



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 534**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06793015 .6**

96 Fecha de presentación : **25.08.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1931796**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.06.2008**

54 Título: **Detección de las salmonelas lactosa<sup>+</sup>**.

30 Prioridad: **26.08.2005 FR 05 08770**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.05.2011**

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

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

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 358 534 T3

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

## DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a un medio de detección y/o de identificación de salmonelas.

La detección y la identificación de la bacteria *Salmonella*, patógena para el ser humano, es un problema importante de la bacteriología médica y de la vigilancia de la higiene agro-alimentaria.

5 Esta bacteria es responsable en particular en el ser humano de la fiebre tifoidea y de intoxicaciones alimenticias.

10 En el caso de epidemias transmitidas por la cría de gallinas, las aves de corral infestadas a nivel del tracto intestinal no están enfermas pero constituyen una reserva de salmonelas. Éstas se pueden propagar a continuación, en particular por los huevos, en la alimentación. Por otra parte, *Salmonella* es una bacteria de declaración obligatoria.

Por lo tanto, es necesario prever la realización a gran escala de la detección de los sitios infectados y más particularmente de las granjas infectadas por las salmonelas para reducir estas epidemias y limitar las contaminaciones.

15 La detección de las salmonelas se realiza habitualmente sobre un medio de gelosa de aislamiento selectivo para enterobacterias que permite la diferenciación de las enterobacterias patógenas y la detección de las colonias sospechosas de tener salmonelas. Un medio de detección y/o de identificación ideal debe permitir el crecimiento de enterobacterias, la diferenciación de las diversas especies presentes con el fin de permitir la identificación ulterior de una colonia de cada tipo, y la detección de las colonias sospechosas de tener salmonelas.

20 Más particularmente, es importante detectar las salmonelas, que en su mayoría son lactosa<sup>-</sup>, y es importante asimismo poder detectar las cepas de salmonelas lactosa<sup>+</sup> que, representando al mismo tiempo un porcentaje bajo de las cepas totales de salmonelas encontradas, en particular en la industria agro-alimentaria, son identificadas muy frecuentemente, de manera errónea, como *Escherichia coli* y dan por lo tanto lugar a unos falsos positivos.

25 En efecto, se ha considerado durante mucho tiempo que la fermentación en presencia de lactosa permitía diferenciar las bacterias *Salmonella* de las demás *Enterobacteriaceae*. En efecto, se conocía desde hace mucho tiempo que *Escherichia coli* presentaba el carácter lactosa<sup>+</sup> mientras que las salmonelas presentaban el carácter lactosa<sup>-</sup>. El descubrimiento de cepas de salmonelas lactosa<sup>+</sup> ha demostrado por lo tanto la falta de fiabilidad de los ensayos basados en el carácter lactosa de las enterobacterias y ha demostrado la importancia de la detección de salmonelas lactosa<sup>+</sup>.

30 El objetivo de la presente invención es permitir realizar unos ensayos de rutina para la detección y la identificación de las salmonelas, por ejemplo unos métodos de observación de la calidad microbiológica del agua, mediante unos métodos de remojo, o la vigilancia de la calidad microbiológica de las fábricas agro-alimentarias mediante unos métodos de contacto, el diagnóstico, o también la búsqueda de microorganismos patógenos mediante los métodos microbiológicos tradicionales en caja de Petri, en medio sólido o en medio selectivo semi-sólido, con la ayuda de medios de acuerdo con la invención.

35 El objetivo de la presente invención es aumentar la sensibilidad y la selectividad de la detección y de la diferenciación de las salmonelas en una muestra contaminada por medio de un medio de cultivo que, permitiendo al mismo tiempo la demostración de la actividad esterasa propia de estas bacterias, permite una diferenciación aumentada de las salmonelas entre las demás enterobacterias, incluyendo las salmonelas lactosa<sup>+</sup>.

40 El experto en la materia conoce ya los medios de cultivo destinados a poner de manifiesto las salmonelas por medio de agentes cromógenos (patente FR 2 197 028, de Rambach) pero, aunque este tipo de medio permite diferenciar las salmonelas de las demás enterobacterias, no distingue obligatoriamente las salmonelas lactosa<sup>+</sup>.

Los medios de la técnica anterior se basan de hecho generalmente en el carácter lactosa<sup>-</sup> o beta-galactosidasa<sup>-</sup> de las salmonelas.

45 El medio de detección y/o de identificación de las salmonelas de la presente invención comprende un cromógeno unido al caprilato o uno de sus derivados, sustrato de las esterases, que se liberará en el medio bajo la acción de estas enzimas que permiten así la identificación de las colonias de salmonelas.

50 Sin embargo, con el fin de aumentar la selectividad y la sensibilidad del medio de la invención que permite entonces la detección de las salmonelas lactosa<sup>+</sup>, dicho medio comprende asimismo un detergente de la familia de los nonilfenol-etoxilatos.

Se ha descubierto de manera inesperada, que la adición de dicho detergente al medio de la invención, a una concentración apropiada y compatible con un buen crecimiento de las salmonelas, permitía no sólo la detección más fácil de las colonias de salmonelas sino también la detección de las salmonelas lactosa<sup>+</sup>.

Entre los nonilfenol-etoxilatos que se pueden utilizar en el marco de la presente invención, se pueden citar particularmente los Tergitol® NP (comercializados por The Dow Chemical Company) y en particular el Tergitol® NP-7 y el Tergitol® NP-9 asimismo denominado Igepal® CO-630 o Triton® N-60. Se trata del  $\alpha$ -(nonilfenil)- $\omega$ -hidroxipoli(oxi-1,2-etanodilo).

5 De manera preferida, el detergente apropiado se utilizará a una concentración comprendida entre 0,5 y 2,5 g/l, preferentemente entre 1 y 2 g/l y más preferentemente todavía entre 1,3 y 1,7 g/l.

10 Según un modo de realización preferido de la invención, el compuesto cromógeno es un éster del ácido caprílico, ventajosamente seleccionado de entre el grupo constituido por los derivados indolilo caprilato y los derivados hidroxiquinolona caprilato así como sus sales. Entre estos derivados, se pueden citar más particularmente los derivados halógeno-indolil-caprilato (bromo-indolil-caprilato, cloro-indolil-caprilato, fluoro-indolil-caprilato, yodo-indolil-caprilato, dicloro-indolil-caprilato, cloro-bromo-indolil-caprilato, tri-cloro-indolil-caprilato), y los derivados metil-indoxil-caprilato.

15 Más particularmente todavía, el éster del ácido caprílico se selecciona de entre el grupo constituido por los derivados 6-cloro-indolil-caprilato, 5-bromo-indolil-caprilato, 3-bromo-indolil-caprilato, 6-fluoro-indolil-caprilato, 5-yodo-indolil-caprilato, 4,6-dicloro-indolil-caprilato, 6,7-dicloro-indolil-caprilato, 5-bromo-4-cloro-indolil-caprilato, 5-bromo-6-cloro-indolil-caprilato, 4,6,7-tricloro-indolil-caprilato, N-metil-indolil-caprilato, y 8-hidroxiquinolona-caprilato.

El cromógeno se utiliza, de manera preferida, a una concentración comprendida entre 0,1 a 0,4 g/l, preferentemente entre 0,15 a 0,3 g/l.

20 El experto en la materia tiene los conocimientos para completar el medio de la invención con el objetivo de eliminar las bacterias distintas de las salmonelas, por ejemplo mediante la puesta de manifiesto, en estas otras bacterias, de caracteres ausentes en las salmonelas que son en particular beta-glucosidasas. Por consiguiente, el medio de la invención podrá comprender asimismo unos derivados de beta-glucósido unidos a un cromóforo diferente del utilizado para la puesta de manifiesto de las salmonelas.

25 El medio de la presente invención permite por lo tanto detectar e identificar una colonia coloreada de *Salmonella*, de manera aumentada, incluso en presencia de millares de otras colonias, sobre un medio sólido o semi-sólido. De hecho, las colonias de salmonelas detectadas mediante el medio de la invención están coloreadas con un cierto color mientras que los demás microorganismos aparecen con colores diferentes o son incoloros.

30 La detección de las colonias de salmonelas en el marco de la presente invención es directa en el sentido de que no necesita ningún acto o intervención ulterior a la fermentación de las colonias tal como la utilización de un revelador cualquiera o el de una luz particular.

La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento de detección y/o de identificación de salmonelas en una extracción o en una muestra cualquiera que comprende la inoculación del medio de cultivo de la invención con la muestra o la extracción a ensayar y la puesta en evidencia de la coloración característica de la presencia de colonias de salmonelas.

35 En función de la forma y de la presentación del medio y en función del tipo de protección efectuada, la inoculación se realizará preferentemente por contacto, por remojado, en superficie o en la masa.

El ejemplo siguiente está destinado a ilustrar la presente invención y no puede ser de ninguna manera considerado como limitativo.

#### **EJEMPLO: Detección de salmonelas**

40 I. Según una primera serie de experimentos: varios medios han sido ensayados para la detección y la diferenciación de *E. coli* (componente principal de la flora comensal de las muestras en las que se busca la presencia de salmonelas) y de *Salmonella* (en particular *Salmonella lactosa*<sup>+</sup>).

Cada uno de dichos medios está constituido por la misma base a la que se añaden otros componentes tal como se indica a continuación.

45 Base (g/l):

Extracto de carne o levadura 3

Peptona 5

Cloruro de sodio 5

Agar 15

50 5-bromo-6-cloro-3-indolil-caprilato 0,2

5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-glucósido 0,1

Medio A (g/l):

Base

+ desoxicolato de sodio 2,5

5

Medio B (g/l):

Base

+ desoxicolato de sodio 1,5

+ desoxicolato de Tritón XL-80N 1,5

Medio C de la invención (g/l):

10

Base

+ desoxicolato de sodio 1,5

+ desoxicolato de Tergitol NP-9 1,5

Medio	A	B	C
<i>Salmonella</i> spp	+	+	++
<i>Salmonella lactosa</i> positiva	+	+	++
<i>E. coli</i>	+	+	incolore

"+" representa la intensidad de la coloración malva obtenida.

15

Sólo el medio de la invención (C) permite distinguir las *Salmonella* spp y las *Salmonella lactosa*<sup>+</sup> de los *E. coli*.

II. Otro experimento consistió en comparar dicho medio C de la invención con el medio XLT4 (Xilosa-Lisina-Tergitol (Niaproof)4) para la detección de *Salmonella*, incluyendo unas cepas lactosa<sup>+</sup>.

Medio	XLT4	C
<i>Salmonella</i> spp (ATCC 35640)	+	+
<i>Salmonella senftenberg lactosa</i> <sup>-</sup> (321)	-	+

20

Únicamente el medio de la invención (C) permite detectar todas las cepas de *Salmonella*.

## REIVINDICACIONES

1. Medio de detección y/o de identificación de salmonelas que comprende un sustrato cromógeno de la caprilato esterasa o una de sus sales, y un detergente de la familia de los nonilfenoles-etoxilatos.

2. Medio según la reivindicación 1, caracterizado porque el sustrato cromógeno de la caprilato esterasa es un éster del ácido caprílico.

3. Medio según la reivindicación 2, caracterizado porque el éster del ácido caprílico se selecciona de entre los derivados indolil-caprilato y los derivados hidroxiquinolin-caprilato.

4. Medio según la reivindicación 3, caracterizado porque el éster del ácido caprílico se selecciona de entre el grupo constituido por los derivados halógeno-indolil-caprilato (bromo-indolil-caprilato, cloro-indolil-caprilato, fluoro-indolil-caprilato, yodo-indolil-caprilato, dicloro-indolil-caprilato, cloro-bromo-indolil-caprilato, tri-cloro-indolil-caprilato), y los derivados metil-indoxil-caprilato.

5. Medio según la reivindicación 3 ó 4, caracterizado porque el éster del ácido caprílico se selecciona de entre el grupo constituido por los derivados 6-cloro-indolil-caprilato, 5-bromo-indolil-caprilato, 3-bromo-indolil-caprilato, 6-fluoro-indolil-caprilato, 5-yodo-indolil-caprilato, 4,6-dicloro-indolil-caprilato, 6,7-dicloro-indolil-caprilato, 5-bromo-4-cloro-indolil-caprilato, 5-bromo-6-cloro-indolil-caprilato, 4,6,7-tricloro-indolil-caprilato, N-metil-indolil-caprilato, y 8-hidroxiquinolin-caprilato.

6. Medio según la reivindicación 5, caracterizado porque el derivado indolil-caprilato es el 5-bromo-6-cloro-3-indolil-caprilato.

7. Medio según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el detergente es el  $\alpha$ -(nonilfenil)- $\omega$ -hidroxipoli(oxi-1,2-etanodiilo).

8. Medio según la reivindicación 7, caracterizado porque el  $\alpha$ -(nonilfenil)- $\omega$ -hidroxipoli(oxi-1,2-etanodiilo) está presente en dicho medio a una concentración comprendida entre 0,5 y 2,5 g/l, preferentemente entre 1 y 2 g/l y más preferentemente todavía entre 1,3 y 1,7 g/l.

9. Procedimiento de detección y/o de identificación de salmonelas en una muestra que comprende las etapas siguientes:

- inocular un medio según una de las reivindicaciones 1 a 8 con dicha muestra, y
- poner en evidencia la coloración característica de la presencia de las salmonelas.