



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 323**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01965483 .9**

96 Fecha de presentación : **17.09.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1325024**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.07.2003**

54 Título: **Medio de crecimiento selectivo.**

30 Prioridad: **18.09.2000 EP 00308139**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.09.2011

73 Titular/es: **THE NEWCASTLE UPON TYNE
HOSPITALS NATIONAL HEALTH SERVICE TRUST
Freeman Road, High Heaton
Newcastle-Upon-Tyne, NE7 7DN, GB**

72 Inventor/es: **Perry, John, David**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 365 323 T3

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

DESCRIPCIÓN

Medio de crecimiento selectivo.

5 Esta invención se refiere a medios que ayudan al crecimiento de algunos microbios, pero que se diseñan para inhibir el crecimiento de otros tipos de microbios para el cultivo de microbios en una muestra que contiene una mezcla de distintas especies. Dichos medios se llaman medios selectivos. Esta invención comprende un nuevo tipo de medio selectivo. La realización preferida proporciona un medio selectivo con la detección de especies *Salmonella*, permitiendo que las especies de *Salmonella* sobrevivan y crezcan e inhibiendo el crecimiento de muchas otras bacterias comensales.

10 Los laboratorios diagnósticos de microbiología se basan prácticamente en medios de cultivo para el crecimiento de patógenos bacterianos a fin de diagnosticar enfermedades o descubrir bacterias en productos comerciales, tales como productos alimenticios. Estos medios contienen generalmente mezclas no específicas de proteínas ('peptonas') que ayudan al crecimiento bacteriano y pueden emplear agar-agar como agente de solidificación. Una serie enorme de medios está disponible y pueden abarcar desde medios con objetivos generales para el crecimiento de tantas especies como sea posible a medios diseñados para la detección específica de ciertos patógenos. Los
15 medios para patógenos específicos se denominan generalmente agar-agar 'selectivos' con los cuales generalmente se intenta inhibir el crecimiento de bacterias no relacionadas. Se ha empleado una amplia variedad de ingredientes selectivos en los medios incluyendo los antibióticos y diversos productos químicos, tales como sales de bilis y cloruro de sodio.

20 La mayor parte de los medios son tradicionalmente no específicos y permiten el crecimiento de una amplia variedad de bacterias. Hace falta mucho trabajo entonces para identificar a los patógenos potenciales a partir de una gran cantidad de flora bacteriana. En los últimos años ha habido un cambio hacia el uso de medios cromogénicos que contienen sustratos enzimáticos. Una amplia variedad de dichos medios está disponible y se pueden usar específicamente medios diferentes para reconocer a diferentes patógenos bacterianos. La característica clave de los
25 medios cromogénicos es que el patógeno diana segrega un sustrato enzimático presente en el agar-agar produciendo un producto de color que permanece localizado dentro de la colonia bacteriana. Esto permite la diferenciación de patógenos, apareciendo un cierto color, en microorganismos comensales que en principio son incoloros o que aparecen con otro color. Dichos medios pueden ser bastante sofisticados y pueden incluir un cóctel de sustratos enzimáticos y otros cofactores.

30 Los medios cromogénicos tienen la ventaja de que son muy específicos para la detección de ciertos patógenos. Como estos patógenos generan un cierto color, se pueden diferenciar fácilmente de las bacterias comensales evitando así la necesidad de pruebas laboriosas en las colonias sospechosas. A pesar de su especificidad y de su facilidad de uso, muchos medios cromogénicos todavía permiten el crecimiento de una amplia variedad de bacterias comensales. Por lo tanto aún es necesario recuperar las colonias bacterianas sospechosas de cultivos de las otras
35 floras. En microbiología diagnóstica, un desafío principal por lo tanto es diseñar medios de cultivo que empleen métodos de detección específicos combinados con una selectividad verdadera respecto a la flora comensal.

Los expertos en la técnica conocen diversos tipos de medios selectivos. Unos han sido diseñados para la detección de *Salmonella*, incluyendo los medios agar-agar Rambach, agar-agar SM-ID y ABC. En cada caso tiene una importancia intrínseca para el funcionamiento de estos tres medios que las bacterias comensales hidrolicen el sustrato β -galactosidasa para generar un producto de color intenso. En comparación, las colonias de *Salmonella* en
40 cada uno de estos tres medios producen colonias que son de un color más claro debido a una reacción bioquímica secundaria. Una desventaja de los medios selectivos cromogénicos es otra posibilidad de que las colonias sospechosas puedan volverse 'sepultadas' o que crezcan demasiado por colonias de bacterias comensales si el número de bacterias patógenas (especies diana que se detectan) en una muestra es relativamente bajo comparado con la cantidad de las otras bacterias. Este problema se exagera en los ejemplos, tales como los medios
45 anteriormente mencionados donde las bacterias comensales producen colonias que son muy oscuras y los patógenos dianas producen colonias que son de colores claros.

Hay pruebas para sugerir que un enfoque basado en el sistema cromogénico anteriormente mencionado no es ideal para la recuperación óptima de la *Salmonella*. Por ejemplo, Dusch H. & Altwegg M (*J Clin Microbiol*, **993**; 31 de febrero, (2):410-2) realizaron una comparación del agar-agar Rambach, agar-agar SM-ID y medio tradicional (Entérico Hektoen) para el aislamiento primario de *Salmonella* no typhi a partir de muestras de materia fecal. Concluyeron que, aunque los dos medios cromogénicos fueran muy específicos, dadas las pobres sensibilidades, los agar-agar Rambach y SM-ID no podían ser recomendados como medios de preparación de cultivos en placas
50 primarias que seleccionan la *Salmonella* no typhi.

Los inventores realizaron un estudio para examinar además la selectividad de algunos agar-agar de *Salmonella* diferentes, es decir, examinaron su capacidad de inhibir cultivos bacterianos comensales comunes encontrados en muestras de materia fecal. Se compraron seis agar-agar de sus proveedores respectivos y se prepararon según las instrucciones exactas del fabricante. Éstos incluyeron los medios agar-agar Rambach (RAM), agar-agar SM-ID, cromagar *Salmonella* (CS), agar-agar xilosa lisina descarboxilasa (XLD), agar-agar entérico Hektoen (HEK) y ABC. Un total de 433 cepas bacterianas aeróbicas Gram negativo fueron inoculadas en cada uno de estos agar-agar en

un inóculo de 10 unidades formadoras de colonia por ml. Esta colección comprendía 61 cepas de Salmonella y 372 cepas que no eran Salmonella. Aunque todos los medios eran eficientes en promover el crecimiento de la Salmonella, la mayoría fue muy ineficaz en la inhibición del crecimiento de las bacterias que no eran Salmonella. Esto se ejemplificó examinando la capacidad de diferentes medios de inhibir el crecimiento de especies comensales de *E. coli* más comunes presentes en los excrementos. De las 108 cepas probadas, más del 95 % de las cepas creció en los cuatro agar-agar cromogénicos probados: medio SM-ID, Rambach, ABC y Salmonella Cromagar.

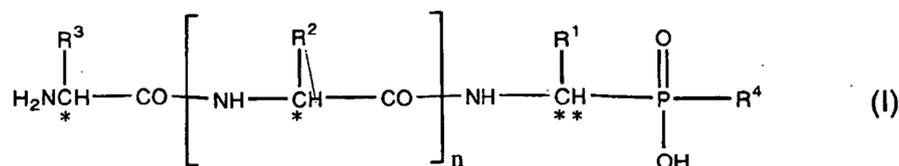
Está claro a partir de este ejemplo que hasta entre los sofisticados medios cromogénicos modernos, hay poca selectividad respecto a los cultivos bacterianos comensales encontrados frecuentemente. A menudo se afirma que dichos medios tienen una alta sensibilidad y una especificidad alta. Son sensibles porque ayudarán al crecimiento de una amplia variedad de cepas de Salmonella y pueden ser específicos porque muy pocas cepas que no son de Salmonella producen colonias de colores que tienen las características de la Salmonella. Sin embargo, en términos de la variedad de especies que crecen en estos medios, éstos están lejos de ser específicos y como ya se ha mencionado esto probablemente sería problemático si un pequeño número de bacterias de Salmonella tiene que ser recuperado de una cantidad grande de una flora comensal.

Park *et al.*, en *Can. J. Microbiol.* 1976, 22, 654-657, han descrito un medio de cultivo selectivo que contiene un derivado de β -galactosidasa (CPPG) para aislar especies de Shigella o Salmonella de muestras que contienen *E. coli*. El derivado es secretado por la β -galactosidasa de *E. coli* formando un compuesto citotóxico pero las especies de Shigella no tenían dicha actividad enzimática y crecieron selectivamente.

En el documento WO96/30543 se describe un medio de cultivo para la detección de la Salmonella que comprende un sustrato cromogénico para especies positivas a β -galactosidasa de *Enterobacteriaceae* (tales como *E. coli*) y una mezcla de azúcares que son metabolizados por *Salmonella* para formar ácidos y un indicador de pH para detectar la formación de ácidos. Se incluyen sales de bilis para enriquecer selectivamente especies Gram positivo (tales como la Salmonella).

Miller *et al.* en *Poultry Science*, 1991, 70, 2429-32, describen la incorporación de tergitol para el enriquecimiento selectivo de la Salmonella spp. como una mejora para la novobiocina biocida en medios en los que se detecta Salmonella mediante el uso de estos indicadores, tiosulfato de sodio y citrato de amonio férrico.

Desde hace mucho tiempo hay disponibles agentes antibióticos para los expertos en la técnica y se utiliza una amplia variedad. Un grupo de agentes antibióticos se basa en los ácidos α -amino fosfónicos. Estos compuestos ácidos α -amino fosfónicos son: derivados de aminoacilo y peptidilo de ácidos 1-aminoalquil-fosfónicos, por ejemplo con la fórmula I general:



en la que R^1 es hidrógeno, alquilo inferior, cicloalquilo inferior, (cicloalquilo inferior) - (alquilo inferior), arilo o aril- (alquilo inferior) estando dichos sustituyentes diferentes a hidrógeno opcionalmente sustituidos por uno o varios de amino, hidroxilo, tio, metililo, carboxilo o guanidino para formar el grupo característico de un L α -aminoácido natural; y R^2 y R^3 cada uno representan el grupo característico de un aminoácido alfa del tipo encontrado normalmente en proteínas con la condición de que R^3 no puede ser hidrógeno cuando n es cero y R^1 es hidrógeno o fenilo; R^4 es hidroxilo o metilo; n es cero, 1, 2 o 3; los asteriscos sencillos significan que la configuración en el átomo de carbono así marcado es L; y el doble asterisco significa que, cuando R^1 es otro distinto al hidrógeno, la configuración en el átomo de carbono así marcado es tal que sería obtenido sustituyendo el grupo carboxilo de un L α -aminoácido natural por un resto fósforo [de aquí en adelante denominada la configuración (R)] y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos más estudiados están basados en el compuesto fosfalina (ácido 1-aminoetil-fosfónico). Estos compuestos son descritos en los documentos de EE.UU. 4 016 148, 4 331 591 y Atherton F.R *et al.* (1985) *Am. Chem. Soc.* 29, 29-40. Atherton *et al.* explican la base para la actividad antibiótica de los compuestos ácido N-aminoacil- y N-peptidil- α -amino fosfónico como dependiente del transporte en la célula bacteriana y la posterior capacidad de que las enzimas intracelulares hidrolicen el compuesto para soltar el compuesto inhibitorio del ácido α -amino alquil fosfónico. Se dan concentraciones inhibitorias mínimas (CMI) relativas para varias especies bacterianas, incluyendo *E. coli*.

En *J. Bacteriol.* 1984, 160 (1), 122-130 Gibson investiga a mutantes de *Salmonella typhimurium* con un sistema de permeasa defectuoso de tripéptidos usando alafosfalina. Los mutantes con el sistema defectuoso son resistentes a la alafosfalina y se supone que es porque el compuesto no puede ser transportado a través de la membrana celular.

Los autores indican que la alafosfalina es inactiva frente a muchas cepas de bacterias debido a la alta frecuencia de las cepas resistentes.

Debido a los problemas encontrados con los medios selectivos actualmente disponibles, esta invención proporciona un enfoque único respecto al diseño de medios de cultivo y al aislamiento de bacterias diana. Este implica el uso de sustratos enzimáticos que, cuando se utilizan por bacterias comensales, causan la inhibición del crecimiento de las bacterias. Este enfoque nunca se ha usado antes en el campo de la bacteriología diagnóstica y es considerablemente diferente a los enfoques tradicionales respecto a la selectividad. A fin de que las bacterias sean susceptibles de ser inhibidas deben (i) captar el sustrato enzimático en la célula, (ii) modificar químicamente el sustrato mediante una enzima u otro proceso metabólico formándose así un agente antibacteriano e (iii) inhibir el proceso metabólico mediante el agente antibacteriano. A la inversa, las bacterias diana pueden sobrevivir con la presencia del sustrato porque (i) no captan el sustrato a una velocidad suficiente, (ii) son incapaces de metabolizar el sustrato o (iii) son intrínsecamente resistentes a cualquier producto del metabolismo del sustrato.

Este enfoque permite el diseño de agentes antibacterianos selectivos según las propiedades metabólicas de las bacterias diana y comensales. Por ejemplo, se propone que las bacterias puedan ser selectivamente inhibidas según sea la posesión de una enzima sencilla que sea capaz de generar un producto tóxico. Este enfoque es único para el diseño de medios de cultivo bacterianos. Aunque los sustratos enzimáticos se usan ampliamente en los medios de cultivo para revelar reacciones cromogénicas con dianas de la diferenciación, no hay ninguna prueba de que se hayan usado alguna vez sustratos enzimáticos para la inhibición selectiva de cepas bacterianas en medios de cultivo.

Según la invención, se proporciona un método para cultivar bacterias y detectar una especie diana de bacteria según se define en la reivindicación 1.

Preferiblemente el medio de crecimiento es un medio selectivo, es decir, contiene otros componentes que promueven el crecimiento y/o la división de especies *Salmonella* diana y/o inhiben el crecimiento y/o la división de especies comensales.

La muestra puede ser una muestra biológica directa, por ejemplo, excrementos, orina o sangre. O bien, la muestra biológica directa puede someterse a uno o varios ciclos de incubación en medios de crecimiento selectivos para formar la muestra usada en el método de la invención.

Esta invención también proporciona una composición para preparar un medio de crecimiento bacteriano según se define en la reivindicación 12.

Preferiblemente, la composición está seca y es adecuada para su dilución para formar un medio de crecimiento, por ejemplo un medio sólido (tipo gel), con agua. Preferiblemente, el medio es un medio selectivo que protege las bacterias y la composición de la invención a partir de la cual tal medio puede ser generado comprende compuestos selectivos que permiten que las bacterias diana crezcan inhibiendo el crecimiento de otras bacterias comensales. La presencia del pro-inhibidor causa la inhibición del crecimiento después del consumo en virtud del hecho de que el pro-inhibidor se modifica químicamente mediante una enzima u otro proceso metabólico, soltando así la toxina antibacteriana. El inhibidor afecta a su toxicidad por la inhibición de un proceso metabólico. Los inventores han llamado pro-inhibidor a "un sustrato suicida". Las bacterias diana (*Salmonella*) deberían sobrevivir sustancialmente en presencia del sustrato suicida. La supervivencia puede ser debida a la incapacidad de las especies diana de transportar el pro-inhibidor en sus células, o, una vez dentro de las células, a la incapacidad de procesar el pro-inhibidor en el inhibidor activo.

El pro-inhibidor está presente preferiblemente en el medio de crecimiento en una concentración en el intervalo de 0,5 a 20 mg l⁻¹. Preferiblemente al menos 0,75 mg l⁻¹ y no más de 10 mg l⁻¹, por ejemplo aproximadamente 1 mg l⁻¹.

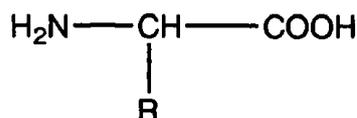
La composición de la invención contiene un sistema de detección complementario para permitir la diferenciación entre las especies *Salmonella* diana y cualquier otra bacteria comensal superviviente. El sistema de detección complementario es un indicador del sustrato de la enzima cromogénica que hace que las colonias bacterianas dianas parezcan visualmente distintas de las colonias bacterianas comensales. El medio puede contener dos o más de dichos sustratos. En esta memoria descriptiva, el término cromogénico incluye fluorogénico.

La composición usada para producir el medio selectivo comprende preferiblemente nutrientes suficientes para ayudar al crecimiento bacteriano y sustancias que actúan como factores de crecimiento (promotores del crecimiento) para las especies de *Salmonella* diana. La composición que se usa para producir el medio selectivo puede producir un medio selectivo sólido o líquido, por lo general con la adición de agua sola, o de forma alternativa agua y también ayudar con un compuesto, tal como agar-agar, y/u otros nutrientes, promotores del crecimiento, inhibidores del crecimiento, etc.

El pro-inhibidor, es decir, el sustrato suicida, del medio selectivo es un derivado de oligo-peptidilo o amino-acilo de una molécula antibacteriana. El medio selectivo debe estar preferiblemente libre de péptidos que podrían antagonizar el uso de dichos derivados peptídicos o amino-acílicos de los agentes antibacterianos, por ejemplo compitiendo con sistemas de transporte o hidrolíticos sobre o en la conversión de las especies diana.

El pro-inhibidor es un compuesto de amino-acilo o de peptidilo, por ejemplo, que es convertido al inhibidor por la hidrólisis del resto amino acilo o peptidilo, según sea el caso. El pro-inhibidor es un derivado de N-aminoacilo o N-peptidilo de un ácido α -amino alquil fosfónico, como se representa por la fórmula I general.

- 5 Según se usa en esta memoria descriptiva, la expresión "alquilo inferior" significa un grupo alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada que contiene preferiblemente de 1 a 6 átomos de carbono (p.ej metilo, etilo, propilo, isobutilo y otros por el estilo). El término "arilo" comprende preferiblemente grupos mononucleares, tales como fenilo, que puede estar sustituido en una o varias posiciones con sustituyentes hidroxilo, halógeno, nitro, alquilo inferior o alcoxi inferior. El término "halógeno" significa flúor, cloro, bromo y yodo y la expresión "alcoxi inferior" significa grupos de la estructura-O-(alquilo inferior) en donde el grupo alquilo inferior es como se define antes. La expresión "grupo característico de un aminoácido alfa del tipo normalmente encontrado en proteínas" se usa para identificar al residuo R en un aminoácido alfa natural de la fórmula general:



- 15 que es del mismo tipo que normalmente se encuentra en las proteínas. Así, por ejemplo, si el aminoácido es alanina, entonces el residuo R representa al grupo metilo, en leucina el residuo R representa al grupo isobutilo y en el ácido glutámico el residuo R representa al grupo 2-carboxietilo. R también puede representar un residuo que esté unido al nitrógeno del amino (con la pérdida de uno de los átomos de hidrógeno unidos a éste), formando así un anillo que contiene el nitrógeno tal como en la prolina y el ácido piroglutámico. La expresión "cicloalquilo inferior" significa grupos hidrocarburos cíclicos que contienen de 3 a 6 átomos de carbono, tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo.

- 20 Se entiende que en fórmula I cuando n vale 2 o 3, el valor de R^2 puede ser el mismo o diferente.

Los compuestos preferidos de la fórmula anteriormente son aquellos en los que R^2 y R^3 son cada uno hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, bencilo y aminobutilo o 2-pirrolidinilo, R^1 es hidrógeno o metilo, R^4 es hidroxilo y n es cero o 1.

Los ejemplos de los compuestos de fórmula I mencionada anteriormente son:

- 25 ácido (L-alanilamino)-metilfosfónico
 ácido (L-valilamino)-metilfosfónico
 ácido (L-leucilamino)-metilfosfónico
 ácido (L-lisilamino)-metilfosfónico
 ácido L-fenilalanilamino)-metilfosfónico
- 30 ácido (1R)-1-(L-alanilamino)-etilfosfónico
 ácido (1R)-1-glicilamino-etilfosfónico
 ácido (1R)-1-(L-alanilamino)-bencilfosfónico
 ácido (1R)-1-(L-lisilamino)-etilfosfónico
 ácido (1R)-1-(L-leucilamino)-etilfosfónico
- 35 ácido (1R)-1-(L-alanilamino)-2-fenil-etilfosfónico
 ácido (1R)-1-(L-fenilalanilamino)-etilfosfónico
 ácido (1R)-1-(L-valilamino)-etilfosfónico
 ácido (L-alanil-L-alanilamino)-metilfosfónico
 ácido (L-leucil-L-alanilamino)-metilfosfónico
- 40 ácido (L-alanil-L-leucilamino)-metilfosfónico
 ácido (L-alanil-L-fenilalanilamino)-metilfosfónico
 ácido (L-fenilalanil-L-fenilalanilamino)-metilfosfónico

ácido (L-fenilalanil-L-alanilamino)-etilfosfónico
 ácido (1R)-1-(glicil-L-alanilamino)-etilfosfónico
 ácido (1R)-1-(L-valil-L-alanilamino)-etilfosfónico
 ácido (1R)-1-(L-fenilalanil-L-alanilamino)-etilfosfónico
 5 ácido (1R)-1-(L-prolil-L-alanilamino)-etilfosfónico
 ácido (L-alanil-L-alanil-L-alanilamino)-etilfosfónico
 ácido (1R)-1-(L-alanil-L-alanil-L-alanilamino)-etilfosfónico
 ácido (1R)-1-(glicil-L-alanil-L-alanilamino)-etilfosfónico
 ácido (1R)-1-(L-prolil-L-alanil-L-alanilamino)-etilfosfónico
 10 ácido (1R)-1-(glicil-glicil-L-alanilamino)-etilfosfónico
 ácido (1R)-1-(L-alanil-L-alanil-L-alanil-L-alanilamino)-etilfosfónico
 y
 ácido [(L-alanilamino) metil]-etilfosfónico.

15 Los ácidos α -amino fosfónicos se pueden sintetizar como se describe en los documentos de EE.UU N^{os}. 4331591 y 4016148 y Atherton *et al.* (*op. cit.*). La alafosfalina está comercialmente disponible.

20 Una realización particularmente preferida del medio selectivo descrito anteriormente usa un derivado de amino acilo de fosfalina (ácido 1-aminoetilfosfónico) como pro-inhibidor. El derivado de peptidilo o amino acilo preferido de fosfalina es la alafosfalina (ácido L-alanil-1-aminoetilfosfónico). La alafosfalina, el sustrato suicida preferido, se puede usar en medios selectivos para seleccionar muestras bacterianas ya que las bacterias diana son especies Salmonella.

En un medio selectivo adecuado para la Salmonella diana, se incluyen preferiblemente factores de crecimiento para especies Salmonella (que pueden ser inhibidores de otras especies Gram-positiva) por ejemplo el desoxicolato de sodio y el citrato de sodio.

25 Los medios selectivos también comprenden uno o varios indicadores de sustrato de enzima cromogénicos. Los sustratos cromogénicos son conocidos y pueden ser seleccionados por la persona experta según las especies diana, especies comensales, el tipo de medios y los sistemas de detección disponibles. Uno de los sustratos puede estar basado en la actividad de β -galactosidasa cuyas bacterias comensales (tal como la *E. coli*) la hidrolizan para generar un producto de colores oscuro mientras que las especies Salmonella producen colonias de un color más claro debido a una reacción bioquímica secundaria.

30 Una realización preferida del sustrato suicida para la incorporación en el medio de cultivo es el sustrato bacteriano conocido por el nombre químico ácido L-alanil-1-aminoetilfosfónico, también conocido como alafosfalina. Este sustrato, y una variedad de compuestos relacionados, según el inventor, han sido propuestos puramente como dianas terapéuticas y han sido probados en pruebas MIC. La alafosfalina es captada por las bacterias a diferentes tasas vía un permeasa estereoespecífica y puede segregarse intracelularmente por la aminopeptidasa bacteriano para dar lugar a la fosfalina (ácido 1-aminoetilfosfónico). Este compuesto liberado interfiere con el metabolismo bacteriano vía la interacción con la enzima alanina racemasa responsable de generar D-alanina. Esta interacción puede causar la inhibición del crecimiento. El grado de consumo del sustrato, el grado de hidrólisis y la sensibilidad de la enzima racemasa son todos los factores que determinarán el grado de inhibición bacteriana por el sustrato. Por consiguiente, por este medio son inhibidas diferentes bacterias a grados diferentes y se relacionan con los sustratos como se describe en una serie de publicaciones producidas por los expertos de Roche y citadas en Atherton *et al.*, *op. cit.* La alafosfalina o los análogos de la fórmula I general inhiben generalmente las bacterias comensales Gram negativo.

45 La actividad inhibitoria de alafosfalina es antagonizada por la presencia de pequeños péptidos y el sustrato es inactivo por lo tanto en medios bacteriológicos normales que están basados en peptonas. La composición y el medio de la presente invención están preferiblemente sustancialmente libres de otros péptidos pequeños.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención.

Ejemplo 1 - Selección

5 Con el fin de investigar la utilidad de la alafosfalina para el aislamiento de la Salmonella los inventores realizaron determinaciones de la concentración inhibitoria mínima (MIC) de alafosfalina para 433 cepas bacterianas aeróbicas Gram negativo. Esto se realizó usando los procedimientos descritos por Atherton *et al.* (*op. cit*). Se encontró que la concentración inhibitoria mínima media (MIC) para 61 cepas de Salmonella no typhi era 10,2 mg/l y todas las cepas mostraron un MIC por encima de 1 mg/l. En contraste, la MIC del medio de alafosfalina frente a 108 cepas de *E. coli* (con muchas más bacterias comensales fecales más comunes) fue 0,7 mg/l. Además, la mayor parte de otras bacterias comensales mostraron una MIC promedio inferior a la Salmonella spp. Estos hallazgos sugirieron que la alafosfalina era un candidato excelente como agente selectivo para el aislamiento de la Salmonella en excrementos.

10 **Ejemplo 2 - Medio**

Los inventores diseñaron un medio modificado para el aislamiento de Salmonella que permitió la acción de alafosfalina, es decir, estaba libre de antagonistas peptídicos. La composición es como sigue:

	g
L-Arginina	0,1
Ácido L-aspártico	0,1
L-cisteína	0,005
Glicina	0,1
L-Histidina	0,1
L-Isoleucina	0,1
L-Leucina	0,1
L-Lisina-HCl	0,1
L-Metionina	0,005
L-Fenilalanina	0,1
L-prolina	0,1
L-Serina	0,1
L-Treonina	0,1
L-Triptófano	0,1
L-Tirosina	0,1
L-Valina	0,1
Guanina	0,01
Uracilo	0,01
Citosina	0,01
Adenina 0.01	
Citrato de sodio	6,5
Sulfato de magnesio	0,1
Sulfato de amonio	1
Extracto de levadura	0,1
Hidrógeno-fosfato de dipotasio	7
Dihidrógeno-fosfato de potasio	2

Citrato de amonio férrico	0,5
5-bromo-4-cloro-3-indolil-alfa-D-galactosida	0,08
3,4-clohexenesculetin-β-D-galactosida	0,3
isopropil-tio-β-D-galactosida	0,03
Agar-agar bacteriológico	10
Agua ionizada	1000 ml

La anterior mezcla se esteriliza a 116 °C durante 10 minutos, se enfría por debajo de 100°C y a la mezcla se añadieron 0,001 g de alafosfalina y 0,5 de desoxicolato de sodio. Después de la preparación, este medio fue vertido en placas petri para su preparación.

5 Los medios XLD y ABC se compraron en el Laboratorio M, Bury, Reino Unido y el agar-agar entérico Hektoen y SM-ID fueron comprados en bioMerieux, Basingstoke, Reino Unido. La Salmonella de CHROMagar y el agar-agar Rambach fueron obtenidos en M-tech Diagnostics, Warrington, Reino Unido. Éstos se prepararon todos exactamente como indican las instrucciones del fabricante.

10 Las 433 cepas fueron inoculadas sobre cada uno de los medios que se describen anteriormente y el número de cada especie que crecía en cada agar-agar fue calculado como un porcentaje del número total de cepas de cada especie que eran analizadas.

Tabla 1: Recuperación en tanto ciento de varias bacterias fecales en varios agar-agar selectivos de Salmonella

	Nº. probados	ABC	ABC*	CS	HEK	RAM	SM-ID	XLD
Salmonella spp.	61	100	100	100	100	100	100	100
Total no Salmonella	372	87,9	54,6	77,4	70,4	79,8	96,5	90,9
Total E. coli	108	96,3	10,2	95,4	45,4	98,1	100	78,7

ABC* se refiere al medio de modificado que contiene 1 mg/l de alafosfalina.

15	CS	-	Salmonella de CHROMagar
	HEK	-	Agar-agar de Hekloen
	XLD	-	Xilosa lisina descarboxilasa
	RAM	-	Rambach
	SM-ID	-	Marca registrada

20 Todas las cepas de Salmonella probadas crecieron bien en todos los agar-agar incluyendo el medio nuevo que incorpora 1 mg/l de alafosfalina. Se encontró, sin embargo, que este nuevo medio era superior en la inhibición de cepas que no eran de Salmonella en que un 45,4 % de las cepas no mostró ninguna señal de crecimiento en este medio. El siguiente mejor agar-agar fue el agar-agar entérico Hektoen que inhibió el 29,6 % de las cepas que no eran de Salmonella. De gran significado fue el hecho de que alafosfalina era sobre todo selectiva frente a *E. coli* -

25 con mucho la bacteria comensal fecal aeróbica más común. El 89,8 % de *E. coli* no crecía en este medio y esto estaba muy lejos de cualquiera de los agar-agar comercialmente disponibles que fueron probados. En particular, los agar-agar cromogénicos que fueron probados fueron particularmente pobres en la inhibición de *E. coli*. También es importante mencionar que los colores generados por las bacterias que crecen en el nuevo medio eran iguales que los colores producidos por las mismas cepas en el medio ABC. Esto mostraba que la alafosfalina no interfería con la

30 operación de los sustratos cromogénicos, siempre, por supuesto, que las bacterias pudieran crecer.

Este ejemplo ha demostrado que la inclusión de un sustrato suicida, en este caso la alafosfalina, ofrece una mejora sustancial para el aislamiento selectivo de la Salmonella cuando se compara con las mejores tecnologías existentes en el campo de los medios cromogénicos.

Ejemplo 3

Las muestras fecales rutinariamente enviadas al Departamento de Microbiología del Hospital Freeman y al Laboratorio de Salud Pública Regional, Newcastle Upon Tyne, fueron inoculadas sobre ABC, los agar-agar ABC modificado y Hektoen usados en el Ejemplo 2, usando el método siguiente. Aproximadamente 1 g de excrementos sólidos o 1 ml de excrementos líquidos fueron emulsionados en 10 ml de solución salina estéril (0,75 %). 10 µl de esta suspensión fueron inoculados entonces en cada uno de los tres medios y se mantuvieron en este medio para obtener colonias solas de crecimiento bacteriano. 9 ml de cada suspensión fecal fueron inoculados en 9 ml del caldo de selenita de fuerza doble para el enriquecimiento. Todas las placas y los caldos fueron incubados a 37°C durante 24 horas. Las placas fueron examinadas respecto a la presencia de Salmonella y todas las colonias sospechosas fueron investigadas usando el estándar bioquímico y las pruebas serológicas. Los caldos fueron subcultivados en los tres medios (10 µl de caldo por placa como se describe anteriormente). Estas placas fueron incubadas durante 24 horas y analizadas según eran sospechosas las colonias como se ha descrito.

Se trataron un total de 797 muestras fecales. De estas muestras unas 33 cepas de Salmonella totales fueron recuperadas vía el enriquecimiento por el caldo de selenita. 33 cepas fueron recuperadas en todos los medios después del enriquecimiento por el caldo de selenita. El proceso de enriquecimiento requirió un total de 48 horas para el aislamiento de la Salmonella. Los resultados conseguidos por los medios diferentes después de la inoculación directa de excrementos ("cultivo directo") mostraron diferencias entre los tres medios. Estas diferencias se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2: Recuperación de especies Salmonella en varios agar-agar después de inoculación directa

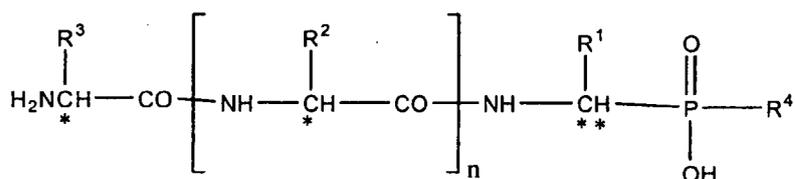
	Medio ABC	Medio ABC modificado	Agar-agar entérico Hektoen
Nº de Salmonella recuperada	17	25	18
% de rendimiento	51,5	75,8	54,6
% de positividad	2,1	3,1	2,3
Nº. de falsos positivos	6	4	83
% de falsos positivos	0,75	0,5	10,41

Está claro a partir de la tabla que el medio ABC modificado que contiene alafosfalina tenía un rendimiento sustancialmente mayor de Salmonella después de un cultivo directo que cualquiera de los dos medios de referencia usados. Esto era atribuible a una reducción sustancial de la flora normal que se dejó crecer en el medio que contenía alafosfalina. También es evidente que el medio ABC modificado no era menos específico para la Salmonella que el medio ABC y era sustancialmente mejor que el medio entérico Hektoen. Estos resultados demuestran que la inclusión del sustrato suicida alafosfalina potencia sustancialmente el rendimiento de Salmonella después de un cultivo directo. Aunque todas las cepas de Salmonella fueran recuperadas después del enriquecimiento, independientemente del medio usado, estos resultados fueron retrasados por las 24 horas requeridas para el proceso de enriquecimiento.

REIVINDICACIONES

1. Un método para cultivar bacterias y detectar una especie bacteria diana, en el que una muestra, que contiene una mezcla de varias bacterias sospechosa de contener la especie bacteria diana que es una especie de Salmonella, es incubada en presencia de un medio de crecimiento que comprende un compuesto que afecta al crecimiento, caracterizado porque el compuesto que afecta al crecimiento es un pro-inhibidor que no es tóxico para reconocer bacterias, pero que es convertible intracelularmente dentro de al menos alguna especie bacteriana incluyendo al menos una especie bacteriana presente en la muestra, el microbio que se convierte, formando un inhibidor que mata o previene la división del microbio que se convierte, y que es un derivado de aminoacilo u oligopeptidilo de un inhibidor;

en el que el pro-inhibidor está representado por la fórmula I general:



en la que R¹ es hidrógeno, alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₁-C₆, (cicloalquil C₁-C₆) - (alquilo C₁-C₆), arilo o aril-(alquilo C₁-C₆) estando dichos sustituyentes diferentes a hidrógeno opcionalmente sustituidos por uno o varios de amino, hidroxilo, tio, metililo, carboxilo o guanidino para formar el grupo característico de un L alfa-aminoácido natural; R² y R³ cada uno representan el grupo característico de un aminoácido alfa del tipo encontrado normalmente en proteínas con la condición de que R³ no puede ser hidrógeno cuando n es cero y R¹ es hidrógeno o fenilo; R⁴ es hidroxilo o metilo; n es cero, 1, 2 o 3; los asteriscos sencillos significan que la configuración en el átomo de carbono así marcado es L; y el doble asterisco significa que, cuando R¹ es otro distinto al hidrógeno, la configuración en el átomo de carbono así marcado es tal que sería obtenido sustituyendo el grupo carboxilo de un L alfa-aminoácido natural por un resto fósforo y sus sales farmacéuticamente aceptables.

en el que el medio de crecimiento comprende al menos un sustrato cromogénico que es enzimáticamente convertible en un compuesto diferentemente coloreado o de fluorescencia distinta por el microbio diana.

2. Un método según la reivindicación 1, en el que el pro-inhibidor es segregado intracelularmente.

3. Un método según la reivindicación 2, en el que el pro-inhibidor es segregado hidrolíticamente.

4. Un método según la reivindicación 3, en el que la segregación es enzimática.

5. Un método según la reivindicación 1, en el que el pro-inhibidor es un derivado de aminoacilo u oligopeptidilo de fosfalina.

6. Un método según la reivindicación 5, en el que el pro-inhibidor es alafosfalina.

7. Un método según la reivindicación 1, en el que el medio de crecimiento comprende factores de crecimiento para las especies de Salmonella diana, y/o compuestos selectivos.

8. Un método según la reivindicación 7, que comprende desoxicolato de sodio y/o citrato de sodio.

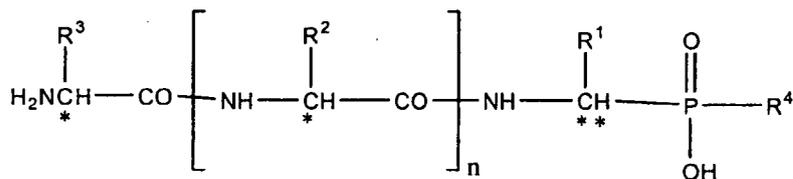
9. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que dicho microbio convertible es *E. coli*.

10. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que el medio de crecimiento es un medio sólido.

11. Un método según la reivindicación 10, en el que el medio de crecimiento es un medio agar-agar.

12. Una composición para preparar en un medio de crecimiento bacteriano que comprende nutrientes capaces de ayudar al crecimiento de una muestra de bacterias entéricas variadas y un pro-inhibidor que no es tóxico para las bacterias de interés que son especies de Salmonella, pero que es convertible intracelularmente dentro de al menos alguna especie bacteriana de interés, el microbio que se convierte, para formar un inhibidor que mata o previene la división del microbio que se convierte, y que es un derivado de aminoacilo o peptidilo de un inhibidor;

en el que el pro-inhibidor está representado por la fórmula I general:



en la que R¹ es hidrógeno, alquilo C₁-C₆, cicloalquilo C₁-C₆, (cicloalquil C₁-C₆) - (alquilo C₁-C₆), arilo o aril-(alquilo C₁-C₆) estando dichos sustituyentes diferentes a hidrógeno opcionalmente sustituidos por uno o varios de amino, hidroxilo, tio, metiltio, carboxi o guanidino para formar el grupo característico de un L alfa-aminoácido natural; R² y R³ cada uno representan el grupo característico de un aminoácido alfa del tipo encontrado normalmente en proteínas con la condición de que R³ no puede ser hidrógeno cuando n es cero y R¹ es hidrógeno o fenilo; R⁴ es hidroxilo o metilo; n es cero, 1, 2 o 3; los asteriscos sencillos significan que la configuración en el átomo de carbono así marcado es L; y el doble asterisco significa que, cuando R¹ es otro distinto al hidrógeno, la configuración en el átomo de carbono así marcado es tal que sería obtenido sustituyendo el grupo carboxilo de un L alfa-aminoácido natural por un resto fósforo y sus sales farmacéuticamente aceptables,

que comprende además al menos un sustrato cromogénico que es enzimáticamente convertible en un compuesto diferentemente coloreado o de fluorescencia distinta por la especie de Salmonella diana.

13. Una composición según la reivindicación 12, en la que el pro-inhibidor se segrega intracelularmente.

14. Una composición según la reivindicación 13, en la que el pro-inhibidor se segrega hidrolíticamente.

15. Una composición según la reivindicación 13, en la que la segregación es enzimática.

16. Una composición según la reivindicación 12, en la que el pro-inhibidor es un derivado de aminoácido u oligopeptidilo de fosfalina.

17. Una composición según la reivindicación 16, en la que el pro-inhibidor es alafosfalina.

18. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, que comprende factores de crecimiento para las especies de Salmonella diana, y/o compuestos selectivos.

19. Una composición según la reivindicación 18, que comprende desoxicolato de sodio y/o citrato de sodio.

20. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 19, que comprende un compuesto acuoso hinchable.

21. Una composición según la reivindicación 20, en la cual el compuesto acuoso hinchable es agar-agar.