la adición de los sustratos indicadores posibilita una nueva combinación de criterios morfológicos y bioquímicos de las especies de *Candida* a identificar.

15 Con esta composición para el aislamiento y diferenciación de especies fúngicas, se logra como principal novedad y ventaja, aislar e identificar simultáneamente el mayor número de especies de *Candida*, reportadas en el estado del arte, específicamente, se logra por primera vez diferenciar el 94 % de las especies de *Candida* con incidencia en la clínica, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr* y *Candida parapsilosis*, además de *Candida krusei*.

Las ventajas que ofrece el nuevo medio nutritivo consisten en:

20 - El medio nutritivo garantiza el crecimiento abundante de las diferentes especies de *Candida* de interés clínico o ambiental, al poseer una amplia gama de nutrientes aportados por el extracto de boniato y en su combinación con el extracto de levaduras o de tomate. Este crecimiento abundante se observa incluso a las 24 horas de incubación, sin la necesidad de esperar a más de 48 ó 76 horas para que las colonias muestren características morfológicas peculiares.

25 - La combinación del extracto de boniato con el extracto de levadura o de tomate, garantiza niveles de macro- y micro- elementos, vitaminas, especialmente C y del complejo B, así como otras sustancias extractivas solubles en agua, que potencian las rutas metabólicas de las diferentes especies de *Candida* y su actividad enzimática específica, lo que a su vez redundo en la aparición de reacciones cromogénicas, fluorogénicas y de escisión de sustratos convencionales en un máximo de 24-36 horas. Esta potenciación permite incluir, en la formulación del medio final, varios marcadores bioquímicos para la identificación simultánea, en un solo paso, de diferentes especies de *Candida*.

30 - Una ventaja marcada de la presente invención radica en que se logra una recuperación de las especies de *Candida* de interés superior al 110 % como promedio, con respecto a medios sin inhibidores y diseñados específicamente para el cultivo de hongos.

35 - El medio nutritivo es sencillo en su preparación, no necesita de aditamentos complicados, la técnica de inoculación es la comúnmente empleada.

40 - La identificación de las diferentes cepas y especies de *Candida* se realiza visualmente, por la diversidad de colores de las colonias, y del medio, la formación de halo transparente alrededor de la colonia y finalmente por los aspectos fundamentales de la morfología colonial (bordes y superficie) y no necesita de personal especialmente entrenado, ni calificado para la preparación del medio o la interpretación de los resultados.

45 - El aporte de nutrientes de la mezcla de extracto de boniato y levadura o de tomate permite contar con un medio nutritivo capaz de aislar, recuperar, diferenciar e identificar las colonias de *Candida* en un solo paso, si necesidad de contar con un método o medio de aislamiento previo de las colonias.

50 - La sensibilidad y exactitud analíticas del medio resultan elevadas, gracias a que la identificación no depende de un conjunto de indicadores o marcadores bioquímicos, sino de reacciones enzimáticas propias de las diferentes especies, y de características morfológicas bien establecidas, sin ambigüedades o diversidades entre las diferentes cepas de una misma especie.

- Con los componentes cromogénicos de la nueva composición y su combinación con la leche descremada se logran nuevas formas de diferenciación o identificación de las especies de *Candida* de interés con más de un marcador enzimático, lo que incrementa notablemente la sensibilidad y exactitud diagnóstica con respecto a las soluciones anteriores.

- La combinación de los extractos provenientes del boniato y de la levadura o del tomate, permiten afirmar que el nuevo medio, posee un significativo contenido de vitaminas, especialmente A, B1, B5, B6, B12 y C, aportados por los extractos, metabolitos todos, que favorecen el crecimiento exuberante de las diferentes especies de *Candida*.
- 5 - El aporte de extractos de boniato y levadura o tomate garantiza, además, un contenido de diferentes carbohidratos que pueden suplir todos los requerimientos de las diferentes especies, por lo que no es necesario incluir otros carbohidratos para suplir las necesidades esenciales de las especies a cultivar. Este hecho, además, posibilita la identificación y diferenciación de las especies por la capacidad de escindir sustratos constituidos por carbohidratos o que contienen grupos que mimetizan a dichos carbohidratos.
- 10 - El medio nutritivo es favorecido por el contenido de hierro, calcio, fósforo, magnesio, potasio, entre otros micro elementos, aportados por las fuentes de donde se obtiene la mezcla de los extractos, en especial, por el de boniato y, por tanto, no existe la necesidad de incorporar otras sales para suplementar, desde el punto de vista nutricional, las especies de *Candida* a aislar o identificar. Tampoco es necesario un aporte adicional sustancial, para activar las reacciones enzimáticas que permitan la diferenciación de especies de *Candida* por pruebas bioquímicas y/o cromogénicas y fluorogénicas. La adición de este tipo de sustancias en el nuevo medio nutritivo, sólo es necesaria en aquellos casos, que se requiera una complementación adicional para obtener respuestas muy rápidas a partir de inóculos pobres, o concentraciones muy reducidas de las levaduras en las muestras.
- 15 - La reacción cromogénica y/o fluorogénica de identificación de las diferentes especies es marcadamente superior en intensidad a las características de otros medios de cultivo descritos en el estado del arte, gracias al efecto potenciador alcanzado al adicionar trehalosa o maltosa en las cantidades anteriormente señaladas a la composición.
- 20 - La combinación de la mezcla de extracto de boniato con levadura o tomate en su combinación con otras fuentes de nitrógeno, tales como glicina, hidrolizado enzimático de caseína, peptona bacteriológica, en las cantidades previstas, posibilita garantizar diferentes formas de nitrógeno (amínico, aminoácido, peptídico, polipeptídico y proteínico) capaces de suplir los diferentes requerimientos de las distintas especies de los microorganismos a cultivar en etapas tempranas de desarrollo celular y, por tanto, se desarrollan las colonias más tempranamente. Por otra parte, ese suministro adicional permite mantener en las placas de Petri a las colonias por períodos aún más prolongados de tiempo.
- 25 - El medio nutritivo no contiene sustancias que, por su naturaleza, entorpecen las reacciones bioquímicas, cromogénicas, ni fluorogénicas, como en el caso de la cicloheximida, cloranfenicol, gentamicina o rodamina, ya bien porque interfieran con la ruta metabólica de la acción enzima-sustrato específica, como que coloreen la colonia e impidan la detección de la formación de color o fluorescencia.
- 30 - En la composición del medio no se emplean sustancias antibacterianas termolábiles para inhibir el crecimiento de microorganismos Gram-negativos o Gram-positivos o de otros tipos de levaduras u mohos, sino combinaciones de sustancias más estables, tales como ácido nalidíxico, desoxicolato de sodio, sulfito de sodio, citrato de amonio, rosa bengala, lo que finalmente redundará en una mayor estabilidad del medio nutritivo preparado y listo para el uso en placas de Petri.
- 35 - Por otra parte, la no necesidad de incluir estos inhibidores, repercute en la mejor recuperación de las mismas especies de *Candida* que ven afectado su desarrollo por sustancias tales como el telurito que, a concentraciones moderadas, inhibe y retarda su crecimiento.
- 40 - La adición de ácido nalidíxico propicia una inhibición más efectiva de las bacterias Gram-negativas en comparación con soluciones anteriores, la composición se torna más estable al calor y en el tiempo.
- 45 - El empleo del ácido nalidíxico como inhibidor, permitió, por primera vez en una composición para la identificación de especies de *Candida*, la incorporación de los marcadores enzimáticos cromogénicos o fluorogénicos para detectar actividad fosfolipasa o alfa-glucosidasa, ya que los demás agentes inhibidores empleados comúnmente, le proporcionan diferentes reacciones cromáticas a las colonias de las especies de *Candida*.
- 50 - Se logra aislar, de manera selectiva, las especies de *Candida* directamente de las muestras clínicas o ambientales gracias a la inhibición de la flora bacteriana acompañante, que puede encontrarse incluso a altas concentraciones ( $3-5 \times 10^8$  UFC/mL), mientras que las especies de *Candida* muestran, como promedio, 113 % de recuperación con respecto a un medio general sin inhibidores (Agar Dextrosa de Sabouraud). Este efecto se logra gracias a la nueva
- 55

combinación de los inhibidores de microorganismos Gram-negativos y Gram-positivos con los nutrientes y las sales de magnesio.

- La presente invención no prevé tampoco el empleo de sustancias sensibles a la luz, en tal extremo que la incubación del medio deba realizarse en ausencia de luz.
- 5 - La combinación de extracto de boniato y de levadura o tomate con las diferentes sales incluidas en la formulación ( $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$ ), en las concentraciones indicadas, garantiza una capacidad buferante adecuada en un amplio rango de valores de pH (6,0-6,8), adecuados para las diferentes especies de microorganismos a detectar e impide, a su vez, la inhibición del crecimiento por acumulación de metabolitos que aumenten la acidez en el medio.
- 10 - La mezcla de extracto de boniato y de levadura permite que las reacciones de identificación, tanto bioquímicas, como cromogénicas y fluorogénicas transcurran de manera natural, activadas por los micro-, macro- elementos y vitaminas, sin la necesidad de emplear sustancias que aumenten la permeabilidad de las células a altas concentraciones, tales como las sales biliares, que provocan inhibición de algunas especies de *Candida*.
- 15 - La incorporación de maltosa o trehalosa no sólo potencia la reacción cromogénica de las colonias, sino que permite un crecimiento más intenso y colonias de mayor tamaño que el logrado con los medios de cultivo existentes en el estado del arte.
- 20 - La presencia de agar en cantidad de 13 a 15 g/L, en la combinación de la suma de los demás componentes sólidos y el agua adicionada para preparar el medio nutritivo, garantiza un soporte sólido para que las colonias de *Candida* desarrollen sus colores y características morfológicas diferenciales en una combinación tal, que todas las especies estudiadas puedan ser aisladas o recuperadas y simultáneamente identificadas y/o diferenciadas unas de otras, sin el empleo de técnicas complejas de inoculación o personal especialmente entrenado.
- 25 - La concentración de agar y de los demás componentes sólidos y líquidos, y del agua, permite detectar reacciones cromogénicas y fluorogénicas, así como bioquímicas y además especificidades coloniales o morfológicas, o liberación de metabolitos o aparición de halos en la superficie y/o profundidad del medio, por lo que cualquier reacción puede ser visualizada no sólo por la parte superior de la placa, sino por su fondo.
- 30 - Las concentraciones de medio nutritivo en agua varían de 35 a 50 g/L, encontrándose siempre la concentración de extracto de boniato en el medio nutritivo final en el rango de 10 a 20 g/L.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La descripción detallada de la invención consiste en preparar una mezcla de extracto de boniato en polvo con extracto de levadura, encontrándose el extracto de boniato en cantidad de 50 a 67 % con respecto a la masa de la mezcla. De manera similar, el extracto de boniato se puede mezclar con extracto de tomate, encontrándose el extracto de boniato en cantidad de 50 a 67 % con respecto a la masa de la mezcla. La mezcla de extracto de boniato con el extracto de levadura o con el extracto de tomate, se adiciona al medio nutritivo en cantidad de 20 a 30 g/L.

La mezcla puede también ser elaborada a partir de los extractos en forma líquida, en ese caso, el cálculo para la mezcla se realiza a partir del contenido de sólidos totales en los dos tipos de extractos a mezclar. De prepararse a partir de algún ingrediente líquido, la cantidad de mezcla de extractos líquidos se calcula también a partir del contenido de sólidos totales de la mezcla y el resto de su masa, se resta del volumen de agua a emplear para preparar el medio nutritivo.

Se añade la mezcla a 1 L de agua destilada o desionizada con un pH de 5 a 7 (se resta el contenido de humedad como se señaló anteriormente al mezclar uno o ambos extractos en forma líquida).

Se adicionan las demás sustancias que aportan nitrógeno, en cantidades de 0 a 13 g/L, específicamente son seleccionadas entre la glicina a concentración de 0 a 3 g/L, peptona bacteriológica de 0 a 5 g/L e hidrolizado enzimático de caseína de 0 a 5 g/L.

Se incorporan los inhibidores en cantidad de 0 a 10 g/L y que son preferiblemente seleccionados entre el ácido nalidixico en cantidad de 0 a 0,05 g/L, la rosa bengala, que se adiciona en cantidad de 0 a 0,05 g/L, el desoxicolato de sodio de 0 a 0,5 g/L, sulfito de sodio de 0 a 3 g/L, el citrato de amonio y bismuto de 0 a 5 g/L y el cloruro de tetrafeniltetrazolio de 0 a 0,05 g/L.

Se adicionan, además, las sustancias que propician la identificación de las diferentes especies de *Candida* seleccionadas entre los sustratos cromogénicos y fluorogénicos, indicadores o colorantes que se encuentran en el medio nutritivo en cantidad de 0 a 26 g/L, preferiblemente la sal de amonio del 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-mio-inositol-fosfato en cantidad de 0 a 0,1 g/L, Metil-umbeliferil- $\alpha$ -D-glucopiranosido de 0 a 0,1 g/L, el 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-glucosaminidina de 0 a 0,1 g/L, el 5-Bromo-4-cloro-3-indolyl-N-

acetil- $\beta$ -D-glucopiranosido de 0 a 0,1 g/L, el 4-Metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminida de 0 a 0,15 g/L, el 6-Cloro-3-Indoxil- $\beta$ -D-glucopiranosido de 0 a 0,1 g/L, glicerol de 0 a 25 mL/L, púrpura de bromocresol de 0 a 0,04 g/L, azul de bromotimol de 0 a 0,08 g/L, L-prolina-7-amido-4-metil-coumarina-hidrobromuro de 0 a 0,1 g/L, L-prolina paranitroanilida de 0 a 0,2 g/L.

- 5 Los compuestos activadores y potenciadores de las reacciones cromogénicas y fluorogénicas son añadidos, entre ellos el glicerol de 0 a 25 mL/L, la maltosa de 0 a 10 g/L, la trehalosa de 0 a 10 g/L y el sulfato de magnesio de 0 a 0,5 g/L.

Se incorpora la leche descremada en polvo en concentración de 0 a 10 g/L.

- 10 Se adicionan, además, otras sustancias reguladoras del pH en cantidades de 0 a 5 g/L, preferiblemente el fosfato monopotásico en cantidad de 0 a 1 g/L y el dipotásico de 0 a 4 g/L y el 3-Morpholino-propansulfonsaure (MOPS) de 0 a 0,5 g/L.

El agar se añade en cantidad de 13 a 15 g/L y se ajusta el pH del medio nutritivo de 6,0 a 6,8. El medio preparado se funde por cualquiera de los métodos conocidos.

- 15 A continuación, se relacionan algunos ejemplos de realización del nuevo medio nutritivo según la presente invención.

#### Ejemplo 1

Ensayo para evaluar la capacidad nutritiva de la mezcla de extracto de boniato con extracto de levadura o tomate dentro de la formulación del medio de cultivo y el uso de algunos sustratos cromogénicos y/o fluorogénicos.

- 20 Se ensayaron dos formulaciones del medio nutritivo (Medio 1 y Medio 2), en comparación con un medio de cultivo cuya fuente de nutrientes es el extracto de malta (RI).

Tabla 1. Composición de los medios

| Componente                                                     | g/L   | 1 | 2 | RI |
|----------------------------------------------------------------|-------|---|---|----|
| Extracto de boniato                                            | 10,0  | X | X |    |
| Extracto de tomate                                             | 10, 0 | X |   |    |
| Extracto de levadura                                           | 10,0  |   | X |    |
| Extracto de malta (referencia)                                 | 20,0  |   |   | X  |
| Fosfato monopotásico                                           | 1,0   | X | X | X  |
| Sulfato de magnesio                                            | 0,5   | X | X | X  |
| 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-N-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosido | 0,04  | X | X | X  |
| 4-Metilumberiferil-N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminida        | 0,04  | X | X | X  |
| Agar                                                           | 15,0  | X | X | X  |

- 25 El pH del medio se ajustó a 6,5 y después de esterilizar se estabilizó en 6,0 en la variante 1 y en la variante 2 se estabilizó en 6,4 y en el medio de comparación RI, se mantuvo en 6,3.

El Medio 2 se corresponde con la formulación del Medio 1 pero en lugar del extracto de tomate se utilizó extracto de levadura en la misma concentración de 10 g/L.

El medio de comparación (RI), formulado con extracto de malta (Merck), a concentración de 20 g/L.

- 30 Los microorganismos ensayados (cepas aisladas, provenientes de la facultad de Biología de la Universidad de La Habana) fueron: *Candida albicans* (2 cepas), *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida kefyr* y *Candida krusei*.

Las placas fueron incubadas a 30 °C por 24 y 48 horas. Las colonias fueron examinadas visualmente y se interpretaron de la siguiente forma:

- 35 - Colonias azules corresponden a aquellas especies que poseen la enzima  $\beta$ -D-glucosidasa presentes en *Candida tropicalis* y *Candida kefyr*.

- Colonias con fluorescencia azul corresponden a aquellas especies que poseen la enzima N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminidasa presente en *Candida albicans* y cepas de *Candida tropicalis*.
- Colonias blancas correspondientes a aquellas cepas que no poseen las enzimas  $\beta$ -D-glucosidasa y N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminidasa. Se identifican las especies de acuerdo a las características morfológicas tales como: *Candida krusei*, *Candida glabrata* y *Candida parapsilosis*.

Los resultados del ensayo se presentan en la tabla 2. Las especies de *Candida* pueden ser identificadas de acuerdo a las características culturales de las colonias.

A solamente las 24 horas de incubación, sorprendentemente, se observó crecimiento característico de *Candida albicans* y de *Candida tropicalis*, sobre todo las características coloniales en los medios.

Las colonias eran de tamaño característico, bien desarrolladas, favorecidas por los nutrientes que aporta el extracto de boniato en conjunto con el extracto de levadura o con el de tomate.

A las 48 horas se mantuvo el crecimiento exuberante de las colonias y conservaron su morfología.

Se observó que los medios 1 y 2, formulados con la mezcla de extracto de boniato y extracto levadura, posibilitaron la diferenciación de las especies de *Candida* por la combinación de colores y fluorescencia, mientras que al emplear extracto de malta (RI) como referencia sólo se logró desarrollar color azul en *Candida kefir*.

Con la combinación de extracto de boniato y tomate, la concentración del sustrato cromogénico no fue suficiente y se decidió aumentar la concentración en los subsiguientes experimentos.

Se demostró igualmente que la presencia de carbohidratos en el extracto de boniato y su mezcla con el extracto de levadura, no sólo benefician el crecimiento intenso de las especies estudiadas, sino que no interfieren e, incluso, favorecen la aparición de reacciones cromogénicas y/o fluorogénicas a partir de los sustratos incorporados, confirmando la plena compatibilidad de los extractos mencionados con los sustratos.

No así ocurrió con el extracto de malta, que inhibió la aparición de reacciones fluorogénicas para *Candida tropicalis* a las 48 horas y la cromogénica para la mayoría de ellas a excepción de *Candida kefir*.

Por último, se apreció que la concentración de agar resultó adecuada y permitió observar características coloniales muy bien definidas, el medio nutritivo no sufrió ralladuras, o rupturas en su superficie, se observaron muy bien las reacciones de coloración de las colonias en la superficie y en toda la profundidad del medio. La reacción fluorogénica se observó en el medio, además, de manera muy evidente.

Tabla 2. Identificación de las especies de *Candida* ensayadas en los medios analizados

| Microorganismo       | Medio | Coloración de la colonia |        | Fluorescencia | Morfología                             |
|----------------------|-------|--------------------------|--------|---------------|----------------------------------------|
|                      |       | Azul                     | Blanca |               |                                        |
| <i>C. albicans</i>   | 1     |                          | X      | X             | -                                      |
|                      | 2     |                          | X      | X             | -                                      |
|                      | RI    |                          | X      | X             | -                                      |
| <i>C. tropicalis</i> | 1     | X (pálido)               |        | X             | -                                      |
|                      | 2     |                          | X      | X             | -                                      |
|                      | RI    |                          | X      | -             | -                                      |
| <i>C. glabrata</i>   | 1     |                          | X      | -             | abultadas, brillosas, bordes regulares |
|                      | 2     |                          | X      | -             |                                        |
|                      | RI    |                          | X      | -             |                                        |
| <i>C. kefir</i>      | 1     | X (intenso)              |        | -             | -                                      |
|                      | 2     | X (intenso)              |        | -             | -                                      |
|                      | RI    | X (intenso)              |        | -             | -                                      |

|                        |    |  |   |   |                                        |
|------------------------|----|--|---|---|----------------------------------------|
| <i>C. krusei</i>       | 1  |  | X | - | aplastadas, opacas, bordes irregulares |
|                        | 2  |  | X | - |                                        |
|                        | RI |  | X | - |                                        |
| <i>C. parapsilosis</i> | 1  |  | X | - | superficie rugosa, bordes regulares    |
|                        | 2  |  | X | - |                                        |
|                        | RI |  | X | - |                                        |

## Ejemplo 2

5 Se procedió a combinar la mezcla de extracto de boniato y de levadura con sustratos cromogénicos y fluorogénicos (5-Bromo-4-cloro-3-indolyl-N-acetil- $\beta$ -D-glucopyranosido, 4-Metylumbeliferyl-N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminida, en mayores concentraciones, se adicionó la L-prolina paranitroanilida) y se empleó el desoxicolato de sodio como agente bacteriostático (tabla 3).

Se sembraron las cepas por estría hasta el agotamiento del inóculo. Se incubaron los medios a 30 °C, por un período de 36 horas.

10 Se pudo observar que en ambos medios se logró crecimiento exuberante, incluso a las 36 horas, y las características cromogénicas y/o fluorogénicas, así como las morfológicas permitieron diferenciar las especies de *Candida* (tabla 4).

Tabla 3. Composición de los Medios Nutritivos 3 y 4

| Componente                                                     | g/L   | 3 | 4 |
|----------------------------------------------------------------|-------|---|---|
| Extracto de boniato                                            | 10,0  | X | X |
| Extracto de levadura                                           | 10, 0 | X | X |
| Fosfato monopotásico                                           | 1,0   | X | X |
| Sulfato de magnesio                                            | 0,5   | X | X |
| 5-Bromo-4-cloro-3-indolyl-N-acetil- $\beta$ -D-glucopyranosido | 0,1   | X |   |
| 4-Metylumbeliferyl-N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminida        | 0,15  | X |   |
| L-prolina paranitroanilida                                     | 0.05  |   | X |
| Agar                                                           | 15,0  | X | X |
| Glicina                                                        | 1,0   | X | X |
| Desoxicolato de sodio                                          | 0,5   | X | X |

15 Igualmente se pudo establecer que los extractos que componen el medio nutritivo son compatibles con los sustratos cromogénicos y/o fluorogénicos, que se pueden visualizar, tanto en el interior de la célula, como los que difunden al medio. Las reacciones de escisión de dichos sustratos, se ven favorecidas por la presencia de los extractos de boniato y levadura.

Tabla 4. Identificación de las especies de *Candida* ensayadas en los medios 3 y 4

| Microorga-nismo      | Medio | Coloración de la colonia |          |        | Fluores-cencia | Morfología |
|----------------------|-------|--------------------------|----------|--------|----------------|------------|
|                      |       | Azul                     | Amarillo | Blanca |                |            |
| <i>C. albicans</i>   | 3     |                          |          | X      | X              |            |
|                      | 4     |                          | X        |        |                |            |
| <i>C. tropicalis</i> | 3     | X (pálido)               |          |        |                |            |

|                        |   |             |   |   |  |                                                 |
|------------------------|---|-------------|---|---|--|-------------------------------------------------|
|                        | 4 |             |   | X |  |                                                 |
| <i>C. glabrata</i>     | 3 |             |   | X |  | abultadas,<br>brillosas,<br>bordes<br>regulares |
|                        | 4 |             |   | X |  |                                                 |
| <i>C. kefyr</i>        | 3 | X (intenso) |   |   |  |                                                 |
|                        | 4 |             |   | X |  |                                                 |
| <i>C. parapsilosis</i> | 3 |             |   | X |  | superficie<br>rugosa, bordes<br>regulares       |
|                        | 4 |             | X |   |  |                                                 |

## Ejemplo 3

El medio nutritivo (Medio 5) se preparó en el laboratorio a partir de los ingredientes (tabla 5), se distribuyó en las placas de Petri y se inoculó.

- 5 Se realizó la siembra por diluciones hasta obtener colonias aisladas en el rango entre 30 – 300 UFC/placa.

Se ejecutó la incubación a 30 °C durante 36 a 48 horas.

- 10 El medio nutritivo (tabla 6) fue capaz de promover el crecimiento de todas las especies ensayadas, y se demostró la compatibilidad del extracto de boniato y su mezcla con el de levadura con concentraciones mayores de sustratos cromogénicos y fluorogénicos.

De manera inesperada, se observó un crecimiento abundante a altas diluciones (baja concentración del inóculo), lo que demostró la alta sensibilidad analítica del medio nutritivo y el aporte de nutrientes necesarios para la recuperación de especies de *Candida*, fundamentalmente del extracto de boniato y de su combinación con el extracto de levadura.

- 15 Tabla 5. Formulación del medio nutritivo con concentraciones superiores de los sustratos cromogénicos y fluorogénicos

| Componente                                       | g/L   | Medio 5 |
|--------------------------------------------------|-------|---------|
| Extracto de boniato                              | 10,0  | X       |
| Extracto de levadura                             | 10, 0 | X       |
| Fosfato monopotásico                             | 1,0   | X       |
| Sulfato de magnesio                              | 0,5   | X       |
| 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-N-acetil-β-D-glucosido | 0,1   | X       |
| 4-Metylumbeliferil-N-acetil-β-D-galactosaminida  | 0,15  | X       |
| Agar                                             | 15,0  | X       |
| Desoxicolato de sodio                            | 0,5   | X       |

Tabla 6. Resultados del cultivo de especies de *Candida* en el medio nutritivo a la dilución  $10^{-4}$

| Microorganismo     | Medio | Color de la colonia |        | Fluores-<br>cencia | Morfología |
|--------------------|-------|---------------------|--------|--------------------|------------|
|                    |       | Azul                | Blanca |                    |            |
| <i>C. albicans</i> | 5     |                     | X      | X                  |            |

|                        |   |                           |   |  |                                        |
|------------------------|---|---------------------------|---|--|----------------------------------------|
| <i>C. tropicalis</i>   | 5 | X (pálido, centro oscuro) |   |  |                                        |
| <i>C. glabrata</i>     | 5 |                           | X |  | abultadas, brillosas, bordes regulares |
| <i>C. kefyr</i>        | 5 | X (intenso)               |   |  |                                        |
| <i>C. parapsilosis</i> | 5 |                           | X |  | superficie rugosa, bordes regulares    |
| <i>C. krusei</i>       | 5 |                           | X |  | aplastadas, opacas, bordes irregulares |

## Ejemplo 4

5 Para evaluar la compatibilidad del extracto de boniato en su mezcla con el de levadura y con las sustancias inhibidoras de los microorganismos Gram-positivos, se procedió a formular el medio nutritivo (6) con la adición de desoxicolato de sodio (tabla 7).

La formulación no se esterilizó en autoclave, se hirvió y se distribuyó en placas.

La siembra se realizó por diluciones seriadas a partir de un inóculo estandarizado.

Tabla 7

| Componentes           | g/L   |
|-----------------------|-------|
| Extracto de boniato   | 10,0  |
| Extracto de levadura  | 10, 0 |
| Fosfato monopotásico  | 1,0   |
| Sulfato de magnesio   | 0,5   |
| Agar                  | 15,0  |
| Desoxicolato de sodio | 0,5   |

10

Tabla 8. Crecimiento de las especies de *Candida* en el medio nutritivo formulado con desoxicolato de sodio

| Microorganismo         | Color  | Morfología                             |
|------------------------|--------|----------------------------------------|
| <i>C. albicans</i>     | blanco | lisas, abultadas, redondas             |
| <i>C. tropicalis</i>   | blanco | lisas, abultadas, redondas             |
| <i>C. glabrata</i>     | blanco | abultadas, brillosas, bordes regulares |
| <i>C. kefyr</i>        | blanco | semi aplastadas, redondas              |
| <i>C. parapsilosis</i> | blanco | superficie rugosa, bordes regulares    |
| <i>C. krusei</i>       | blanco | aplastada, opaca, bordes irregulares   |

- 5 La presencia del desoxicolato permitió el crecimiento de las levaduras analizadas (tabla 8), incluso a altas diluciones ( $10^{-4}$ ), sin inhibición alguna, lo que corrobora la capacidad promotora del crecimiento del extracto de boniato en su combinación con el de levadura, que, encontrándose en presencia de un agente permeabilizante de la pared celular, logra favorecer la formación de colonias características.

Por otra parte, el sulfato de magnesio resultó ser un adyuvante de la definición de las características morfológicas de las diferentes cepas de *Candida*, ya que se observó un color blanco más brillante e intenso en las colonias con los bordes bien definidos.

#### Ejemplo 5

- 10 Para corroborar el poder de promoción de crecimiento del medio de manera temprana y comprobar la compatibilidad del extracto de boniato con otros sustratos bioquímicos que pudieran ser empleados para la diferenciación de las distintas especies de *Candida*, se procedió a incluir el glicerol y el azul de bromotimol (Medios 7 y 8) (tabla 9).

Tabla 9. Formulación de los Medios 7 y 8

| Componente            | g/L     | 7 | 8 |
|-----------------------|---------|---|---|
| Extracto de boniato   | 10,0    | X | X |
| Extracto de levadura  | 10, 0   | X | X |
| Fosfato monopotásico  | 1,0     | X | X |
| Sulfato de magnesio   | 0,5     | X | X |
| Agar                  | 15,0    | X | X |
| Desoxicolato de sodio | 0,5     | X | X |
| Glicerol              | 10 (mL) |   | X |
| Azul de bromotimol    | 0,08    | X | X |

15

Se observó crecimiento intenso de *Candida albicans* y *Candida tropicalis* con sólo 24 horas de incubación.

Por otra parte, con el objetivo de comprobar la estabilidad de las reacciones de identificación y el mantenimiento de las propiedades nutritivas del medio, se realizó una lectura de los resultados a las 76 horas de incubación.

- 20 Se mantuvo el crecimiento de las especies señaladas y se comprobó que las reacciones de identificación fueron estables por ese tiempo de incubación (tabla 10).

Tabla 10. Resultado del crecimiento microbiano a las 76 horas de incubación de los medios nutritivos 7 y 8

| Microorganismo       | Medio | Coloración de la colonia |        | Morfología                             |
|----------------------|-------|--------------------------|--------|----------------------------------------|
|                      |       | Amarilla                 | Blanca |                                        |
| <i>C. albicans</i>   | 7     |                          | X      |                                        |
|                      | 8     |                          | X      |                                        |
| <i>C. tropicalis</i> | 7     | X                        |        |                                        |
|                      | 8     | X                        |        |                                        |
| <i>C. glabrata</i>   | 7     |                          | X      | abultadas, brillosas, bordes regulares |
|                      | 8     | X                        |        |                                        |
| <i>C. kefyr</i>      | 7     |                          | X      |                                        |

|                        |   |   |   |                                        |
|------------------------|---|---|---|----------------------------------------|
|                        | 8 |   | X |                                        |
| <i>C. krusei</i>       | 7 |   | X | aplastadas, opacas, bordes irregulares |
|                        | 8 |   | X |                                        |
| <i>C. parapsilosis</i> | 7 | X |   | superficie rugosa, bordes regulares    |
|                        | 8 | X |   |                                        |

## Ejemplo 6

Se realizó la evaluación del empleo del sustrato cromogénico 6-Cloro-3-Indoxil- $\beta$ -D-glucopiranosido, como componente del medio nutritivo 9 para diferenciar algunas especies de *Candida* (tabla 11).

5

Tabla 11. Formulación del medio nutritivo 9

| Componente                                               | g/L   |
|----------------------------------------------------------|-------|
| Extracto de boniato                                      | 10,0  |
| Extracto de levadura                                     | 10, 0 |
| Fosfato monopotásico                                     | 1,0   |
| Sulfato de magnesio                                      | 0,5   |
| Agar                                                     | 15,0  |
| Desoxicolato de sodio                                    | 0,5   |
| 6-Cloro-3-Indoxil- $\beta$ -D-glucopiranosido (Rosa-glu) | 0,1   |

Se inoculó el medio por inundación de la superficie hasta altas diluciones ( $10^{-4}$ - $10^{-5}$ ).

10

Se incubaron las placas por 48 horas y a ese intervalo de tiempo las colonias de *Candida tropicalis* y *Candida kefyr* tomaron coloración rosada siendo más fuerte en *Candida kefyr*. Se demostró que a diluciones mayores de las anteriormente estudiadas se pudo, no sólo recuperar las especies de *Candida*, sino obtener respuestas cromogénicas características, al observarse coloración rosa en ambas especies.

Se evidenció el alto poder nutritivo del extracto de boniato en su mezcla con el de levadura, tanto como fuente de nitrógeno, como de vitaminas y macro y micro elementos, ya que sólo estas dos bases nutritivas constituyeron las fuentes de nutrientes en la formulación del medio.

15

Se demostró, una vez más, que lejos de interferir en las reacciones cromogénicas, ambos extractos, en combinación, favorecen la aparición de las reacciones cromogénicas a muy bajas concentraciones del inóculo.

20

Se pudo establecer el alto poder de recuperación del medio nutritivo, ya que a la dilución  $10^{-4}$ , fue imposible hacer el recuento en las placas de las especies de *Candida glabrata* y *Candida krusei*, por resultar incontables, y sólo en la dilución  $10^{-5}$ , se obtuvieron los recuentos que aparecen en la tabla 12.

Tabla 12. Crecimiento de diferentes especies de *Candida* en el medio nutritivo 9

| Microorganismo       | UFC/placa en la dilución |           | Coloración de la colonia |        | Morfología                             |
|----------------------|--------------------------|-----------|--------------------------|--------|----------------------------------------|
|                      | $10^{-4}$                | $10^{-5}$ | Rosada                   | Blanca |                                        |
| <i>C. albicans</i>   | 45                       | 5         |                          | X      |                                        |
| <i>C. tropicalis</i> | 47                       | 5         | X                        |        |                                        |
| <i>C. glabrata</i>   | INC                      | 36        |                          | X      | abultadas, brillosas, bordes regulares |
| <i>C. kefyr</i>      | 51                       | 11        | X                        |        |                                        |

|                        |     |    |  |   |                                        |
|------------------------|-----|----|--|---|----------------------------------------|
| <i>C. krusei</i>       | INC | 50 |  | X | aplastadas, opacas, bordes irregulares |
| <i>C. parapsilosis</i> | 48  | 6  |  | X | superficie rugosa, bordes regulares    |

INC- Incontable

Ejemplo 7

- 5 Se llevó a cabo la evaluación de la capacidad nutritiva de varios componentes ricos en nitrógeno de origen proteico (hidrolizado enzimático de caseína y peptona bacteriológica) con y sin desoxicolato de sodio.

Se estudiaron variantes experimentales del medio nutritivo (de la 10 a la 15) (tabla 13), adicionando diferentes fuentes de nitrógeno y desoxicolato de sodio, en comparación con el medio de referencia (R2): Agar Dextrosa de Sabouraud (BioCen).

- 10 Tabla 13. Composición de las variantes experimentales del medio nutritivo y del medio de referencia

| Componentes                       | g/L  | 10 | 11 | 12 | R2 | 13 | 14 | 15 |
|-----------------------------------|------|----|----|----|----|----|----|----|
| Extracto de boniato               | 10,0 | X  | X  | X  | -  | X  | X  | X  |
| Extracto de levadura              | 10,0 | X  | X  | X  | -  | X  | X  | X  |
| Fosfato monopotásico              | 1,0  | X  | X  | X  | -  | X  | X  | X  |
| Sulfato de magnesio               | 0,5  | X  | X  | X  | -  | X  | X  | X  |
| Hidrolizado enzimático de caseína | 5,0  | -  | X  | -  | X  | -  | X  | -  |
| Peptona bacteriológica            | 5,0  | -  | -  | X  | X  | -  | -  | X  |
| Dextrosa                          | 40,0 | -  | -  | -  | X  | -  | -  | -  |
| Agar                              | 15,0 | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  |
| Desoxicolato de sodio             | 0,5  | -  | -  | -  | -  | X  | X  | X  |

Los medios 10, 11, 12 y R2 se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos y los medios 13, 14 y 15 se fundieron y se hirvieron durante 2-3 minutos.

- 15 El pH de las variantes experimentales del medio nutritivo resultó 6,8 en todos los casos. El pH del medio R2 resultó de 5,6.

Se inculó por estría hasta el agotamiento del inóculo.

Al observar el crecimiento y la morfología de las colonias de *Candida*, se concluyó que si bien la adición de hidrolizado enzimático de caseína y de la peptona bacteriológica, no provocaron la intensificación del crecimiento de manera significativa, tampoco lo perjudicaron.

- 20 En comparación con el medio R2, no se observó diferencia entre el medio R2 y las variantes del medio nutritivo para *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, incluso en las variantes que emplearon el desoxicolato de sodio como inhibidor.

- 25 Se comprobó, que si bien el crecimiento de *C. glabrata* y *C. krusei* se vio mediante colonias de menor tamaño y de menor intensidad de color, efectos provocados por la adición del desoxicolato de sodio y la ausencia de fuentes alternativas de carbohidratos, se pudo detectar y recuperar a estas especies sin dificultad.

- 30 En comparación con el medio R2, que no posee inhibidores y contiene un alto nivel de azúcar (dextrosa), las variantes del medio nutritivo resultaron satisfactorias. Este efecto inesperado permite concluir que la mezcla de extracto de boniato y de levadura, le aporta al medio nutritivo el nitrógeno suficiente para el desarrollo de las distintas especies de *Candida*, aunque el medio puede ser suplementado, con vistas a

proveer de fuentes de nitrógeno de origen proteico para mantener por períodos más prolongados de conservación a este microorganismo, sin que se agoten las fuentes provenientes de ambos extractos.

- 5 Otro aspecto relevante está dado en que todas las variantes del medio nutritivo mantuvieron un pH estable de 6,8, lo que junto con los elementos nutritivos señalados anteriormente, garantizaron el crecimiento adecuado de las especies de *Candida*, incluso en condiciones menos favorables que la variante control (R2), y resultó de vital trascendencia para lograr la expresión morfológica característica de las colonias y la buena recuperación lograda.

#### Ejemplo 8

- 10 Con el objetivo de estudiar la influencia de la cantidad adicionada de extracto de boniato como fuente de nutrientes de todo tipo (carbohidratos, nitrógeno, vitaminas y macro- y micro- elementos) y la adición de glicerol, como posible marcador enzimático para la futura diferenciación de especies de *Candida*, se elaboraron nuevas variantes del medio nutritivo (16-19) (tabla 14), comparándolas con el medio de referencia (R2).

Se inocularon las diferentes especies de *Candida* por estría hasta el agotamiento del inóculo.

- 15 El pH del medio R2 resultó de 5,6 y el de las variantes experimentales fue de 6,8, corroborándose nuevamente el comportamiento de este indicador ya analizado en el ejemplo anterior.

En todas las variantes ensayadas, en un período tan temprano como las 24 horas se observó crecimiento de todas las especies de levaduras estudiadas.

- 20 Se comprobó que la adición de glicerol favoreció el crecimiento de todas las especies evaluadas, al obtener colonias con mejor desarrollo, por lo que se puede afirmar que el glicerol no afecta el crecimiento microbiano.

Tabla 14. Composición del medio nutritivo

| Componentes                       | g/L   | 16                       | R2 | 17 | 18 | 19 |
|-----------------------------------|-------|--------------------------|----|----|----|----|
| Extracto de boniato               | 10,0  | 20 (doble concentración) | -  | X  | X  | X  |
| Extracto de levadura              | 10, 0 | X                        | -  | X  | X  | X  |
| Fosfato monopotásico              | 1,0   | X                        | -  | -  | X  | X  |
| Sulfato de magnesio               | 0,5   | X                        | -  | -  | X  | X  |
| Hidrolizado enzimático de caseína | 5,0   | -                        | X  | -  | -  | -  |
| Peptona bacteriológica            | 5,0   | -                        | X  | -  | -  | -  |
| Dextrosa                          | 40,0  | -                        | X  | -  | -  | -  |
| Agar                              | 15,0  | X                        | X  | X  | X  | X  |
| Desoxicolato de sodio             | 0,5   | X                        | -  | X  | X  | X  |
| Glicerol                          | 10 mL | -                        | -  |    | -  | X  |

- 25 El incremento de la cantidad de extracto de boniato favorece igualmente al medio nutritivo, pues a pesar de la presencia del desoxicolato de sodio, se logró buen crecimiento de las especies de interés.

- 30 La ausencia de fosfato monopotásico y de sulfato de magnesio en la variante 17 no condujo a la ausencia de crecimiento, pero sí a una ligera disminución de la intensidad de crecimiento de *C. glabrata* y *C. krusei* a las 24 horas. Esto demuestra que el extracto de boniato en su combinación con el de levadura son suficientes para suministrar los requerimientos de macro y micro-elementos mínimos esenciales para promover el crecimiento de todas las especies de *Candida*.

#### Ejemplo 9

En este experimento se evaluó la utilidad de incorporar el glicerol con un indicador de pH para diferenciar especies de *Candida* en el medio nutritivo, además comparar esa respuesta con la adición de dextrosa,

carbohidrato empleado en la mayoría de las soluciones descritas en el estado del arte para promocionar crecimiento de estas levaduras.

En paralelo, se incorporaron dos sustratos cromogénicos y fluorogénicos para detectar la posible interferencia de las fuentes de carbono adicionadas con las reacciones de cromogénesis y fluorogénesis.

- 5 Las formulaciones del medio nutritivo (20-22) aparecen en la tabla 15 y se comparan con el medio de referencia R3 conformado a partir de la formulación del R2 con adición de los sustratos cromogénicos y fluorogénicos, indicador de pH y desoxicolato de sodio. El pH de todos los medios se ajustó a 6,8.
- Se sembraron las cepas de diferentes especies de *Candida* y otros microorganismos, por estría en la superficie del medio. El medio se incubó por 24-48 horas.
- 10 Se sembraron especies de *Candida* y otros microorganismos tales como: *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*. La tabla 16 muestra las respuestas obtenidas con las variantes del medio nutritivo estudiadas, para los diferentes microorganismos.

Tabla 15. Formulaciones de las variantes experimentales del medio propuesto y de referencia

| Componente                                               | g/L   | Medio |    |    |                           |
|----------------------------------------------------------|-------|-------|----|----|---------------------------|
|                                                          |       | 20    | 21 | 22 | R3                        |
| Extracto de boniato                                      | 10,0  | X     | X  | X  | -                         |
| Extracto de levadura                                     | 10, 0 | X     | X  | X  | -                         |
| Fosfato monopotásico                                     | 1,0   | X     | X  | X  | -                         |
| Sulfato de magnesio                                      | 0,5   | X     | X  | X  | -                         |
| Agar                                                     | 15,0  | X     | X  | X  | X                         |
| Desoxicolato de sodio                                    | 0,5   | X     | X  | X  | X                         |
| Glicerol                                                 | 10mL  | -     | -  | X  | -                         |
| Hidrolizado enzimático de caseína                        | 5,0   | -     | -  | -  | X                         |
| Peptona bacteriológica                                   | 5,0   | -     | -  | -  | X                         |
| Dextrosa                                                 | 20,0  | -     | X  | -  | (40, doble concentración) |
| Azul de bromotimol                                       | 0,08  | X     | X  | X  | X                         |
| 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosido | 0,1   | X     | X  | X  | X                         |
| 4-Metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminida  | 0,15  | X     | X  | X  | X                         |

Tabla 16. Respuesta de los microorganismos ensayados en diferentes variantes de medios de cultivo

| Microorganismo       | Medio | Característica de la colonia | Característica del medio | Fluorescencia | Morfología              |
|----------------------|-------|------------------------------|--------------------------|---------------|-------------------------|
| <i>C. albicans</i>   | 20    | blanco-amarilla              | azul                     | sí            | 1 mm, lisas, redondas   |
|                      | 21    | amarilla                     | amarillo                 | no            | 1 mm, lisas, redondas   |
|                      | 22    | blanco-amarillo              | azul                     | sí            | 1 mm, lisas, redondas   |
|                      | R3    | amarillo                     | amarillo                 | no            | 1 mm, lisas, redondas   |
| <i>C. tropicalis</i> | 20    | blanco gris a azul           | verde                    | ligera        | 2 mm, lisas, redondas   |
|                      | 21    | blanco gris                  | verde                    | no            | 2 mm, lisas, redondas   |
|                      | 22    | blanco gris a azul           | verde                    | ligera        | 2 mm, lisas, redondas   |
|                      | R3    | blanco gris                  | verde                    | no            | 2 mm, lisas, redondas   |
| <i>C. glabrata</i>   | 20    | blanco                       | azul                     | no            | 0,5 mm, lisas, redondas |
|                      | 21    | amarillo-naranja             | amarillo                 | no            | 1,5 mm, lisas, redondas |
|                      | 22    | amarillo                     | amarillo                 | no            | 1 mm, lisas, redondas   |
|                      | R3    | amarillo                     | amarillo                 | no            | 1 mm, lisas, redondas   |
| <i>C. kefyr</i>      | 20    | azul                         | verde                    | no            | 0,5 mm, lisas, redondas |
|                      | 21    | verde                        | amarillo                 | no            | 0,5 mm, lisas, redondas |
|                      | 22    | azul                         | verde                    | no            | 0,5 mm, lisas, redondas |
|                      | R3    | NC                           | NC                       | -             | -                       |

Tabla 16. (continuación)

| Microorganismo | Medio | Característica de la colonia | Característica del medio | Fluorescencia | Morfología |
|----------------|-------|------------------------------|--------------------------|---------------|------------|
|                |       |                              |                          |               |            |

|                        |    |                                     |                  |    |                                        |
|------------------------|----|-------------------------------------|------------------|----|----------------------------------------|
| <i>C. parapsilosis</i> | 20 | blanco                              | azul             | no | 1 mm, irregulares, redondas            |
|                        | 21 | blanco-amarillo                     | verde            | no | 1 mm, irregulares, redondas            |
|                        | 22 | blanco-amarillo                     | verde            | no | 1 mm, irregulares, redondas            |
|                        | R3 | amarillo                            | amarillo         | no | 1 mm, irregulares, redondas            |
| <i>C. krusei</i>       | 20 | transparente                        | azul             | no | 0,5 mm, aplastadas                     |
|                        | 21 | amarillo                            | verde            | no | 1,5 mm, aplastadas                     |
|                        | 22 | blanco-amarillo                     | amarillo-verdoso | no | 1 mm, aplastadas                       |
|                        | R3 | amarillo                            | amarillo         | no | 1,5 mm, aplastadas                     |
| <i>E. aerogenes</i>    | 20 | verde-azul com centro verde intenso | azul             | no | 2-4 mm, redondas                       |
|                        | 21 | amarillo-naranja                    | amarillo         | no | 1 mm, redondas                         |
|                        | 22 | verde                               | verde            | no | 2-4 mm, redonda                        |
|                        | R3 | amarilla, halo transparente         | amarilla         | no | 2 mm, redonda                          |
| <i>S. typhimurium</i>  | 20 | verde intenso                       | verde-azul       | no | 1 mm, redonda                          |
|                        | 21 | amarilla                            | amarilla         | no | 1-2 mm, bordes irregulares, aplastadas |
|                        | 22 | verde intenso                       | verde-azul       | no | 1 mm, redondas                         |
|                        | R3 | amarillo                            | amarilla         | no | 1 mm, redondas                         |

Tabla 16. (continuación)

| Microorganismo       | Medio | Característica de la colonia | Característica del medio | Fluorescencia | Morfología            |
|----------------------|-------|------------------------------|--------------------------|---------------|-----------------------|
| <i>P. aeruginosa</i> | 20    | transparente                 | azul                     | no            | irregulares, mucoides |
|                      | 21    | amarillo                     | amarillo                 | no            | irregulares, mucoides |

|                    |    |          |          |    |                       |
|--------------------|----|----------|----------|----|-----------------------|
|                    | 22 | amarillo | verde    | no | irregulares, mucoides |
|                    | R3 | amarillo | amarillo | no | irregulares, mucoides |
| <i>E. faecalis</i> | 20 | NC       | NC       | -  | -                     |
|                    | 21 | NC       | NC       | -  | -                     |
|                    | 22 | NC       | NC       | -  | -                     |
|                    | R3 | NC       | NC       | -  | -                     |
| <i>S. aureus</i>   | 20 | NC       | NC       | -  | -                     |
|                    | 21 | NC       | NC       | -  | -                     |
|                    | 22 | NC       | NC       | -  | -                     |
|                    | R3 | NC       | NC       | -  | -                     |

NC - no crecimiento

En las variantes 21 y R3, en la cuales se incluyó la dextrosa, el resultado de la diferenciación de las especies estudiadas no fue satisfactorio, debido a que la hidrólisis de este azúcar por varias especies de *Candida* y de los demás microorganismos sembrados dio como resultado un mismo color común y una elevada producción de ácido, con la disminución del pH y el viraje del indicador, además de una inhibición de la reacción cromogénica por la disminución del pH. Tal es el caso de *Enterobacter*, *Salmonella* y *Pseudomonas* y de casi todas las especies de *Candida*, menos *Candida tropicalis*, *Candida krusei* y *Candida parapsilosis* en la variante 21.

La inclusión de este azúcar no es recomendable.

La adición de glicerol en la variante del medio nutritivo 22, en la cantidad prevista, además de no entorpecer el crecimiento de los microorganismos de interés a las 24 horas, especialmente *Candida krusei* y *Candida glabrata*, permite, conjuntamente con los sustratos cromogénicos y fluorogénicos, diferenciar adecuadamente las diferentes especies de *Candida*, incluso de otros microorganismos Gram-negativos que pudieran crecer e interferir, al menos en teoría, con la identificación de las levaduras estudiadas.

Específicamente, se logró diferenciar *Candida albicans* por el color blanco de la colonia y la fluorescencia azul; *Candida tropicalis* por el color azul de la colonia en masa y fluorescencia azul, *Candida kefyr* por el color azul, sin fluorescencia, *Candida glabrata* de color amarillo en la colonia, *Candida krusei* de colonia blanco-amarillenta, pero su morfología es de una colonia opaca, aplastada, bordes irregulares, pero redondeados y la *Candida parapsilosis* del mismo color pero su superficie es irregular.

Los microorganismos Gram-negativos originaron un color del medio verde y colonias verdes, excepto *Pseudomonas aeruginosa* que presenta colonias amarillas, pero mucoides.

La presencia de desoxicolato de sodio permitió inhibir a los microorganismos Gram-positivos inoculados, incluso a concentraciones elevadas ( $10^8$  UFC/mL).

Ejemplo 10

Con el objetivo de evaluar la influencia del pH en la respuesta microbiológica, se procedió a variar el pH de 6,1 a 6,8 y adicionar diferentes sustancias buferantes (medios nutritivos 23-25) (tabla 17).

Tabla 17. Formulación de medios nutritivos con valor del pH de 6,1

| Componente           | g/L   | Medio |    |    |
|----------------------|-------|-------|----|----|
|                      |       | 23    | 24 | 25 |
| Extracto de boniato  | 10,0  | X     | X  | X  |
| Extracto de levadura | 10, 0 | X     | X  | X  |
| Fosfato monopotásico | 1,0   | X     | X  | X  |

|                                                          |      |   |   |   |
|----------------------------------------------------------|------|---|---|---|
| Sulfato de magnesio                                      | 0,5  | X | X | X |
| 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosido | 0,1  | X | X | X |
| 4-Metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminida  | 0,15 | X | X | X |
| Agar                                                     | 15,0 | X | X | X |
| Desoxicolato de sodio                                    | 0,5  | X | X | X |
| 3-(N-morfolina)-ácido-propano sulfónico (MOPS)           | 0,5  | - | X | - |
| Fosfato dipotásico                                       | 4,0  | - | - | X |

Los medios 26, 27 y 28 poseen las mismas formulaciones que los tres que aparecen en la tabla 17, pero el pH de los mismos se ajustó a 6,8.

- 5 De manera general, se evidenció que las variantes de medios nutritivos de pH 6,1 demoraron más para reaccionar frente al sustrato 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-N-acetil- $\beta$ -D-glucósido para *Candida kefyr*. No obstante, es necesario destacar que el desarrollo de *Candida albicans*, *Candida glabrata* y *Candida krusei* resultó superior a este pH que a pH 6,8.

La incorporación del MOPS no influyó negativamente en el desarrollo de los microorganismos estudiados, ni interfirió en la respuesta de identificación.

- 10 La adición de fosfato dipotásico, tampoco inhibió la respuesta, sin embargo provocó la aparición de una ligera opalescencia que no interfirió en la identificación o diferenciación microbiana.

A manera de conclusión del experimento, se pudo evidenciar que tanto el pH 6,1, como el valor de 6,8 posibilitaron el crecimiento y diferenciación de las especies de *Candida*, pero debe ser ajustado en dependencia de la especie de interés a cultivar o identificar.

- 15 Ejemplo 11

Para comprobar el efecto que ejerce la adición del desoxicolato de sodio sobre el crecimiento de *Candida* y su identificación en comparación con el empleo de sustancias inhibidoras del crecimiento de los organismos Gram-negativos de naturaleza antibiótica reportados en el estado del arte se incluyó el cloranfenicol en la formulación de una variante de medio.

- 20 Se compararon los medios 26 y 27 que aparecen en la tabla 18 con el medio cromogénico CHROMagar *Candida* (R4) (CHROMagar) y el medio Agar Dextrosa de Sabouraud (R2) (BioCen).

Se inocularon varias cepas de diferentes especies de *Candida* por estriado hasta agotar el inóculo.

De *Candida albicans* se inocularon 4 cepas aisladas y dos de la ATCC (10231 y 17111), 1 cepa de las demás especies de levadura. Los resultados se muestran en la tabla 19.

- 25 Tabla 18. Formulaciones del medio nutritivo con diferentes inhibidores

| Composición                                              | g/L   | 26 | 27 |
|----------------------------------------------------------|-------|----|----|
| Extracto de boniato                                      | 10,0  | X  | X  |
| Extracto de levadura                                     | 10, 0 | X  | X  |
| Fosfato monopotásico                                     | 1,0   | X  | X  |
| Sulfato de magnesio                                      | 0,5   | X  | X  |
| Agar                                                     | 15,0  | X  | X  |
| Desoxicolato de sodio                                    | 0,5   | X  | -  |
| Cloranfenicol                                            | 0,5   | -  | X  |
| 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosido | 0,1   | X  | X  |

|                                                 |      |   |   |
|-------------------------------------------------|------|---|---|
| 4-Metilumbeliferil-N-acetil-β-D-galactosaminida | 0,15 | X | X |
|-------------------------------------------------|------|---|---|

Tabla 19. Crecimiento de especies de *Candida* en el medio nutritivo y en CHROMagar Candida

| Microorganismo       | Medio | Color de la colonia            | Fluorescencia | Morfología                 | Tamaño de las colonias, mm/intensidad de crecimiento |
|----------------------|-------|--------------------------------|---------------|----------------------------|------------------------------------------------------|
| <i>C. albicans</i>   | 26    | blanco                         | azul          | lisas, redondas, abultadas | 1-1,5 bueno                                          |
|                      | 27    | blanco                         | azul          | lisas, redondas, abultadas | 1-1,5 bueno                                          |
|                      | R2    | blanco                         | -             | lisas, redondas, abultadas | 1 bueno                                              |
|                      | R4    | verde claro                    | -             | lisas, redondas, abultadas | 1 bueno                                              |
| <i>C. tropicalis</i> | 26    | azul pálido                    | muy débil     | lissa, redondas, abultadas | 1,5-2 bueno-excelente                                |
|                      | 27    | blanco con leve tonalidad azul | muy débil     | lisas, redondas, abultadas | 1,5-2 bueno-excelente                                |
|                      | R2    | blanco                         | -             | lisas, redondas, abultadas | 1,5 bueno-excelente                                  |
|                      | R4    | azul gris                      | -             | lisas, redondas, abultadas | 1 bueno                                              |

Tabla 19. (continuación)

5

| Microorganismo     | Medio | Color de la colonia | Fluorescencia | Morfología      | Tamaño de las colonias, mm/intensidad de crecimiento |
|--------------------|-------|---------------------|---------------|-----------------|------------------------------------------------------|
| <i>C. glabrata</i> | 26    | blanco              | no            | lisas, redondas | 0,5 bueno                                            |
|                    | 27    | blanco              | no            | lisas, redondas | 0,5 bueno                                            |
|                    | R2    | blanco              | -             | lisas, redondas | 1-1,5 bueno                                          |

|                  |    |                           |    |                                        |              |
|------------------|----|---------------------------|----|----------------------------------------|--------------|
|                  | R4 | violeta                   | -  | lisas, redondas                        | 1<br>bueno   |
| <i>C. kefyr</i>  | 26 | azul intenso              | no | lisas, redondas                        | 1<br>bueno   |
|                  | 27 | azul intenso              | no | lisas, redondas                        | 1<br>bueno   |
|                  | R2 | blanco                    | -  | lisas, redondas                        | 1<br>bueno   |
|                  | R4 | blanco                    | -  | lisas, redondas                        | 1<br>bueno   |
| <i>C. krusei</i> | 26 | blanco, semi-transparente | no | opacas, aplastadas, aspecto algodonoso | 0,5<br>bueno |
|                  | 27 | blanco, semi-transparente | no | opacas, aplastadas, aspecto algodonoso | 0,5<br>bueno |
|                  | R2 | blanco, semi-transparente | -  | opacas, aplastadas, aspecto algodonoso | 0,5<br>bueno |
|                  | R4 | rosa pálido               | -  | opacas, aplastadas, aspecto algodonoso | 1<br>bueno   |

Como se puede apreciar, la incorporación del cloranfenicol interfiere y dificulta la diferenciación de las especies, específicamente de las reacciones cromogénicas, por ejemplo, en el caso de *Candida tropicalis*.

5 Por otra parte, el empleo del cloranfenicol no garantiza la estabilidad prolongada del medio listo para el uso, sobre todo a temperatura ambiente.

El medio CHROMagar *Candida* no pudo ser empleado (conservado e incubado) en presencia de luz pues el fabricante no lo recomienda. Además, el medio preparado sólo se pudo emplear por un día, pues después de este período se deteriora.

10 El medio nutritivo de la presente invención preparado según la formulación de la variante 26, se conservó incluso a temperatura ambiente sin deterioro de sus características promotoras del crecimiento y de las reacciones de detección.

Con esta variante de formulación se logró que las colonias de *Candida albicans* y *Candida tropicalis* (las dos especies de mayor importancia) presentaron tamaños de colonias superiores a los medios de referencia.

15 Ejemplo 12

En el siguiente experimento se procedió a estudiar la influencia del contenido de glicerol en presencia de dos indicadores de pH.

20 En la tabla 20 se presentan las formulaciones de las primeras cinco variantes (28-32), en las otras cinco (33-37) se mantuvieron los ingredientes en la concentración señalada, menos el caso del púrpura de bromocresol que fue sustituido por azul de bromotimol.

Todas las formulaciones fueron esterilizadas en autoclave y el pH se ajustó a 6,8.

Se ejecutó la siembra de las diferentes cepas por estriado de la superficie.

Tabla 20. Ingredientes fundamentales del medio experimental en diferentes composiciones

| Componentes            | g/L            | 28 | 29 | 30 | 31 | 32   |
|------------------------|----------------|----|----|----|----|------|
| Extracto de boniato    | 10,0           | X  | X  | X  | X  | X    |
| Extracto de levadura   | 10, 0          | X  | X  | X  | X  | X    |
| Fosfato monopotásico   | 1,0            | X  | X  | X  | X  | X    |
| Sulfato de magnesio    | 0,5            | X  | X  | X  | X  | X    |
| Púrpura de bromocresol | 0,04           | X  | X  | X  | X  | X    |
| Agar                   | 13,0           | X  | X  | X  | X  | X    |
| Desoxicolato de sodio  | 0,5            | X  | X  | X  | X  | X    |
| Glicerol               | variables (mL) | -  | 1  | 5  | 10 | 12,5 |

- 5 Para *Candida albicans* no se detectó efecto depresor del crecimiento al aumentar la concentración de glicerol. Este microorganismo no utiliza este sustrato.

El medio no cambió de color, por lo que no se detectó actividad enzimática indicadora que se vea reflejada en un cambio de pH del medio.

Para *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis* tampoco se observó inhibición de crecimiento al aumentar la concentración de glicerol.

- 10 Los resultados del crecimiento de *Candida kefyr* evidenciaron que, al aumentar la concentración de glicerol, se favoreció el color, tamaño y brillo de las colonias. Este microorganismo tampoco degrada el glicerol como sustrato.

- 15 El incremento del glicerol posibilita la mejor visualización del cambio de color en las colonias de *Candida glabrata* (incremento de la tonalidad amarilla) y del medio (amarillo), además sus características morfológicas mejoran al observarse colonias más abultadas, de mayor tamaño y coloración más acentuada. En este microorganismo el púrpura de bromocresol mejoró la respuesta al cambio de pH. También se pudo apreciar el cambio de color, observando el fondo de la placa, donde a profundidad se pudo apreciar adecuadamente la reacción en forma de halo de color amarillo alrededor de la colonia.

- 20 En el caso de *Candida krusei*, el aumento del contenido de glicerol favorece la mejor visualización del cambio de color del medio (amarillo), además sus características morfológicas mejoran al observarse colonias de mayor tamaño de 1 a 3 mm y coloración blanca más acentuada. Para este microorganismo el azul de bromotimol favoreció la detección del cambio de color en el medio (viraje a amarillo) al aumentar la concentración del sustrato. En general, la adición de agar en concentración de 13 g/L favoreció el tamaño de las colonias, aunque se consideró que debajo de ese nivel la superficie del medio podía quebrarse al sembrar por el método de estrías.

Ejemplo 13

- 30 Varios inhibidores de los microorganismos Gram-negativos y Gram-positivos fueron analizados y comparados (tabla 21) con vistas a determinar cuáles pueden ser utilizados en la composición del medio nutritivo de la presente invención y para comparar la adición de aquellos que han sido reportados por diferentes autores y que aparecen en el estado de la técnica.

Se sembraron 6 especies de *Candida* y 6 cepas de microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos (por estriado en la superficie a partir de un inóculo  $10^8$  UFC/mL) a inhibir, entre ellas *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*.

- 35 Se incubaron las placas de los medios a 30 °C por 48 horas. Las variantes de medios nutritivos 38 y 39 permitieron la total inhibición de los microorganismos Gram-negativos y Gram-positivos ensayados. Las especies de *Candida* mostraron buen crecimiento. El color de las diferentes especies fue marrón oscuro, a excepción de *Candida glabrata* que resultó blanca.

- 40 La variante 40 inhibió a todos los microorganismos Gram-positivos y a *Proteus vulgaris*. Todas las cepas de *Candida* mostraron crecimiento muy abundante, con morfología característica y de color rosado.

El medio nutritivo 41 inhibió a *Candida krusei* y *Candida parapsilosis*, no lográndose la total inhibición de los microorganismos Gram-negativos.

Las variantes 42 y 43 resultaron demasiado inhibitorias para los microorganismos a inhibir e incluso para *Candida* y estas últimas especies no crecieron en el medio.

5 Las variantes de 44 a 48, de manera similar inhibieron totalmente a las especies de *Candida*.

10 Como resultado de los ensayos se pudo demostrar que de manera inesperada, sólo el sulfito de sodio, el citrato de amonio y bismuto y la rosa bengala, en combinación con el extracto de boniato y su mezcla con el extracto de levadura, permitieron el crecimiento y diferenciación de todas las especies de *Candida* y lograron inhibir los microorganismos de competencia, impidiendo que aquellos organismos Gram-negativos que pudieran tener las mismas reacciones de identificación resultaran totalmente inhibidos, al igual que los Gram-positivos que no crecieron en las variantes de los medios que contenían dichos ingredientes.

Tabla 21. Formulaciones del medio nutritivo con diferentes inhibidores

| Componentes                            | g/L      | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44  | 45  | 46  | 47  | 48  |
|----------------------------------------|----------|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Extracto de boniato                    | 10,0     | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X   | X   | X   | X   | X   |
| Extracto de levadura                   | 10,0     | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X   | X   | X   | X   | X   |
| Fosfato monopotásico                   | 1,0      | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X   | X   | X   | X   | X   |
| Sulfato de magnesio                    | 0,5      | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X   | X   | X   | X   | X   |
| Agar                                   | 15,0     | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X   | X   | X   | X   | X   |
| Desoxicolato de sodio                  | 0,5      |    |    |    |    |    | X  |     |     |     |     |     |
| Sulfito de sodio                       | 3,0      | X  | X  |    |    |    |    |     |     |     |     |     |
| Citrato de amonio y bismuto            | 5,0      | X  | X  |    |    |    |    |     |     |     |     |     |
| Glicina                                | 3,0      |    | X  |    |    |    |    |     |     |     |     |     |
| Rosa bengala                           | 0,05     |    |    | X  |    |    |    |     |     |     |     |     |
| Solución de telurito de potasio al 2 % | 18 mL    |    |    |    | X  | X  | X  |     |     |     |     |     |
| Cloruro de litio                       | 5,0      |    |    |    |    | X  |    |     |     |     |     |     |
| Cetrimida                              | variable |    |    |    |    |    |    | 0,3 | 1,0 |     |     |     |
| Ácido bórico                           | variable |    |    |    |    |    |    |     |     | 1,0 | 3,0 | 5,0 |

15 Ejemplo 14

Se efectuó un experimento con el objetivo de estudiar el efecto de la leche descremada en calidad de agente nutricional como aporte de proteínas y azúcares (lactosa) a la composición.

20 En la tabla 22 aparece la composición de un diseño experimental para comparar diferentes composiciones nutritivas, teniendo en cuenta dos niveles de concentración de leche descremada en polvo. Se comparan las respuestas con una composición básica de la presente invención sin la inclusión de la leche (variante 49 de la tabla 22) y con dos formulaciones (variante 49 y variante 50) que no responden a lo reivindicado en la solución propuesta, pues sólo contienen el extracto de boniato.

Tabla 22. Ingredientes del medio experimental

| Componentes                              | g/L       | 49 | 50 | 51 | 52 |
|------------------------------------------|-----------|----|----|----|----|
| Extracto de boniato                      | 10,0      | X  | X  |    |    |
| Mezcla de extracto de boniato y levadura | 20,0      |    |    | X  | X  |
| Leche descremada                         | variables | 5  | 10 |    | 5  |
| Fosfato monopotásico                     | 1,0       | X  | X  | X  | X  |
| Sulfato de magnesio                      | 0,5       | X  | X  | X  | X  |
| Desoxicolato de sodio                    | 0,5       | X  | X  | X  | X  |
| Glicerol                                 | 10 (mL)   | X  | X  | X  | X  |
| Agar                                     | 15,0      | X  | X  | X  | X  |

El pH de trabajo definido fue 6,8.

- 5 Todas las variantes de la composición ensayadas se calentaron hasta ebullición durante 2-3 min, después de alcanzado el punto de fusión del agar y no se esterizaron por autoclave.

Se inocularon varias especies del género *Candida*, tales como, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida kefir*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* y *Saccharomyces cerevisiae*.

- 10 Se incubaron las placas durante 48 horas a temperatura de 25 °C y la lectura arrojó que en las variantes 49 y 50 no se logró un desarrollo satisfactorio de las especies *Candida glabrata*, *Candida krusei* y *Candida parapsilosis*, lo que puede estar debido a la escasez de elementos esenciales tales como, vitaminas y factores de crecimiento presentes en el extracto de levadura.

- 15 Las variantes 51 y 52 mostraron un crecimiento satisfactorio para todos los microorganismos ensayados, sin embargo, es necesario destacar que en la variante 49, las especies de *Candida kefir* manifestaron, de manera inesperada, un halo transparente debido al efecto proteolítico sobre la caseína. Ninguna otra especie mostró actividad proteolítica alguna. De esta manera se puede concluir que la leche descremada en polvo, puede constituir un nuevo marcador de actividad proteolítica de *Candida kefir* para identificarla o diferenciarla del resto de las especies.

Ejemplo 15

- 20 Se evaluó el efecto antibacteriano del ácido nalidíxico en combinación con el desoxicolato de sodio frente a un grupo de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, así como levaduras pertenecientes al género *Candida*.

El experimento consistió en un diseño que incluye una escala de concentraciones de ácido nalidíxico desde 0,01 hasta 0,05 g. En la tabla 23 se presentan las composiciones para evaluar la capacidad de inhibición sobre las bacterias y la promoción del crecimiento de las especies fúngicas.

- 25 Los medios de cultivo no se esterizaron en autoclave, sólo se fundieron hasta lograr la completa disolución del agar durante 2 a 3 min. Se distribuyeron en placas estériles.

El pH final de los medios preparados fue 6,8.

- 30 Como se aprecia en la tabla 23, las especies microbianas cultivadas fueron: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida kefir*, *Issachenkia orientalis* (*Candida krusei*), *Candida glabrata* y *Candida parapsilosis*.

La siembra se realizó a partir de un inóculo estandarizado al 50 % de transmitancia por el método de agotamiento del inóculo en la superficie del medio agarizado, con el objetivo de obtener colonias aisladas.

- 35 Las placas fueron incubadas durante 48 horas a temperatura de  $28 \pm 2$  °C. La respuesta de los ensayos arrojó, que el ácido nalidíxico en las tres concentraciones evaluadas inhibió totalmente las bacterias Gram-negativas, excepto *Pseudomonas aeruginosa*. En cuanto a las levaduras del género *Candida* sorprendentemente se apreció que, lejos de haber inhibición en su crecimiento, esta sustancia favoreció el

desarrollo colonial de especies, tales como *Candida krusei* y *Candida glabrata*, siendo otras especies del género también favorecidas pero con menor evidencia.

Tabla 23. Composiciones diseñadas para evaluar el efecto del ácido nalidíxico y el desoxicolato de sodio como agentes inhibidores de las bacterias

| Componentes                                 | g/L       | 53     | 54     | 55     |
|---------------------------------------------|-----------|--------|--------|--------|
| Mezcla de extracto de boniato y de levadura | 20,0      | X      | X      | X      |
| Fosfato monopotásico                        | 1,0       | X      | X      | X      |
| Sulfato de magnesio                         | 0,5       | X      | X      | X      |
| Desoxicolato de sodio                       | 0,5       | X      | X      | X      |
| Glicerol                                    | 10 (mL)   | X      | X      | X      |
| Ácido nalidíxico                            | variables | 0,01 g | 0,03 g | 0,05 g |
| Agar                                        | 15,0      | X      | X      | X      |

5

Este efecto se logra de manera inesperada. Profundizando en la posibles causas, se puede llegar a la conclusión, que los iones magnesio en la cantidad adicionada (0,5 g/L como sulfato de magnesio) aumentan la resistencia de *Candida* al ácido nalidíxico.

10

El hallazgo de la no inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* resultó de interés, pues este microorganismo, lejos de constituir un competidor no deseado en el diagnóstico de *Candida*, resulta de interés su identificación en conjunto, pues, por ejemplo, la otomicosis ha sido considerada por un gran número de autores como una etiología fúngica, a pesar de que en realidad son las bacterias las responsables de la mayor parte de las otitis externas y los hongos sólo están implicadas en un escaso número de estos procesos. Se estima que las otitis externas constituyen de un 5 a 20 % de las consultas otológicas, la mayoría de etiología bacteriana. Las otitis externas son causadas principalmente por *Pseudomonas*, y solamente un 15-20 % de éstas son atribuidas a hongos.

15

Ejemplo 16

20

Se ensayaron un conjunto de variantes experimentales con dos niveles de ácido nalidíxico en combinación con desoxicolato de sodio en calidad de inhibidores de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, y su combinación con glicerol y Tween 80, con vistas a definir su efecto en el desarrollo de las diferentes especies fúngicas.

En la tabla 24 se presentan las composiciones que corresponden al diseño experimental evaluado.

Tabla 24. Composiciones para evaluar dos niveles de ácido nalidíxico en combinación con glicerol y Tween 80

| Componentes                                 | g/L      | 56   | 57   | 58 | 59   | 60   | 61 | 62   | 63   | 64 |
|---------------------------------------------|----------|------|------|----|------|------|----|------|------|----|
| Mezcla de extracto de boniato y de levadura | 20,0     | X    | X    | X  | X    | X    | X  | X    | X    | X  |
| Fosfato monopotásico                        | 1,0      | X    | X    | X  | X    | X    | X  | X    | X    | X  |
| Sulfato de magnesio                         | 0,5      | X    | X    | X  | X    | X    | X  | X    | X    | X  |
| Desoxicolato de sodio                       | 0,5      | X    | X    | X  | X    | X    | X  | X    | X    | X  |
| Ácido nalidíxico                            | variable | 0.03 | 0.05 | -  | 0.03 | 0.05 | -  | 0.03 | 0.05 | -  |
| Agar                                        | 15,0     | X    | X    | X  | X    | X    | X  | X    | X    | X  |
| Glicerol                                    | 10 (mL)  | -    | -    | -  | X    | X    | X  | -    | -    | -  |

|          |         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|----------|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Tween 80 | 10 (mL) | - | - | - | - | - | - | X | X | X |
|----------|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|

Se ajustó el pH a 6,8 y se sometieron a ebullición para lograr la completa homogeneización del producto. No se esterilizaron en autoclave.

- 5 Las composiciones se evaluaron por el método de estriado hasta el agotamiento del inóculo de las especies: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida kefir*, *Candida glabrata*, *Isachenkia orientalis* (*Candida krusei*) y *Candida parapsilosis*.

Las placas fueron incubadas durante 48 horas a temperatura de  $28 \pm 2$  °C.

- 10 Los resultados muestran que el efecto del glicerol (variantes 59, 60 y 61), como suplemento en el medio de cultivo, reportó un desarrollo colonial superior para todas las especies evaluadas que al utilizar el Tween 80 como suplemento. Esta respuesta, desde la lectura a las 24 horas, evidenciaba los resultados encontrados.

Aquellas variantes con ácido nalidíxico, con ambas concentraciones (0,03 y 0,05 g/L), al ser combinadas con glicerol, manifestaron que lejos de suprimir el crecimiento y desarrollo de las colonias de especies de *Candida*, éste fue favorecido. Con el Tween 80 se obtuvo un resultado más discreto.

- 15 Ejemplo 17

Varios sustratos cromogénicos y fluorogénicos, con diferentes grupos cromógenos y/o fluorógenos, para las enzimas glicosidasas (hexosaminidasas y beta-glucosidasa), presentes en determinadas especies del género *Candida*, se evaluaron siguiendo el diseño experimental que se presenta en la tabla 25.

- 20 Tabla 25. Composiciones evaluadas con diferentes sustratos cromogénicos y/o fluorogénicos para glicosidasas

| Componentes                                 | g/L   | 65 | 66 | 67 | 68 |
|---------------------------------------------|-------|----|----|----|----|
| Mezcla de extracto de boniato y de levadura | 20,0  | X  | X  | X  | X  |
| Fosfato monopotásico                        | 1,0   | X  | X  | X  | X  |
| Sulfato de magnesio                         | 0,5   | X  | X  | X  | X  |
| Desoxicolato de sodio                       | 0,5   | X  | X  | X  | X  |
| Glicerol                                    | 10 mL | X  | X  | X  | X  |
| Agar                                        | 15,0  | X  | X  | X  | X  |
| 4-MU-β-D-galactosaminida                    | 0,1   | X  | -  | -  | -  |
| X-β-D-galactosaminida                       | 0,1   | -  | X  | -  | -  |
| X-β-D-glucosaminida                         | 0,1   | -  | -  | X  | -  |
| X-β-D-glc                                   | 0,1   | X  | -  | -  | -  |
| Salmon <sup>TM</sup> -β-D-glc               | 0,1   | -  | X  | -  | -  |

Leyenda:

4-MU-β-D-galactosaminida: 4-Metilumbeliferil-N-acetil-beta-D-galactosaminida

X-β-D-galactosaminida: 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-N-acetil-beta-D-galactosaminida

X-β-D-glucosaminida: 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-N-acetil-beta-D-glucosaminida

- 25 X-β-D-glc: 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-N-acetil-beta-D-glucopiranosido

Salmon<sup>TM</sup>-β-D-glc: 6-Cloro-3-indoxil-N-acetil-beta-D-glucopiranosido

Las composiciones fueron ajustadas a pH 6,8 y se fundieron durante 2-3 minutos hasta lograr la completa disolución del agar. No se esterilizaron en autoclave.

Las especies inoculadas fueron *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr*, *Candida glabrata*, *Isachenkia orientalis* (*Candida krusei*) y *Candida parapsilosis*.

La inoculación de las especies se realizó por el método de diluciones seriadas, con el fin de detectar en las colonias aisladas sus características morfológicas y culturales frente a los distintos sustratos utilizados.

5 Las placas fueron incubadas a 30 °C, durante 48 horas.

En la tabla 26, se destaca la influencia favorable de la presencia del glicerol como agente nutritivo, capaz de favorecer el desarrollo de las especies de *Candida* ensayadas.

Tabla 26. Crecimiento de diferentes especies de *Candida* en las composiciones cromogénicas y/o fluorogénicas

| Microorga-nismo        | Variantes | UFC/placa en la dilu-<br>ción | Características de las colonias |      |        |                |                                                             |
|------------------------|-----------|-------------------------------|---------------------------------|------|--------|----------------|-------------------------------------------------------------|
|                        |           |                               | Color                           |      |        | Fluores-cencia | Morfología                                                  |
|                        |           | 10 <sup>-5</sup>              | Azul                            | Rosa | Blanca |                |                                                             |
| <i>C. albicans</i>     | 65        | 4                             | -                               | -    | X      | X              | redonda, lisa, abultada y brillante, Ø ≈ 1 mm               |
|                        | 66        | 10                            | -                               | -    | X      | -              |                                                             |
|                        | 67        | 3                             | X                               | -    | -      | -              |                                                             |
|                        | 68        | 8                             | -                               | -    | X      | -              |                                                             |
| <i>C. tropicalis</i>   | 65        | 9                             | X                               | -    | -      | -              | redonda, lisa, abultada y brillante, Ø ≈ 1-2 mm             |
|                        | 66        | 4                             | -                               | X    | -      | -              |                                                             |
|                        | 67        | 2                             | -                               | -    | X      | -              |                                                             |
|                        | 68        | 4                             | -                               | -    | X      | -              |                                                             |
| <i>C. glabrata</i>     | 65        | 7                             | -                               | -    | X      | -              | redonda, lisa, abultada y brillante, Ø ≤ 1 mm               |
|                        | 66        | 9                             | -                               | -    | X      | -              |                                                             |
|                        | 67        | 3                             | -                               | -    | X      | -              |                                                             |
|                        | 68        | 9                             | -                               | -    | X      | -              |                                                             |
| <i>C. kefyr</i>        | 65        | 3                             | X                               | -    | -      | -              | redonda, lisa, abultada y brillante, Ø ≈ 1 mm               |
|                        | 66        | 5                             | -                               | X    | -      | -              |                                                             |
|                        | 67        | 1                             | -                               | -    | X      | -              |                                                             |
|                        | 68        | 6                             | -                               | -    | X      | -              |                                                             |
| <i>C. krusei</i>       | 65        | 8                             | -                               | -    | X      | -              | aplastadas, opacas, bordes irregulares, Ø ≈ 2-4 mm variable |
|                        | 66        | 6                             | -                               | -    | X      | -              |                                                             |
|                        | 67        | 6                             | -                               | -    | X      | -              |                                                             |
|                        | 68        | 8                             | -                               | -    | X      | -              |                                                             |
| <i>C. parapsilosis</i> | 65        | 11                            | -                               | -    | X      | -              | superficie rugosa, bordes regulares                         |
|                        | 66        | 13                            | -                               | -    | X      | -              |                                                             |
|                        | 67        | 10                            | -                               | -    | X      | -              |                                                             |
|                        | 68        | 9                             | -                               | -    | X      | -              |                                                             |

Se evidencia la aparición de características cromáticas y fluorescentes en todas las variantes evaluadas, destacándose la capacidad que posee *Candida albicans* de utilizar los sustratos de galactosaminida y glucosaminida, y las especies de *Candida tropicalis* de emplear los sustratos cromogénicos del tipo glucopiranosido.

- 5 La acción de la enzima galactosaminidasa, presente en *Candida albicans*, se aprecia con mayor claridad en la variante 65, donde las colonias se identifican por su fluorescencia al ser iluminadas con una lámpara UV. Sin embargo, con el sustrato cromogénico para detectar esa misma actividad enzimática (variante 66) no se obtuvieron resultados positivos, al no colorearse las colonias. Esta respuesta negativa no era esperada y resultó sorprendente y muy propio de la composición específica reivindicada en la presente invención.

En la variante 67 se logró que las colonias aisladas de *Candida albicans*, adquieran una coloración azul debido al empleo del sustrato cromogénico 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-N-acetil-beta-D-glucosaminida.

- 15 Las colonias de *Candida tropicalis* y *Candida kefyr*, manifiestan una coloración azul y rosada para las variantes 65 y 66, respectivamente, en dependencia de la incorporación del componente X ó Rosa al glucósido, éste último, utilizado por ambas especies.

Otras especies evaluadas, tales como, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* y *Candida glabrata* no responden frente a ninguno de los sustratos incorporados, por lo que se identifican por sus características morfológicas.

Ejemplo 18

- 20 Se procedió a la evaluación de una composición que comprende el uso de agentes antibacterianos de amplio espectro y sustratos cromogénicos específicos para la identificación y diferenciación de algunas especies de *Candida*.

La evaluación se realizó con la fórmula que aparece en la tabla 27 y se empleó como medio de referencia el Chromagar Candida (Chromagar, Francia).

- 25 La preparación de la composición se realizó pesando el total de los ingredientes y empleando agua desionizada. Se ajustó el pH a 6,8 y se llevó a ebullición hasta la disolución completa del agar durante 2-3 min.

El medio de referencia se preparó según lo establecido en la etiqueta del fabricante, siendo su pH final de 5,9.

- 30 Se ensayaron un grupo de especies fúngicas y de bacterias con vistas de evaluar la capacidad de inhibición y promoción del crecimiento de la composición experimental, entre ellas: *Candida albicans* ATCC 102321, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr*, *Candida krusei* (*Isachenkia orientalis*) *Candida glabrata* (*Torulopsis*), *Candida parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Saccharomyces uvarum* ATCC 9080, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

- 40 Los resultados alcanzados fueron muy satisfactorios, lográndose inhibir todas las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas inoculadas en el medio de cultivo, excepto *Pseudomonas aeruginosa*. Se logró diferenciar las especies *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida kefyr* de acuerdo a la coloración de las colonias aisladas. No obstante, *Candida krusei* y *Candida parapsilosis* por su coloración blanca, la primera opaca, y la segunda brillante, y por su morfología colonial también pudieron ser identificadas con la composición de la presente invención.

El medio de referencia, Chromagar Candida, solo permite la identificación de las especies *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei* y logra la inhibición total de las bacterias ensayadas.

- 45 Tabla 27. Composición del medio cromogénico según la presente invención

| Componentes                              | g/L  | 69 |
|------------------------------------------|------|----|
| Mezcla de extracto de boniato y levadura | 20,0 | X  |
| Fosfato monopotásico                     | 1,0  | X  |
| Sulfato de magnesio                      | 0,5  | X  |
| Desoxicolato de sodio                    | 0,5  | X  |

|                               |       |   |
|-------------------------------|-------|---|
| Agar                          | 15,0  | X |
| Glicerol                      | 10 mL | X |
| Ácido nalidíxico              | 0.03  | X |
| X-β-D-glucosaminida           | 0,1   | X |
| Salmon <sup>TM</sup> -β-D-glc | 0,1   | X |

Leyenda:

X-β-D-glucosaminida: 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-N-acetil-beta-D-glucosaminida

Salmon<sup>TM</sup>-β-D-glc: 6-Cloro-3-indoxil-N-acetil-beta-D-glucopiranosido

Ejemplo 19

- 5 Para detectar otras actividades enzimáticas dentro de las especies del género *Candida* se realizó un diseño para definir con cuál o cuáles de los sustratos evaluados se lograba identificar el mayor número de especies fúngicas de interés. Este experimento se hizo imprescindible, ya que no era obvio (ejemplo 17), que en la presente composición, diferentes sustratos para una misma actividad brindaran iguales respuestas, obteniéndose incluso respuestas negativas y contradictorias para algunas especies.
- 10 Las variantes consistieron en incorporar en concentración de 0,1 g/L los siguientes sustratos cromogénicos y fluorogénicos que aparecen en la tabla 28. Los ingredientes fueron incorporados a la composición básica que corresponde con la variante 69 de la tabla 25, según el diseño que se presenta en la tabla 28.
- 15 Tabla 28. Evaluación de otros sustratos cromogénicos para la detección de actividades estearasa, fosfolipasa y glicosidasas

| Formulación                                 | g/L  | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77  | 78  |
|---------------------------------------------|------|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|
| Composición de la variante 20 de la tabla 4 | 37,3 | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X  | X   | X   |
| Magenta caprylate                           | 0,1  | X  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -   | -   |
| X-nonanoate                                 | 0,1  | -  | X  | -  | -  | -  | -  | -  | -   | -   |
| X-phos-inositol                             | 0,1  | -  | -  | X  | -  | -  | -  | -  | -   | -   |
| 4-MU-β-D-xyl                                | 0,1  | -  | -  | -  | X  | -  | -  | -  | -   | -   |
| X-α-D-manosido                              | 0,1  | -  | -  | -  | -  | X  | -  | -  | -   | -   |
| X-α-D-gal                                   | 0,1  | -  | -  | -  | -  | -  | X  | -  | -   | -   |
| X-β-D-glcUA · Na                            | 0,1  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | X  | -   | -   |
| Salmon <sup>TM</sup> -β-D-glc               | Var. | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 0,1 | 0,5 |

Leyenda:

Magenta caprilate: 5-Bromo-6-cloro-3-indoxil-caprilate

X-nonanoate: 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil nonanoate

- 20 X-phos-inositol: 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-mio-inositol-1-fosfato, amonio sal

4-MU-β-D-xyl: 4-Metilumbeliferil-beta-D-xilopiranosido

X-α-D-manosido: 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-alfa-D-manopiranosido

X-α-D-gal: 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-alfa-D-galactosido

X-β-D-glcUA·Na: 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-beta-D-ácido glucuronido, ciclohexilamonio sal

Salmon<sup>TM</sup>-β-D-glc: 6-Cloro-3-indoxil-N-acetil-beta-D-glucopiranosido

A las composiciones se les ajustó el pH a  $6,8 \pm 0,1$  y se esterilizaron hirviendo los mismos durante 2-3 minutos garantizando la totalidad de disolución del agar.

- 5 Se inocularon por el método de estriado hasta el agotamiento del inóculo las siguientes especies: 4 especies aisladas de *Candida albicans*, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida albicans* ATCC 17111, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Isachenkia orientalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Saccharomyces uvarum* ATCC 9080 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 48 horas.

- 10 De manera general, se logro detectar cuáles sustratos cromogénicos o fluorogénicos eran escindidos por las diferentes especies de *Candida*.

*Candida albicans* se identifica por sus actividades fosfolipasa (sal de amonio del 5-Bromo-4-Cloro-3-Indoxil-Mio-Inositol-Fosfato), a la beta glucosidasa, pero a muy alta concentración del sustrato (6-Cloro-3-indoxil-beta-D-glucopiranosido).

- 15 *Candida tropicalis* se identifica por sus actividades fosfolipasa (sal de amonio del 5-Bromo-4-Cloro-3-Indoxil-Mio-Inositol-Fosfato), beta-glucosidasa (6-Cloro-3-indoxil-beta-D-glucopiranosido) y mannosidasa (5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-alfa-D-mannopiranosido).

*Candida kefyr* se identifica por su actividad beta-glucosidasa (6-Cloro-3-indoxil-beta-D-glucopiranosido).

*Candida parapsilosis* se identifica por sus actividades fosfolipasa (sal de amonio del 5-Bromo-4-Cloro-3-Indoxil-Mio-Inositol-Fosfato) y xilosidasa (Metilumbeliferil-beta-D-xilopiranosido).

- 20 *Candida krusei*, *Isachenkia orientalis* y *Candida glabrata* por su color blanco (opaco y brillante, respectivamente) debido a la ausencia de las mencionadas actividades enzimáticas.

*Saccharomyces uvarum* ATCC 9080 por su actividad fosfolipasa y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 no respondió a ninguno de los sustratos empleados, aunque mostró fluorescencia verdosa al incidir luz UV sobre las colonias.

- 25 Ejemplo 20

Se tomó la composición descrita en la variante 68 de la tabla 25 y se le añadieron los sustratos cromogénicos y fluorogénicos descritos en la tabla 29.

Cada variante se ensayó a 3 valores diferentes de pH: 6,0-6,4 y 6,8

Lo resultados resultaron:

- 30 *Candida albicans* se identifica por sus actividades L-prolina aminopeptidasa (L-prolina-7-amido-4-metil-coumarina hidrobromuro) y alfa glucosidasa (Metil-umbeliferil-alfa-D-glucopiranosido); *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis* se identifican por su actividad alfa- glucosidasa (Metil-umbeliferil-alfa-D-glucopiranosido). *Candida parapsilosis*, además, respondió al sustrato para la L-prolina aminopeptidasa (L-prolina-7-amido-4-metil-coumarina hidrobromuro).

- 35 Tabla 29. Evaluación de otros sustratos cromogénicos para la detección de actividades aminopeptidasa, glicosidasas y fosfatasa alcalina

| Formulación                                 | g/L  | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 |
|---------------------------------------------|------|----|----|----|----|----|----|
| Composición de la variante 20 de la tabla 4 | 37,3 | X  | X  | X  | X  | X  | X  |
| H-Pro-AMC-HBr                               | 0,1  | X  | -  | -  | -  | -  | -  |
| PNP-β-D-galactosaminida                     | 0,1  | -  | X  |    | -  | -  | -  |
| PNP-β-D-glucosaminida                       | 0,1  | -  | -  | X  | -  | -  | -  |
| 4-MU-α-D-glc                                | 0,1  | -  | -  | -  | X  | -  | -  |
| Y-phos.diNa                                 | 0,1  | -  | -  | -  | -  | X  | -  |
| 3-Indoxil-colina-fosfato                    | 0,1  | -  | -  | -  | -  | -  | X  |

Leyenda:

H-Pro-AMC-HBr: L-prolina-7-amido-4-metil-coumarina-hidrobromuro

PNP- $\beta$ -D-galactosaminida: 4-nitrofenil-N-acetil-beta-D-galactosaminidina

5 PNP- $\beta$ -D-glucosaminida: 4-nitrofenil-N-acetil-beta-D-glucosaminidina

4-MU- $\alpha$ -D-glc: 4-Metilumbeliferil-alfa-D-glucopiranosido

Y-phos.diNa: 3-Indoxil-fosfato-sal sódica

10 *Candida albicans* no mostró resultados satisfactorios en la presente composición, frente a los sustratos de hexosaminidasas evaluados (PNP- $\beta$ -D-galactosaminida y PNP- $\beta$ -D-glucosaminida) ya que ambos difunden al medio y no se puede asociar la reacción cromogénica a una determinada colonia.

Las demás especies de *Candida* no escindieron ninguno de los sustratos ensayados.

Las composiciones que poseían valores de pH de 6,4 y 6,8 fueron las que promovieron mayor desarrollo de las colonias (tamaño y morfología característica) y una mayor intensidad del color.

Ejemplo 21

15 El experimento tuvo por objetivo evaluar el efecto de la adición de trehalosa o glicerol en el crecimiento y diferenciación por cromogénesis o fluorogénesis de especies de *Candida*. La composición ensayada y sus variantes se muestra en la tabla 30.

Tabla 30. Composición de medios nutritivos para ensayar diferentes componentes

| Componentes                                 | g/L     | 85 | 86 | 87 | 88 |
|---------------------------------------------|---------|----|----|----|----|
| Mezcla de extracto de boniato y de levadura | 20,0    | X  | X  | X  | X  |
| Fosfato monopotásico                        | 1,0     | X  | X  | X  | X  |
| Sulfato de magnesio                         | 0,5     | X  | X  | X  | X  |
| Desoxicolato de sodio                       | 0,5     | X  | X  | X  | X  |
| Glicerol                                    | 10 (mL) |    |    | X  | X  |
| Trehalosa                                   | 10,0    | X  | X  |    |    |
| Ácido nalidíxico                            | 0,03    | X  | X  | X  | X  |
| Agar                                        | 15,0    | X  | X  | X  | X  |
| X- $\beta$ -D-glucosaminida                 | 0,1     | X  | X  | X  | X  |
| Salmon <sup>TM</sup> - $\beta$ -D-glc       | 0,1     | X  | X  | X  | X  |
| X-phos-inositol                             | 0,1     | X  |    | X  |    |
| 4-MU- $\alpha$ -D-glc                       | 0,1     |    | X  |    | X  |

20 En la tabla 31 se muestran los resultados de estos experimentos.

Se observó que la presencia de glicerol favoreció el crecimiento de algunas de las especies ensayadas (*Candida albicans*, *Candida krusei*).

La trehalosa, para algunas especies, en ausencia de glicerol lejos de promover el crecimiento, lo disminuyó (por ejemplo, para *Candida krusei*).

25 La adición de trehalosa sí provocó una intensificación significativa de la reacción cromogénica para *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. Este hallazgo resultó inesperado y no se había reportado en el estado del arte, ya que la trehalosa se ha empleado ampliamente en los medios de cultivo para promover crecimiento e identificar *Candida glabrata*.

*Candida albicans* se identifica por sus actividades de la hexosaminidasa (5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-N-acetil-beta-D-glucosaminida), alfa-glucosidasa (Metilumbeliferil-alfa-D-glucopiranosido) y fosfolipasa (sal de amonio del 5-Bromo-4-Cloro-3-Indoxil-Mio-Inositol-Fosfato); *Candida tropicalis* se identifica por sus actividades alfa- y beta- glucosidasas (Metilumbeliferil-alfa-D-glucopiranosido y 6-Cloro-3-indoxil-beta-D-glucopiranosido) y fosfolipasa (sal de amonio del 5-Bromo-4-Cloro-3-Indoxil-Mio-Inositol-Fosfato); *Candida kefyr* se identifica por su actividad beta-glucosidasa (6-Cloro-3-indoxil-beta-D-glucopiranosido); *Candida parapsilosis* se identifica por su actividad alfa-glucosidasa (Metil-umbeliferil-alfa-D-glucopiranosido). *Candida krusei* y *Candida glabrata* por su color blanco (opaco y brillante, respectivamente) debido a la ausencia de las mencionadas actividades enzimáticas.

10 Tabla 31. Características de diferentes especies de *Candida* en las composiciones cromogénicas y/o fluorogénicas

| Microorga-nismo        | Variantes | Características de las colonias |          |      |         |                |                                                                               |
|------------------------|-----------|---------------------------------|----------|------|---------|----------------|-------------------------------------------------------------------------------|
|                        |           | Color                           |          |      |         | Fluores-cencia | Morfología                                                                    |
|                        |           | Azul                            | Vio-leta | Rosa | Blan-ca |                |                                                                               |
| <i>C. albicans</i>     | 85        | X +                             | -        | -    | -       | -              | Redonda, lisa, abultada y brillante, $\varnothing \approx 2$ mm               |
|                        | 86        | X +                             | -        | -    | -       | X              |                                                                               |
|                        | 87        | X                               | -        | -    | -       | -              |                                                                               |
|                        | 88        | X                               | -        | -    | -       | X              |                                                                               |
| <i>C. tropicalis</i>   | 85        | -                               | X +      | -    | -       | -              | Redonda, lisa, abultada y brillante, $\varnothing \approx 1-2$ mm             |
|                        | 86        | -                               | X        | -    | -       | X              |                                                                               |
|                        | 87        | -                               | X        | -    | -       | -              |                                                                               |
|                        | 88        | -                               | X        | -    | -       | X              |                                                                               |
| <i>C. glabrata</i>     | 85        | -                               | -        | -    | X       | -              | Redonda, lisa, abultada y brillante, $\varnothing \leq 1$ mm                  |
|                        | 86        | -                               | -        | -    | X       | -              |                                                                               |
|                        | 87        | -                               | -        | -    | X       | -              |                                                                               |
|                        | 88        | -                               | -        | -    | X       | -              |                                                                               |
| <i>C. kefyr</i>        | 85        | -                               | -        | X    | -       | -              | Redonda, lisa, abultada y brillante, $\varnothing \approx 1$ mm               |
|                        | 86        | -                               | -        | X    | -       | -              |                                                                               |
|                        | 87        | -                               | -        | X    | -       | -              |                                                                               |
|                        | 88        | -                               | -        | X    | -       | -              |                                                                               |
| <i>C. krusei</i>       | 85        | -                               | -        | -    | X       | -              | Aplastadas, opacas, bordes irregulares, $\varnothing \approx 2-4$ mm variable |
|                        | 86        | -                               | -        | -    | X       | -              |                                                                               |
|                        | 87        | -                               | -        | -    | X+      | -              |                                                                               |
|                        | 88        | -                               | -        | -    | X+      | -              |                                                                               |
| <i>C. parapsilosis</i> | 85        | -                               | -        | -    | X       | -              | Superficie rugosa, bordes regulares                                           |
|                        | 86        | -                               | -        | -    | X       | X              |                                                                               |
|                        | 87        | -                               | -        | -    | X       | -              |                                                                               |
|                        | 88        | -                               | -        | -    | X       | X              |                                                                               |

Leyenda:

X+: elevada intensidad del color

Ejemplo 22

La composición para el cultivo de especies fúngicas se muestra en la tabla 32.

- 5 El pH de la composición se estableció en 6,6.

Como resultado de estos ensayos se obtuvo una diferenciación muy marcada de las especies fúngicas de interés clínico, específicamente con las variantes 90 y 93 se obtuvieron intensidades de las reacciones cromáticas mucho más intensas que todas las anteriormente descritas y que las observadas en medios cromogénicos existentes.

- 10 Tabla 32. Medio nutritivo para ensayar la adición de maltosa y trehalosa en presencia de glicerol

| Componentes           | g/L      | 89   | 90   | 91   | 92   | 93   |
|-----------------------|----------|------|------|------|------|------|
| Extracto de boniato   | variable | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 20,0 |
| Extracto de levadura  | 10,0     | X    | X    | X    | X    | X    |
| Fosfato monopotásico  | 1,0      | X    | X    | X    | X    | X    |
| Sulfato de magnesio   | 0,5      | X    | X    | X    | X    | X    |
| Desoxicolato de sodio | 0,5      | X    | X    | X    | X    | X    |
| Glicerol              | 10 (mL)  | X    | X    | X    | X    | X    |
| Trehalosa             | 10,0     | X    |      |      |      |      |
| Maltosa               | 10,0     |      | X    |      |      |      |
| Ácido nalidíxico      | 0,03     | X    | X    | X    | X    | X    |
| Agar                  | 15,0     | X    | X    | X    | X    | X    |
| X-β-D-glucosaminida   | 0,1      | X    | X    | X    | X    | X    |
| SalmonTM-β-D-glc      | 0,1      | X    | X    | X    | X    | X    |
| X-phos-inositol       | 0,1      |      |      |      | X    |      |

- 15 En particular *Candida albicans*, en presencia de trehalosa o maltosa combinadas con glicerol, mostró, de manera no esperada, un color azul verdoso o verde (para la variante 90) muy bien diferenciable del resto de las especies; *Candida tropicalis* resultó de color azul violáceo intenso y, sin embargo, en las variantes 91 y en la 92 resultaron rosas-azuladas. *Candida kefyr* presentó en todas las variantes una coloración rosada, mientras *Candida parapsilosis*, en las variantes 89, 90 y 91 resultaron blancas y en la 92 tomó una coloración azul pálida. *Candida krusei* y *Candida glabrata* resultaron blancas y se identifican por la opacidad o brillantez como ya se describió en los ejemplos anteriores.

- 20 El aumento al doble de la concentración del extracto de boniato favoreció la intensidad de la reacción cromogénica de *Candida albicans* y *Candida tropicalis* y de manera general la morfología (tamaño) de las colonias de todas las especies.

## REIVINDICACIONES

1. Medio nutritivo para el cultivo de levaduras caracterizado por contener una mezcla de extracto de boniato con extracto de levadura o de tomate, agar y sustancias que propician la identificación de las diferentes especies de *Candida* seleccionadas entre los sustratos cromogénicos y fluorogénicos, indicadores o colorantes, fuentes de carbono y sales orgánicas e inorgánicas que se encuentran en el medio nutritivo seleccionadas entre el 5-Bromo-4-Cloro-3-Indoxil-Mio-Inositol-Fosfato, el Metil-umbeliferil-alfa-D-glucopiranosido, el 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-N-acetil-β-D-glucopiranosido, el 6-Cloro-3-Indoxil-β-D-glucopiranosido, la 4-Metilumbeliferil-N-acetil-β-D-galactosaminida, la 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-N-acetil-beta-D-glucosaminida, L-prolina-7-amido-4-metil-coumarina hidrobromuro, L-prolina paranitroanilida, púrpura de bromocresol, azul de bromotimol, leche descremada, glicerol y sulfato de magnesio.
2. Medio nutritivo para el cultivo de levaduras según la reivindicación 1 caracterizado por contener una mezcla de extracto de boniato con extracto de levadura o de tomate, en cantidad de 20 a 30 g/L, encontrándose el extracto de boniato en cantidad de 50 a 67 % con respecto a la masa de la mezcla, de 13 a 15 g/L de agar y las sustancias que propician la identificación de las diferentes especies de *Candida* seleccionadas entre los sustratos cromogénicos y fluorogénicos, indicadores o colorantes, fuentes de carbono y sales orgánicas e inorgánicas que se encuentran en el medio nutritivo en cantidad de 0 a 26 g/L, preferiblemente el 5-Bromo-4-Cloro-3-Indoxil-Mio-Inositol-Fosfato, en cantidades de 0 a 0,1 g/L, el Metil-umbeliferil-alfa-D-glucopiranosido de 0 a 0,1 g/L, el 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-N-acetil-β-D-glucopiranosido de 0 a 0,1 g/L, el 6-Cloro-3-Indoxil-β-D-glucopiranosido de 0 a 0,1 g/L, la 4-Metilumbeliferil-N-acetil-β-D-galactosaminida de 0 a 0,15 g/L, la 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-N-acetil-beta-D-glucosaminida de 0 a 0,1 g/L, L-prolina-7-amido-4-metil-coumarina hidrobromuro de 0 a 0,5 g/L, L-prolina paranitroanilida de 0 a 0,2 g/L, púrpura de bromocresol de 0 a 0,04 g/L, azul de bromotimol de 0 a 0,08 g/L, leche descremada de 0 a 5 g/L, glicerol de 0 a 25 g (mL)/L y sulfato de magnesio de 0 a 0,5 g/L.
3. Medio nutritivo según la reivindicación 1 y 2, caracterizado porque contiene una combinación de potenciadores de la reacción cromogénica consistente en maltosa o trehalosa.
4. Medio nutritivo según la reivindicación 3, caracterizado porque la maltosa o trehalosa se encuentra en cantidades de 1 g por cada g (mL) de glicerol.
5. Medio nutritivo según reivindicaciones de la 1-4, caracterizado porque contiene sustancias que aportan nitrógeno, específicamente aquellas seleccionadas entre la glicina, peptona bacteriológica e hidrolizado enzimático de caseína.
6. Medio nutritivo según reivindicación 5, caracterizado porque las sustancias que aportan nitrógeno, se encuentran en cantidades de 0 a 13 g/L, específicamente la glicina a concentración de 0 a 3 g/L, peptona bacteriológica de 0 a 5 g/L e hidrolizado enzimático de caseína de 0 a 5 g/L.
7. Medio nutritivo según reivindicaciones de la 1 a la 6, caracterizado porque contiene inhibidores de las bacterias que son preferiblemente seleccionados entre el ácido nalidíxico, la rosa bengala, el desoxicolato de sodio, sulfito de sodio, el citrato de amonio y bismuto y el cloruro de tetrafeniltetrazolio.
8. Medio nutritivo según la reivindicación 7, caracterizado porque los inhibidores de las bacterias se encuentran en una cantidad de 0 a 10 g/L y más específicamente el ácido nalidíxico, se adiciona en cantidad de 0 a 0,05 g/L, la rosa bengala, en cantidad de 0 a 0,05 g/L, el desoxicolato de sodio de 0 a 0,5 g/L, sulfito de sodio de 0 a 3 g/L, el citrato de amonio y bismuto de 0 a 5 g/L y el cloruro de tetrafeniltetrazolio de 0 a 0,05 g/L.
9. Medio nutritivo según las reivindicaciones de 1 a 8, caracterizado porque contiene sustancias reguladoras del pH y activadores enzimáticos, en cantidades de 0 hasta 6 g/L, preferiblemente el fosfato monopotásico, el fosfato dipotásico y el 3-Morpholino-propansulfonsaure.
10. Medio nutritivo según las reivindicación 9, caracterizado porque el fosfato monopotásico se encuentra en una cantidad de 0 a 1 g/L, el fosfato dipotásico de 0 a 4 g/L y el 3-Morpholino-propansulfonsaure (ácido 3-morpholino-propano sulfónico), también conocido MOPS, de 0 a 0,5 g/L.
11. Medio nutritivo según las reivindicaciones de 1 a la 10, caracterizado porque la totalidad de los ingredientes a utilizar, se añaden en cantidad de 35 a 50 g en 1 litro de agua destilada o desionizada con un valor de pH de 5 a 7.
12. Medio nutritivo según la reivindicación 11, caracterizado porque el pH se ajusta a valores entre 6,0 y 6,8.