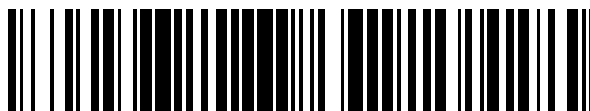


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 658**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06748499 .8**
96 Fecha de presentación: **21.03.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1874951**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.01.2008**

54 Título: **Medios de ensayo y procedimiento de identificación y diferenciación de bacterias**

30 Prioridad:
01.04.2005 US 96908

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.03.2012

73 Titular/es:
**MICROLOGY LABORATORIES L.L.C.
1303 EISENHOWER DR. S.
GOSHEN, IN 46526-5360, US**

72 Inventor/es:
**ROTH, Geoffrey, N. y
ROTH, Jonathan, N.**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 377 658 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

Medios de ensayo y procedimiento de identificación y diferenciación de bacterias

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere a un medio de ensayo y al procedimiento de detección, cuantificación, identificación y/o diferenciación de materiales biológicos en una muestra, que puede contener diversos materiales biológicos diferentes. El medio de ensayo es adecuado para detectar, cuantificar o diferenciar coliformes generales, *E. coli*, *Aeromonas* y *Salmonella*.

10 Las bacterias son el factor etiológico en muchas enfermedades de personas, animales superiores y plantas, y generalmente se transmiten por vehículos tales como el agua, las bebidas, los alimentos y otros organismos. La experimentación de estos vehículos potenciales de bacterias es de importancia clínica y generalmente se basa en "organismos indicadores". Borrego *et al.*, *Microbiol. Sem.* 13:413-426, (1998). Por ejemplo, *Escherichia coli* (*E. coli*) es un miembro gram negativo de la familia de las *Enterobacteriaceae* que es parte de la flora intestinal normal de los animales de sangre caliente, y su presencia indica contaminación fecal (p. ej., aguas residuales sin depurar). Aún cuando la mayoría de las cepas de *E. coli* no son la causa real de la enfermedad, su presencia es una potente indicación de la posible presencia de patógenos asociados a la enfermedad intestinal, tales como el cólera, la disentería y la hepatitis, entre otras. Por consiguiente, *E. coli* ha llegado a ser un organismo indicador primario para la contaminación fecal, y como resultado, cualquier procedimiento que diferencie e identifique *E. coli* de otras bacterias es muy útil.

20 Otros miembros de la familia de las *Enterobacteriaceae*, denominadas normalmente "coliformes generales", especialmente el género "*Citrobacter*", *Enterobacter* y *Klebsiella*, se consideran también que son organismos indicadores significativos para la calidad del agua, las bebidas y los alimentos. Por lo tanto, las pruebas para identificar y diferenciar coliformes generales de *E. coli* son también muy útiles. Además, se ha demostrado que varias especies del género *Aeromonas* no solamente son patógenos potenciales, sino que tienen una correlación con otros organismos indicadores (Petibone *et al.*, *J. Appl. Microbiol.* 85:723-730 (1998)). Los procedimientos de ensayo actuales para identificar, separar y enumerar *Aeromonas spp.* de las *Enterobacteriaceae* muy similares han faltado y la mayoría de los procedimientos actuales que usan sustratos enzimáticos no separan *Aeromonas spp.* de *Enterobacteriaceae* debido a sus características bioquímicas casi idénticas. Cualquier procedimiento que dependa de la identificación de los coliformes generales por medio de un sustrato de β -galactosidasa no diferencia las *Aeromonas spp.* de los coliformes generales o elimina las *Aeromonas* de la muestra mediante el uso de inhibidores específicos (antibiótico tal como cefsulodina). Brenner *et al.*, *Appl. Envir. Microbio.* 59:3534-44 (1993). No diferencian, ni identifican ni enumeran *Aeromonas* junto con *E. coli* y coliformes generales. Landre *et al.*, *Letters Appl. Microbiol.* 26:352-354 (1998). Son necesarios procedimientos de ensayo mejorados para identificar, separar y enumerar eficazmente dichos tipos bacterianos, y hay una investigación continua para usar de manera más rápida, más precisa, más fácil y más versátil procedimientos de ensayo y aparatos en este campo.

35 Se han usado numerosos procedimientos de ensayo para determinar, identificar y enumerar uno o más organismos indicadores. Algunos de estos procedimientos de ensayo solamente indican la presencia o ausencia del microorganismo, mientras que otros intentan además cuantificar uno o más de los organismos específicos en esta muestra de ensayo. Por ejemplo, un ensayo cualitativo denominado ensayo de presencia/ausencia (o P/A), puede usarse para determinar la presencia o ausencia de coliformes y *E. coli* en la muestra de ensayo. Un medio de ensayo que incluye el sustrato de β -galactosidasa O-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), y el sustrato de β -glucuronidasa-metil-umbeliferil- β -D-glucurónido (MUG), se inocula con la muestra de ensayo. Para diferenciar los coliformes generales de *E. coli*, este ensayo se basa en el hecho de que generalmente todos los coliformes producen β -galactosidasa, mientras que solamente *E. coli* produce además β -glucuronidasa además de β -galactosidasa. Si están presente algunos coliformes (incluyendo *E. coli*), el caldo de cultivo se vuelve de color amarillo debido a la actividad de la enzima galactosidasa en el material ONPG que produce la liberación de un pigmento amarillo difundible. Si está presente *E. coli*, el caldo de cultivo presentará una fluorescencia azul cuando se irradie con rayos ultravioleta, debido a la rotura del reactivo MUG con liberación del colorante fluorógeno originado por la producción de la enzima glucuronidasa. Estas reacciones son muy específicas, y permiten la presencia de coliformes del caldo de cultivo en general, así como que se identifique *E. coli* en una sola muestra. Un inconveniente de este ensayo es que no es directamente cuantitativo para uno de los dos tipos de bacterias, ya que ambos reactivos producen pigmentos difundibles. Un segundo inconveniente es que puede haber una reacción de coliforme de falso positivo si están presentes *Aeromonas spp.* en la muestra de ensayo. Esto se ha demostrado que es posible aun cuando existan inhibidores presentes para impedir que ocurra esto supuestamente (Landre *et al.*, *Letters Appl. Microbiol.* 26:352-354 (1998)). El ensayo también requiere equipo específico para producir los rayos ultravioletas. Además, este ensayo puede usarse solamente para detectar coliformes y *E. coli*. Otros organismos importante tales como, la cepa 0157 de *E. coli* que es negativa a glucuronidasa, no se detectan, ni son otros microorganismos que no producen ni galactosidasa ni glucuronidasa.

60 Se ha usado el procedimiento de Violeta Rojo Bilis Agar-agar (VRBA) para determinar la cantidad tanto de coliformes como de *E. coli* en una muestra de ensayo. El medio de ensayo usado en este procedimiento incluye sales biliares (para inhibir no coliformes), lactosa y el indicador de pH rojo neutro. Como coliformes (incluyendo *E.*

coli) desarrollados en el medio, la lactosa se fermenta con producción de ácido, y el rojo neutro en el aire de la colonia bacteriana se vuelve de color rojo ladrillo. Los resultados de este ensayo no son siempre fáciles de interpretar, y con objeto de determinar la presencia de *E. coli*, que confirma los ensayos siguientes, tal como la fermentación en caldo de lactosa verde brillante, debe realizarse el cultivo en caldo de cultivo EC a 44,5 °C y usando una tira de Eosina Azul de Metileno Agar-agar (EMBA).

El procedimiento del filtro de membrana (FM) usa filtros de microporos a través de los cuales se pasan las muestras de modo que las bacterias son retenidas en la superficie del filtro. Este procedimiento se usa muy a menudo cuando las poblaciones bacterianas son muy pequeñas, y se necesita una muestra grande para obtener cifras adecuadas. El filtro se coloca a continuación en la superficie de un medio seleccionado, se incuba y las colonias bacterianas que se desarrollan en la superficie del filtro de membrana se cuentan y evalúan. Este procedimiento se usa extensamente y proporciona buenos resultados cuando se combina con reactivos y medios apropiados. Un inconveniente de este procedimiento es que es costoso y largo. Además no opera bien con muestras sólidas, o muestras con recuentos elevados de partículas. El procedimiento FM puede usarse junto con el procedimiento de la invención descrito en la presente solicitud.

El procedimiento m-Endo se usa también para determinar la cantidad de *E. coli* y coliformes generales y es un procedimiento oficial aprobado por la USEPA para analizar la calidad del agua. El medio se usa normalmente con un filtro de membrana y *E. coli* y unidades formadoras de colonias de coliformes generales (UFC) se desarrollan como colonias oscuras con un brillo metálico verde dorado. Debido a una elevada cantidad probada de error por falso positivo, las colonias típicas deben confirmarse por análisis adicional. *Standard Methods for the Examination of water and Wastewater*, 20ª Edición, 9-10 y 9-60 (1998).

Otros ensayos, tales como el Número Más Probable (NMP) usan caldos de cultivo que contienen lactosa (LST, BGLB, EC) para estimar los números de coliformes generales y *E. coli*, pero se ha demostrado también que tienen altas proporciones de error así como que son problemáticas y lentas para producir resultados. Evans *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 41:130-138 (1981).

El reactivo 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) es un conocido compuesto de ensayo para identificar coliformes. Cuando actúa por la enzima β -galactosidasa producida por coliformes, X-gal forma un precipitado índigo azul insoluble. X-gal puede incorporarse en un medio nutriente tal como una placa de agar-agar, y si está presente una muestra que contiene coliformes, los coliformes se desarrollarán como colonias índigo azul. X-gal presenta la ventaja sobre el compuesto ONPG, descrito anteriormente, porque forma un precipitado insoluble en agua en lugar de un compuesto difundible, con lo que permite realizar una determinación cuantitativa cuando la muestra de ensayo se incorpora en o sobre un medio solidificado, o cuando las colonias coliformes se desarrollan en la superficie del filtro de membrana depositado en una almohadilla saturada con un medio líquido o sobre un filtro de membrana que descansa sobre un medio sólido. Además, no se requiere el uso de luz ultravioleta.

Un compuesto similar, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido (X-gluc) es un conocido compuesto de ensayo para identificar *E. coli*. Cuando actúa sobre la enzima β -glucuronidasa producida por la mayor parte de *E. coli*, X-gluc forma un precipitado insoluble azul índigo. X-gluc presenta la ventaja sobre el compuesto MUG, descrito anteriormente, porque forma un precipitado insoluble en agua, en lugar de un compuesto difundible, con lo que permite hacer una determinación cuantitativa de *E. coli* cuando se incorpora la muestra de ensayo en o sobre un medio solidificado. X-gluc y su capacidad para identificar *E. coli* se describen en Watkins, *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1874-1875 (1998). Un compuesto similar, indoxil- β -D-glucurónido, que también produce colonias azul brillante de *E. coli*, se describió en Ley, *et al.*, *Can. J. Microbiol.* 34:690-693 (1987).

Aunque X-gal y X-gluc son cada uno por separado útiles en la determinación cuantitativa de uno de los coliformes (X-gal) o *E. coli* (X-gluc), estos compuestos indicadores adolecen del inconveniente de que cada uno contiene el mismo componente cromógeno. Por consiguiente no pueden usarse juntos para identificar y distinguir la *E. coli* y los coliformes generales en un único ensayo con una sola muestra, ya que ambos generan idénticamente colonias de color azul índigo. Una persona que use ambos reactivos juntos podría identificar cuantitativamente el número total de coliformes, lo mismo si se usara X-gal sólo, pero no podría indicar cuáles de las colonias eran *E. coli* y cuáles eran otros coliformes aparte de *E. coli*.

Un procedimiento de ensayo desarrollado recientemente y con gran éxito comercial y un medio de ensayo para identificar cuantitativamente y diferenciar coliformes generales y *E. coli* en una muestra de ensayo se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.210.022 y 5.393.662, ambas de las cuales comparten inventor común con la presente solicitud y que están de éste modo incorporadas por referencia. Este procedimiento y el medio de ensayo mejora los procedimientos de la técnica anterior permitiendo la identificación cuantitativa de coliformes generales y *E. coli* en una única muestra. No son necesarios ensayos de confirmación adicionales. La muestra de ensayo se añade a un medio que contiene un sustrato de β -galactosidasa, tal como 6-cloroindolil- β -D-galactósido, y un sustrato de β -glucuronidasa, tal como 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido (X-gluc). El sustrato de β -galactosidasa es capaz de formar un precipitado insoluble en agua de un primer color en el momento de la reacción con β -galactosidasa, y el sustrato de β -glucuronidasa es capaz de formar un precipitado insoluble en agua de un segundo color, que contrasta con el primer color, en el momento de la reacción con β -glucuronidasa. Como resultado, pueden cuantificarse coliformes generales al enumerar las colonias del primer color (que tienen actividad de β -

galactosidasa), y *E. coli* puede cuantificarse al enumerar las colonias del segundo color (que tienen actividad tanto de β -galactosidasa como de β -glucuronidasa). Esta tecnología ha sido extensamente copiada.

Otro procedimiento y aparato de ensayo desarrollados recientemente proporciona excelentes resultados para la diferenciación e identificación de los coliformes generales, *E. coli* y las cepas 0157 de *E. coli* y *Enterobacteriaceae* no coliforme. El procedimiento y el medio de ensayo se describen en la patente de EE.UU. n° 5.726.031, que comparte inventor común con la presente solicitud, y que está incorporada por ésta por referencia.

Una determinada clase de sustratos, denominados en la presente memoria "no cromógenos", se ha usado para detectar varios microorganismos. Un cultivo laminar para detectar *E. coli* usando hidroxiquinolina- β -D-glucurónido es dado a conocer por Dalet *et al.*, *J Clin. Microbiol.*, 33(5)1395-8 (1995). Asimismo, una técnica para la detección de *E. coli* en un medio de agar-agar usando 8-hidroxiquinolina- β -D-glucurónido es dada a conocer por James *et al.*, *Zentralbl. Bakteri. Mikrobiol. Hyg. [A]*, 267(3):316-21 (1988).

El documento US 2002/0090668 A1 da a conocer un medio y un procedimiento de ensayo para detectar, cuantificar, identificar y diferenciar cuatro materiales biológicos por separado en una muestra de ensayo. El medio de ensayo permite cuantificar y diferenciar bajo luz ambiental agregados de entidades biológicas que producen enzimas específicas, que pueden incluir coliformes generales, *E. coli*, *Aeromonas*, y *Salmonella* o *Shigella* en un único medio de ensayo. Se da a conocer un medio de ensayo que comprende un sustrato no cromógeno de β -D-glucurónido, un sustrato cromógeno de α -D-galactósido y un sustrato cromógeno de β -D-galactósido. Los sustratos producen productos insolubles de diferentes colores que pueden distinguirse fácilmente.

Es deseable mejorar más la distinción de los colores que se generan en los medios de ensayo. Es decir, en el medio de ensayo de la técnica anterior que detecta y distingue dos entidades biológicas, la confusión puede aumentar los dos colores que se muestran en el medio.

Además, es deseable poder identificar y diferenciar otros organismos estrechamente relacionados, tales como los miembros de las familias *Aeromonaceae*, *Vibrionaceae*, y *Salmonella*. Por ejemplo, el género *Aeromonas* está íntimamente relacionado con los coliformes y da un modelo de ensayo biológico casi idéntico. Además, el género *Vibrio* es también un tipo importante de bacterias que da un modelo de ensayo bioquímico casi idéntico. Además, el género *Vibrio* es un tipo importante de bacterias que crece en las mismas condiciones generales que las coliformes. Se sabe distinguir colonias de *Aeromonas* de los coliformes generales analizando todas las colonias en una muestra dada la presencia de citocromo oxidasa. Indeseablemente, sin embargo, esto requiere otra serie de ensayos. Además, *Aeromonas* es corriente en el agua y los alimentos, y está indicada frecuentemente en las muestras de ensayo como coliformes generales, lo que da como resultado un gran error por falso positivo para las coliformes generales por los procedimientos analíticos más corrientes. Puede evitarse que las *Aeromonas* interfieran con los resultados de los coliformes al añadir determinados antibióticos al medio. Sin embargo, las cantidades de antibiótico añadidas deben ser cuidadosamente controladas. Además, los antibióticos que se han usado convencionalmente tienen lapsos de vida cortos en el medio de modo que pierden su potencia rápidamente en otro estado aparte del congelado. Con frecuencia puede ser deseable poder cultivar, identificar y enumerar *Aeromonas spp.* lo que no puede hacerse si están inhibidas.

Además, en estos casos en los que es deseable inhibir *Aeromonas*, es deseable un procedimiento mejor para hacerlo, en el que la estabilidad al almacenamiento del medio no se reduce de manera apreciable por la inclusión de un inhibidor.

Además, es también deseable distinguir las cepas de *Salmonella* de los coliformes generales de *E. coli* y *Aeromonas*.

Sumario de la invención

La presente invención supera los inconvenientes de los procedimientos de la técnica anterior proporcionando un procedimiento analítico y un medio para identificar y diferenciar cualitativa o cuantitativamente entidades biológicas en una muestra de ensayo que puede incluir diversas entidades biológicas diferentes. El medio de ensayo de la invención es adecuado para detectar, cuantificar o diferenciar coliformes generales, *E. coli*, *Aeromonas* y *Salmonella*. El presente asunto de la invención es un medio de ensayo según la reivindicación 1. Las formas de realización de la invención se definen en las reivindicaciones dependientes.

En una forma de realización, la presente invención usa sustratos "no cromógenos" para aumentar la distinción entre múltiples colores producidos al distinguir entidades biológicas presentes en el medio de ensayo de la invención. Otros sustratos "cromógenos" presentes en el medio de ensayo de la invención no interfieren con el color sustancialmente negro conseguido con el sustrato no cromógeno. Es decir, siempre que una entidad biológica dada es sensible al sustrato no cromógeno, los agregados del mismo presentes en el medio de ensayo presentarán como un color negro sustancialmente independiente de si dicha entidad biológica es sensible a uno, dos o más sustratos cromógenos que también están presentes en el medio. La presente invención aprovecha esta propiedad de los sustratos no cromógenos.

En la presente memoria se describe un medio de ensayo para detectar, identificar y analizar cualitativa o

5 cuantitativamente una primera y segunda entidades biológicas. El medio de ensayo incluye un medio a base de nutrientes que incluye iones de una sal, un sustrato cromógeno y un sustrato no cromógeno. La primera entidad biológica es sensible al sustrato no cromógeno mientras que la segunda entidad biológica es sensible al sustrato cromógeno. En este medio de ensayo, los agregados de la primera entidad biológica presente en el medio de ensayo son sustancialmente negros y los agregados de la segunda entidad biológica presente en el medio de ensayo son de un segundo color, siendo el segundo color distinguible del sustancialmente negro.

En una forma, el medio de ensayo descrito explica que la primera entidad biológica sea sensible al sustrato cromógeno además del sustrato no cromógeno. En tal caso, los agregados de la primera entidad biológica presente en el medio de ensayo no obstante se presentarán como sustancialmente negros.

10 Significativamente, aun cuando los agregados de la primera entidad biológica son sensibles tanto al primer como al segundo sustrato en esta forma, estos agregados todavía se presentan como sustancialmente negros en el medio de ensayo. Es decir, el sustrato cromógeno no interfiere con el color sustancialmente negro. Convenientemente, esta propiedad de los sustratos no cromógenos permite que varias entidades biológicas diferentes se identifiquen y diferencien en un sólo medio, teniendo los agregados de cada entidad biológica un color distinguible a simple vista.

15 En otra forma del medio descrito anteriormente, el medio incluye además el antibiótico ácido nalidíxico para inhibir el crecimiento de *Aeromonas spp.* Convenientemente, el ácido nalidíxico, en comparación con la cefsulodina, no reduce significativamente la estabilidad del medio de ensayo que incorpora.

20 En relación con esto, se describe un procedimiento de preparación de un medio de ensayo para detectar al menos una vez un primer tipo de entidad biológica y de inhibir un segundo tipo de la entidad biológica del crecimiento en el medio. El procedimiento incluye las etapas de combinar los sustratos deseados con un medio a base de nutriente; añadir un inhibidor al medio; y a continuación esterilizar el medio sometiendo el medio a al menos 100 °C. Debido a que se añade el inhibidor como etapa inicial, es innecesaria la adición estéril posterior del inhibidor.

25 Se describe también un medio de ensayo para detectar, identificar y cualificar o cuantificar la primera, segunda y tercera entidades biológicas. El medio de ensayo incluye un medio a base de nutriente que incluye iones de una sal. En el medio de ensayo se suministran el primer y segundo sustratos cromógenos y un sustrato no cromógeno. La primera y segunda entidades biológicas son sensibles al primer y al segundo sustratos cromógenos, y alternativamente, y la tercera entidad biológica es sensible al sustrato no cromógeno. Los agregados de la primera entidad biológica presente en el medio de ensayo son un primer color, agregados de la segunda entidad biológica presente en el medio de ensayo son de un segundo color, y los agregados de la tercera entidad biológica presente en el medio de ensayo son sustancialmente negros.

En una forma, el medio de ensayo descrito explica que la tercera entidad biológica es sensible al primer y/o al segundo sustratos cromógenos además de al sustrato no cromógeno. En tal caso, los agregados de la tercera entidad biológica no obstante se presentarán como sustancialmente negros.

35 Debe apreciarse que el uso de un sustrato no cromógeno junto con uno o más sustratos cromógenos aumenta sinérgicamente el número de entidades biológicas que pueden detectarse y distinguirse en un solo medio y aumenta sinérgicamente las posibles combinaciones de color para detectar una serie dada de entidades biológicas. Dicho de otra manera, incluyendo un componente no cromógeno como uno de los sustratos se aumenta sinérgicamente los grados de libertad en la selección de otros sustratos y los colores correspondientes para un medio de ensayo. Esto es así porque un agregado de la entidad biológica que es sensible al sustrato no cromógeno se presentará dependientemente como sustancialmente negro. No es necesario explicar los efectos de color combinados para los sustratos no cromógenos. Por ejemplo, en un medio de ensayo que incluye tres sustratos cromógenos y un sustrato no cromógeno, por lo menos tres efectos de combinación de color combinados se evitan usando el componente no cromógeno, en comparación con el uso de cuatro componentes cromógenos.

45 Se describe además un medio de ensayo capaz de detectar, cuantificar y diferenciar coliformes generales y/o *E. coli spp.* a la luz ambiental. El procedimiento analítico comprende un medio a base de nutrientes que incluye una sal. Un primer sustrato capaz de formar un primer componente insoluble en agua de un primer color en presencia de *E. coli* y los iones de la sal se proporciona en el medio. El primer color es sustancialmente negro. Se proporciona un segundo sustrato que puede formar un segundo componente insoluble en agua de un segundo color en presencia de coliformes generales. El segundo color es distinguible a simple vista del primer color. Así, las colonias de *E. coli* presentes en el medio de ensayo son indicadas por el primer color sustancialmente negro y las colonias de coliformes generales son indicadas por el segundo color.

55 En una forma del medio descrito anteriormente, el medio de ensayo incluye además un tercer sustrato capaz de formar un tercer componente insoluble en agua de un tercer color en presencia de *Salmonella*. El tercer color es distinguible del primer y segundo colores, por lo que el medio de ensayo es capaz de cuantificar y/o diferenciar *E. coli*, coliformes generales y *Salmonella*. Además, los sustratos se seleccionan de modo que los coliformes generales presentes en el medio de ensayo reaccionen también con el tercer sustrato para formar un componente insoluble en agua que incluye el tercer color. Por consiguiente, las colonias de coliformes generales están indicadas en el medio de ensayo como un cuarto color, siendo el cuarto color una combinación del segundo color y del tercer color. El

cuarto color es distinguible a simple vista del primer y tercer colores. Aún más, los sustratos pueden seleccionarse de modo que *Aeromonas spp.* forman un componente insoluble del segundo color al reaccionar con el segundo sustrato, pero no el primer y tercer sustratos. Así, en este medio de ensayo, las colonias de *E. coli* serán generalmente negras, colonias de coliformes generales serán el cuarto color, las colonias de *Aeromonas* serán el segundo color y las colonias de *Salmonella* serán el tercer color. Éste medio de ensayo es un medio de ensayo de la invención, si incluye también un sustrato de α -D-galactósido o un sustrato de β -D-galactósido, que forma un producto que presenta fluorescencia a la luz UV en presencia de al menos uno de entre *E. coli*, coliformes generales, *Aeromonas* o *Salmonella*.

Se describe además un procedimiento para detectar, cuantificar y diferenciar a la luz ambiental coliformes generales, *E. coli*, y al menos uno de los géneros *Aeromonas* o *Salmonella* en una muestra de ensayo. El procedimiento comprende las etapas de proporcionar un medio a base de nutrientes incluyendo el primer, segundo y tercer sustratos. Cada uno de los sustratos es capaz de formar un componente insoluble en agua en presencia de al menos uno de los coliformes generales, *E. coli*, *Aeromonas* y *Salmonella*. Los sustratos se seleccionan de modo que las colonias de *E. coli* producidas en el medio de ensayo son un primer color, las colonias de coliformes generales producidas en el medio de ensayo son un segundo color y las colonias de *Aeromonas* o de *Salmonella* producidas en el medio de ensayo son un tercer color. Cada uno de los colores es distinguible a simple vista. el medio de ensayo se inocula con la muestra de ensayo y a continuación se incuba. En el medio de ensayo se examina a continuación la presencia de las primeras colonias que tienen el primer color, las segundas que tienen el segundo color y las terceras colonias que tienen el tercer color. Las primeras colonias son *E. coli*, las segundas colonias son coliformes generales y las terceras colonias son de *Aeromonas* o *Salmonella*.

En una forma de las mismas, el procedimiento descrito incluye además añadir iones de una sal al medio de ensayo para reaccionar con uno o más de los sustratos. Haciendo esto, se produce un precipitado que presenta un color sustancialmente negro en presencia de la enzima específica para este sustrato. Un compuesto preferido para formar el color sustancialmente negro en presencia de los iones de la sal consiste en β -D-glucurónido. Éstos compuestos liberan un aglucón cuando se hidrolizan que forma un complejo insoluble sustancialmente negro en presencia de iones.

En otra forma, el procedimiento comprende además examinar en el medio de ensayo la presencia de las cuartas colonias que tienen un cuarto color, en las que los sustratos se seleccionan de modo que las colonias de *Aeromonas* son el tercer color y las colonias de *Salmonella* son el cuarto color, siendo el cuarto color distinguible a simple vista del primero, del segundo y del tercer colores. Los sustratos pueden seleccionarse de modo que el primer color sea sustancialmente negro, el segundo color sea sustancialmente azul-violeta, el tercer color sea sustancialmente rojo-rosa y el cuarto color sea sustancialmente verde cerceta.

En otra forma, los sustratos se seleccionan de modo que las colonias de *Aeromonas* así como las colonias de *Plesiomonas* y *Vibrios* se indican como el tercer color.

Una forma de realización de la presente invención usa un sustrato no cromógeno junto con tres sustratos cromógenos, siendo uno de los sustratos cromógenos un sustrato fluorógeno, y de este modo aumenta sinérgicamente los grados de libertad de diseño al seleccionar colores para el medio de ensayo de la invención. Esto es así porque los sustratos cromógenos no interfieren con el precipitado sustancialmente negro formado por el sustrato no cromógeno.

La presente invención permite la cuantificación, identificación y diferenciación de cuatro (4) cepas bacterianas diferentes simultáneamente en un medio de ensayo individual usando una muestra de ensayo individual, bajo iluminación ambiente, pero el medio de ensayo incluye además un sustrato que produce fluorescencia. Pueden evitarse ensayos posteriores con su correspondiente tiempo adicional y costos adicionales. Desde luego, el medio de ensayo de la presente invención podría usarse también puramente con fines cualitativos, como un mero ensayo de presencia/ausencia (P/A).

En un medio de ensayo, los sustratos se seleccionan de modo que los colores se pueden distinguir a simple vista unos de otros sin necesidad de luz UV o de otros auxiliares visuales, aparte de, quizás, medios de ampliación. Por ejemplo, en una forma de realización, las colonias de *E. coli* se indican claramente por un precipitado que tiene un color sustancialmente negro, las colonias de coliformes generales están indicadas por un color azul-violeta, las colonias de *Aeromonas* están indicadas por un color rojo-rosa y las colonias de *Salmonella* están indicadas por un color cerceta (verde azulado). Debido a que estos colores son tan distintos a simple vista, la confusión entre los colores está muy reducida. En un medio de ensayo, se usa MUGluc (ácido 4-metilumbeliferil- β -D-glucurónico) en lugar de un sustrato no cromógeno. En éste medio de ensayo, los coliformes generales estarían todavía indicados por un color azul-violeta o gris. Las colonias de *Aeromonas* indicadas por un color rojo-rosa y las colonias de *Salmonella* indicadas por un color verde cerceta; sin embargo, las colonias de *E. coli* parecerían las mismas a la luz visible que los coliformes generales, pero además producirían fluorescencia con un color azulado brillante bajo una luz UV de longitud de onda larga y esto podría distinguirse de las demás colonias. Aunque, el producto fluorescente se difundiría más rápidamente que los sustratos cromógenos o no cromógenos y haría más difícil la cuantificación de las colonias de *E. coli*, las colonias de *E. coli* pueden detectarse a alrededor de un tiempo de incubación de 14 horas, y en cualquier caso sería suficiente como ensayo de presencia/ausencia para las *E. coli*.

Asimismo pueden usarse tres sustratos cromógenos si se combinan de manera apropiada. Por ejemplo, un β -glucurónido tal como X-gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico) o yodo-Gluc (ácido 5-yodo-3-indolil- β -D-glucurónico) puede usarse con los sustratos cromógenos α - y β -D-galactósido. Ejemplos de sustratos de α - y β -galactósido que pueden ser adecuados son 6-cloro-3-indolil- β -D-galactósido y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactósido. En esta forma de realización, los sustratos de β -D-glucurónido y α -D-galactósido forman el mismo color general en presencia de colonias que producen las enzimas respectivas; sin embargo, los colores pueden distinguirse proporcionando los sustratos en diferentes cantidades de modo que el color resultante producido por uno es más oscuro que el producido por el otro. Además, incluso si los sustratos se suministran en aproximadamente las mismas cantidades, las colonias que reaccionan tanto al β -D-glucurónido como al α -D-galactósido, tal como *E. coli* deberían ser más oscuras que las colonias tales como de coliformes generales, que reaccionan solamente con el α -D-galactósido. Debe apreciarse, que no sería necesario añadir iones de sal si no se usa un sustrato no cromógeno. Según la invención el medio de ensayo incluye también un sustrato de α -D-galactósido o de β -D-galactósido, que forman un producto que produce fluorescencia a la luz UV en presencia de al menos uno de entre *E. coli*, coliformes generales, *Salmonella* o *Aeromonas*.

MUGluc u otro sustrato de glucurónido fluorescente puede combinarse en un medio de ensayo con un sustrato de glucurónido cromógeno o no cromógeno. En éste caso, el sustrato MUGluc puede usarse para detectar *E. coli* a la luz fluorescente con menos tiempo de incubación que se necesita para detectar las colonias con un glucurónido cromógeno o no cromógeno. Además el sustrato MUGluc puede servir como confirmación de la presencia/ausencia de *E. coli*, si por alguna razón existe alguna cuestión como de los colores visibles en la luz ambiental producida por las colonias en presencia de los sustratos.

Otra ventaja del medio de ensayo de la presente invención es su flexibilidad y facilidad de uso. La temperatura de incubación no es crítica ya que el crecimiento y la diferenciación de los organismos mencionados puede producirse dentro de un intervalo óptimo. Por lo tanto, se evitan las etapas de reanimación y la inhibición de las cepas sensibles a la temperatura no se produce. Además, puede usarse equipo económico.

En una forma de realización de la presente invención, la distinción de color obtenida en un medio de ensayo puede intensificarse identificando y diferenciando *E. coli* de coliformes generales. En un medio de ensayo, las colonias de *E. coli* presentan un color sustancialmente negro, mientras que los coliformes generales presentan un color rojo-rosado, siendo la distinción entre ellas claramente evidente. La confusión entre los dos colores se reduce por lo tanto en gran medida.

La presente invención permite la identificación y diferenciación de *Aeromonas spp.* de los coliformes generales. Muchos medios de ensayo de manera indeseable necesitan usar un inhibidor cefsulodina para evitar que se desarrollen *Aeromonas spp.* en las mismas. Sin embargo, el uso de cefsulodina como inhibidor necesita una etapa adicional en el procedimiento, esto es, la adición estéril de antibiótico esterilizado por filtración, y es difícil de controlar. Además, la presencia de cefsulodina reduce significativamente el periodo de conservación eficaz del medio. Además, el uso de un inhibidor, obviamente, evita la detección y cuantificación de *Aeromonas spp.* Convenientemente, con la presente invención, puede detectarse, cuantificarse y diferenciarse *Aeromonas spp.* de los coliformes totales en un solo medio.

Si se desea no obstante inhibir colonias de *Aeromonas spp.* de crecimiento en el medio de ensayo, las formas preferidas de la presente invención emplean ácido nalidíxico como inhibidor, que se ha demostrado que tiene un efecto mucho menos perjudicial para la estabilidad del medio que le incorpora. Además, puede añadirse ácido nalidíxico como parte de la formulación del medio inicial antes de la esterilización, evitando de este modo una etapa del procedimiento costosa y difícil que se necesita con cefsulodina. Por último, el ácido nalidíxico es mucho menos costoso que la cefsulodina.

Otra ventaja de la presente invención es que puede proporcionar un medio de ensayo para los ensayos cualitativos o cuantitativos. Es decir, el medio de ensayo según la presente invención puede usarse como meros dispositivos para análisis de presencia o ausencia, o puede usarse para cuantificar varias entidades biológicas, es decir, coliformes generales, *E. coli*, *Aeromonas* y *Salmonella* que se presentan como diferentes colonias coloreadas en el medio de ensayo de la invención.

Descripción detallada de la invención

El procedimiento y el medio de la presente invención permiten la detección, cuantificación, identificación y diferenciación simultáneas de una variedad de entidades biológicas seleccionadas en una muestra de poblaciones mezcladas de entidades biológicas. El procedimiento y el medio de la invención son adecuados para la detección, cuantificación, identificación y diferenciación de *E. coli* y coliformes generales, y la identificación cuantitativa adicional y la diferenciación de especies bacterianas de *Aeromonas*, *Salmonella* y *Vibrio*.

El procedimiento y los medios de ensayo que incorporan la presente invención usan el hecho de que la actividad enzimática de entidades biológicas y específicamente de bacterias varía con el género y/o la familia de las bacterias en cuestión. El procedimiento y los medios de ensayo que incorpora la presente invención usan además el hecho de que pueden usarse varias enzimas que identifican complejos del sustrato para identificar enzimas específicas con la

producción de colores distintivos. De manera significativa, en una forma de realización de la presente invención, el procedimiento y los medios de ensayo que incorporan la presente invención aprovechan el hecho de que los sustratos cromógenos presentes en un medio de ensayo no interfieren con el color sustancialmente negro producido por los sustratos no cromógenos.

- 5 El comportamiento de un sustrato no cromógeno en un medio que incluye la combinación de sustratos cromógenos es único. Para ilustrar, los agregados de una entidad biológica que son sensibles a dos sustratos cromógenos por lo general se presentarán en un medio de ensayo como una combinación de los dos colores producidos ante la escisión de los dos sustratos respectivos. Cuando están implicados tres sustratos cromógenos, como en otra forma de realización de la invención, el efecto de color combinado no es obvio que prediga y explique. Además,
- 10 variaciones inherentes en la cantidad de enzimas producidas por cepas específicas de entidades biológicas pueden dar como resultado o diferentes tonos o matices de colores en la escisión de los sustratos cromógenos. Por consiguiente, los colores pueden ser difíciles de distinguir por la persona lego que examina el medio de ensayo. Los sustratos cromógenos deben elegirse y usarse por lo tanto en una concentración a la vista de los demás sustratos cromógenos planeados para la inclusión en un medio de ensayo dado.
- 15 Tal no es el caso de los componentes no cromógenos. Aunque agregados de entidades biológicas que son sensibles a sustratos cromógenos además de sustratos no cromógenos pueden presentarse en el medio de ensayo que tienen un “halo” coloreado o fluorescente, dichos agregados no obstante aparecen sustancialmente negros y por consiguiente son fáciles de identificar. Se consiguen múltiples “grados de libertad” con los componentes no cromógenos.
- 20 El uso de un sustrato no cromógeno es una manera de permitir a un medio de ensayo individual que diferencie cuatro (4) diferentes cepas bacterianas con cuatro (4) colores distinguibles a simple vista. El color negro es difícil de confundir. Además, la pigmentación sustancialmente negra no se difunde de modo que la posición de las colonias se conoce con precisión y las colonias pueden contarse con precisión. Los sustratos no cromógenos producen un compuesto quelado insoluble que es diferente del dímero que es producido por los sustratos cromógenos.
- 25 El medio y el procedimiento de ensayo de la invención permite no solamente una detección, cuantificación o identificación cualitativa y diferenciación de coliformes generales y de *E. coli*, sino también de *Salmonella* y *Aeromonas*, así como *Plesiomonas* y *Vibrio*. Las especies *Plesiomonas* y *Vibrio* se determinan pero no se diferencian de la especie *Aeromonas* ya que están relacionadas muy íntimamente.

Definiciones

- 30 Las entidades biológicas, tales como coliformes generales, *E. coli*, etc., se dice en la presente memoria que son “sensibles” a determinados sustratos cromógenos y no cromógenos. Más específicamente, una entidad biológica producirá de manera predecible enzimas específicas cuando la entidad está presente en un medio de ensayo tal como en el descrito a continuación en la presente. Estas enzimas escindirán selectivamente sustratos cromógenos y no cromógenos. En la escisión estos sustratos producen un color en el medio de ensayo. El mecanismo para
- 35 producir el color es diferente para los sustratos cromógenos y no cromógenos, como se describe a continuación en la presente memoria.

Los microorganismos con actividad de β -galactosidasa incluyen los conocidos comúnmente por la denominación de “coliforme”. Existen varias definiciones de “coliforme”, pero las generalmente aceptadas incluyen bacterias que son miembros de la familias de las *Enterobacteriaceae*, y tienen capacidad para fermentar el azúcar lactosa con la

40 producción de gas y ácido. La mayoría de las coliformes son positivas tanto para α - como para β -galactosidasa. Es decir, producen ambas α - y β -galactosidasas.

Los microorganismos con actividad de β -glucuronidasa además de actividad de galactosidasa incluyen principalmente la mayoría de la cepas de *Escherichia coli*. Es decir, *E. coli* es positiva tanto para α - como para β -galactosidasa así como para β -glucuronidasa.

- 45 La expresión “coliformes generales” tal como se usa en esta solicitud se refiere a otras coliformes aparte de varias cepas de *E. coli*. Estos coliformes generales son gram-negativos, microorganismos que no forman esporas generalmente con actividad de α - y β -galactosidasa (es decir, fermentadores de lactosa), pero que no tienen actividad de β -glucuronidasa, y con capacidad para fermentar el azúcar sorbitol.

- 50 Para la presente memoria, un “sustrato cromógeno” es un sustrato que no necesita productos químicos adicionales presentes en el medio de ensayo durante la hidrólisis para la producción de color. Es decir, un sustrato cromógeno es escindido por la enzima específica correspondiente al sustrato para formar un dímero con el color que está concentrado en el área de escisión del sustrato. Se conocen muchos sustratos cromógenos en la materia. A título de la presente memoria “cromógeno” incluye sustratos fluorógenos. Los productos de los sustratos fluorógenos necesitan luz ultravioleta (UV) para ser detectados y son más solubles en agua que otros sustratos cromógenos.

- 55 Determinados sustratos, denominados en la presente memoria “no cromógenos”, producen un precipitado oscuro, sustancialmente negro en presencia de iones de una sal y actividad enzimática. Por ejemplo, el 8-hidroxiquinolina- β -D-glucurónido, cuando está incluido en un medio junto con una sal que produce iones, tal como el citrato férrico y

amónico, producirá un precipitado sustancialmente negro en presencia de β -glucuronidasa producida por *E. coli* u otras entidades biológicas. Más específicamente, durante la escisión del sustrato no cromógeno por la enzima específica, se forma en el medio un complejo insoluble en agua sustancialmente negro. El precipitado sustancialmente negro consta de los iones férricos y del aglucón liberado cuando el sustrato es hidrolizado por la glucuronidasa de *E. coli*. Este precipitado es un compuesto quelado que no se difunde. Ni es el color sustancialmente negro susceptible a interferencias de los compuestos cromógenos presentes en el medio de ensayo.

Para los fines de la presente memoria, un “sustrato no cromógeno” significa que un producto químico además de los usados con los componentes cromógenos deber estar presente en el medio de ensayo cuando el sustrato es escindido por su enzima correspondiente. El precipitado sustancialmente negro formado de éste modo es una combinación del complejo sustrato-sal y no es un dímero en cuanto que está formado por los “compuestos cromógenos”.

Para los fines de la presente memoria, la expresión “a la luz ambiental” se refiere al espectro visible, es decir, los colores que pueden verse y distinguirse a simple vista. Una colonia presente en un medio de ensayo que necesita luz ultravioleta para ser vista, por ejemplo, no estaría comprendida en la definición “a la luz ambiental”. Sin embargo, debe sobreentenderse que la expresión “a la luz ambiental” incluye el uso de un dispositivo de ampliación, si fuera necesario. La ampliación puede ser especialmente útil en el recuento de numerosas colonias. La expresión “distingible a simple vista” se refiere a dos o más colores que pueden diferenciarse a la luz ambiental.

Para los fines de la presente memoria, la expresión “sustancialmente negra” indica de pardo oscuro a negro, e incluye además negro con varios halos coloreados, tal como rojo-violeta, verde, fluorescente, etc.

Para otros fines de la presente memoria, los nombres de los colores citados en la presente memoria se dan a modo de directriz, pero debe sobreentenderse que los nombres de los colores deben ser leídos en sentido amplio. Es decir, pueden solaparse entre los colores citados. Esto es porque como se expuso, las entidades biológicas producen colores variables de enzimas, que a su vez afecta el tono o el matiz del color resultante.

La expresión “sustrato de β -galactosidasa” tal como se usa en la presente memoria se refiere a β -galactósido que comprende galactosa unida por enlace β a un sustituyente que forma un compuesto detectable cuando se libera por la acción de β -galactosidasa en el sustrato. Del mismo modo, la expresión “ α -galactosidasa” tal como se usa en la presente memoria se refiere a un α -galactósido que comprende galactosa unida por un enlace α a un sustituyente que forma un compuesto detectable cuando se libera por la acción de α -galactosidasa en el sustrato. La expresión “sustrato de β -glucuronidasa” tal como se usa en la presente memoria se refiere a un β -glucurónido que contiene ácido glucurónido unido por enlace β a un sustituyente que forma un precipitado detectable cuando se libera por la acción de β -glucuronidasa en el sustrato.

Los sustratos de α - y β -galactosidasa y los compuestos y cualquier otro sustrato descrito en la presente memoria, así como los sustratos de β -glucuronidasa y los compuestos y cualquier otro sustrato descrito en la presente memoria pueden comprender las sales de carboxilato formadas al hacer reaccionar una base adecuada con el galactósido o el grupo carboxilo glucurónico adecuado. Las bases adecuadas incluyen los hidróxidos o carbonatos de metales alcalinos o alcalinotérreos, por ejemplo, hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido cálcico, hidróxido de magnesio y los carbonatos correspondientes; y bases nitrogenadas tales como amoniaco y alquilaminas tales como trimetilamina, trietilamina y ciclohexilamina.

Diseño de un medio de ensayo para entidades biológicas específicas

Determinados miembros de la familia de las *Enterobacteriaceae* pueden distinguirse por la presencia de actividad de α -galactosidasa en ausencia de actividad de β -galactosidasa o viceversa. Por ejemplo, la mayoría de *Salmonella* y *Shigella spp.* son positivas para α -galactosidasa pero negativas para β -galactosidasa. Del mismo modo, las *Aeromonas spp.* pueden distinguirse de otros miembros de la familia de las *Enterobacteriaceae* por la presencia de actividad de β -galactosidasa en ausencia de actividad de α -galactosidasa. El procedimiento y el medio que incorpora la presente invención se diseñan para aprovechar éstas características que las distinguen. Por ejemplo, la especificidad de la actividad enzimática para *Salmonella* y *Aeromonas spp.*, al contrario que las coliformes generales, puede aprovecharse, como se ilustra a continuación.

El procedimiento descrito en la presente memoria es particularmente adecuado para la detección, cuantificación o identificación cualitativa y la diferenciación de las diferentes clases de microorganismos descritos anteriormente, esto es, coliformes generales, *E. coli*, *Aeromonas* y *Salmonella*. Aunque el procedimiento de la invención es particularmente adecuado para estos microorganismos específicos, no se limitan a los mismos. En su lugar, las técnicas descritas en la presente memoria tienen aplicación a la identificación y diferenciación de una amplia variedad de entidades biológicas.

Es decir, las entidades biológicas son “sensibles” a varios sustratos. Más específicamente, estas entidades biológicas producen de manera predecible o contienen enzimas conocidas. Los sustratos, ya sean cromógenos o no cromógenos, pueden seleccionarse, los cuales en presencia de una(s) enzima(s) específica(s), formará un producto de un color predecible y distinguible. Pueden seleccionarse múltiples sustratos para identificar simultáneamente una

5 multitud de entidades biológicas distintas (coliformes generales, *E. coli*, *Aeromonas* y *Salmonella*) en un único medio de ensayo, siendo identificables los agregados de cada entidad distinta por un color independiente, distinguible. Además, aunque determinadas formas de realización dadas a conocer en la presente memoria distinguen todos los diversos agregados presentes en un medio de ensayo a la luz ambiental, ya que éste termino está definido en la presente memoria, varios sustratos dados a conocer en la presente memoria requieren el uso de luz ultravioleta para que se vean los agregados presentes en el medio, y según la presente invención, el medio de ensayo incluye un sustrato fluorógeno de α -D-galactosidasa o un sustrato de β -D-galactosidasa.

La Tabla I enumera varias enzimas cuya presencia puede detectarse usando determinados sustratos enumerados en la Tabla II.

10

Tabla I

| Enzimas y abreviaturas | |
|---------------------------------------|--|
| Aara= α -D-arabinopiranosidasa | Bglu= β -D-glucopiranosidasa |
| Agal= α -D-galactopiranosidasa | Bgluc= β -D-glucuronidasa |
| Aglu= α -D-glucopiranosidasa | Bman= β -D-manopiranosidasa |
| Bcel= β -D-celopiranosidasa | Bxil= β -D-xilopiranosidasa |
| Bfuc= β -D-fucopiranosidasa | Nagal=N-acetil- β -D-galactopiranosidasa |
| Bgal= β -D-galactopiranosidasa | Naglu=N-acetil- β -D-glucopiranosidasa |
| Afuc= α -D-fucopiranosidasa | Bara= β -D-arabinopiranosidasa |
| Bxil= β -D-xilopiranosidasa | Acel= α -D-celopiranosidasa |
| Aman= α -D-manopiranosidasa | Agluc= α -D-glucopiranosidasa |
| Axil= α -D-xilopiranosidasa | Naglu=N-acetil- β -D-glucuronidasa |
| esterasa | |

Tabla II

| Varios sustratos y color durante la escisión | |
|---|-----------------------|
| Sustratos de 6-cloro-3-indolilo | Rosa |
| Sustratos de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo | Verde azulado |
| Sustratos de 3-indolilo | Verde azulado |
| Sustratos de N-metilindolilo | Verde |
| Sustratos de nitrofenilo | Amarillo |
| Sustratos de nitroanilina | Amarillo |
| Sustratos de 8-hidroxiquinolina (e ión de sal) | Sustancialmente negro |
| Sustratos de ciclohexenoesculetina (e ión de sal) | Sustancialmente negro |
| Sustratos de esculetina (e ión de sal) | Sustancialmente negro |
| Sustratos de quinolina (e ión de sal) | Sustancialmente negro |
| Sustratos de 5-yodo-3-indolilo | Púrpura |

(continuación)

| | |
|--|--------------|
| Varios sustratos y color durante la escisión | |
| Sustratos de 5-bromo-6-cloro-3-indolilo | Magenta |
| Sustratos de 6-fluoro-3-indolilo | Rosa |
| Sustratos de cumarina | Fluorescente |
| Sustratos de fluoresceína | Fluorescente |
| Sustratos de rodamina | Fluorescente |
| Sustratos de resorcina | Fluorescente |

Compuestos de sustratos específicos aplicables para su uso con el medio de ensayo de la presente invención están disponibles de la forma siguiente:

- 5 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) es un sustrato de β -galactosidasa disponible en el mercado que produce un precipitado insoluble que tiene un color aproximadamente verde azulado cuando se hace reaccionar por β -galactosidasa y está disponible en *Biosynth International*, Naperville, IL.
6-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido es un compuesto que produce un precipitado insoluble que tiene un color magenta, cuya preparación está descrita en la patente de EE.UU. n° 5.210.022 mencionada anteriormente
10 incorporada por referencia y está disponible en *Research Organics*, Cleveland, OH.

15 El compuesto 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido (X-gluc) es un β -glucurónido disponible en el mercado que produce un precipitado insoluble que tiene un color aproximadamente verde azulado cuando se hace reaccionar por la β -glucuronidasa. Del mismo modo, el indoxil- β -glucurónido es un compuesto similar, cuya preparación se describe en el artículo mencionado anteriormente de Ley *et al.*, en *Can. J. Microbiol.*, cuya descripción se incorpora por referencia.

Otro β -galactósido adecuado es el compuesto 6-cloro-3-indolil- β -D-galactósido que produce un precipitado insoluble que tiene un color rosa-magenta, cuya preparación está descrita en la patente de EE.UU. n° 5.210.022 mencionada anteriormente.

- 20 Otros compuestos adecuados aplicables como sustratos en la práctica de la presente invención se especifican en la patente de EE.UU. n° 5.210.022, todos los cuales se incorporan en la presente memoria por referencia.

El sustrato 8-hidroxiquinolina- β -D-glucurónido es un β -glucurónido disponible en el mercado que, en presencia de iones metálicos tales como hierro, produce un precipitado insoluble que tiene un color sustancialmente negro cuando se hace reaccionar por la β -glucuronidasa y en presencia de otros sustratos de α - o β -galactosidasa. El 8-hidroxiquinolina- β -D-glucurónido está disponible en *Biosynth International*, Naperville, IL.

- 25 Además, una sal que proporciona iones adecuados para su uso en la presente invención es el citrato férrico y amónico, disponible en Sigma-Chemical, St. Louis, MO. Los sustratos de ciclohexenoesculetina se describen en James *et al.*, *Appl & Envir. Micro.* 62:3868-3870 (1996) y en presencia de iones férricos, producen un precipitado insoluble sustancialmente negro.

- 30 Los sustratos de n-metil-indolilo tal como N-metilhidroxi- β -D-galactopiranosido están disponibles en el mercado en Biosynth International, Naperville, IL.

Los sustratos de nitrofenilo, tal como 2-nitrofenil- β -galactopiranosido están disponibles en el mercado en Biosynth International, Naperville, IL. Del mismo modo, los compuestos de nitroanilina están disponibles para la síntesis en Sigma Chemical, St. Louis, MO.

- 35 Otros sustratos que producen un color sustancialmente negro incluyen sustratos de esculetina tal como ciclohexenoculetin- β -D-galactósido, que está descrito en James *et al.*, *Appl & Envir. Micro.* 62:3868-3870 (1996). Los sustratos de quinolina, tal como 8-hidroxiquinolina- β -D-galactopiranosido y 8-hidroxiquinolina- β -D-glucurónido están disponibles en Biosynth International, Naperville, IL.

Los sustratos de yodo-indolilo, tal como 5-yodo-3-indolil- β -D-galactopiranosido están disponibles en Biosynth International, Naperville, IL.

- 40 Varios sustratos fluorescentes son adecuados para su uso en la presente invención. Los sustratos de cumarina tales como los sustratos de 4-metilumberiferilo y los sustratos de 5-trifluorometilum-beliferilo están disponibles en el mercado en Biosynth International, Naperville, IL. También son adecuados los sustratos de fluoresceína, los sustratos de rodamina y los sustratos de resorufina. No se conoce ninguna fuente comercial para estos tres

sustratos pero los componentes están disponibles en Sigma Chemical, sustituido. Louis, microorganismo..

Aunque se han enumerado anteriormente ejemplos específicos de sustratos adecuados para su uso en la presente invención, tales no deben considerarse como restrictivos de la invención en modo alguno. En su lugar, cualquier experto en la materia puede usar las tablas IV y V más adelante para identificar un número prácticamente ilimitado de sustratos.

Preparación del medio de ensayo

El medio de ensayo se forma al combinar los nitratos deseados con un medio a base de nutrientes. El medio a base de nutrientes puede ser cualquier medio conocido en la materia para proporcionar el mantenimiento y la reproducción de las células vivas. Generalmente, dicho medio incluye nutrientes, tampones, agua y a veces un agente gelificante. Los agentes gelificantes incluyen agar-agar, pectinas, carrageninas, alginatos, semilla de algarroba y xantinas, entre otros.

El siguiente es un ejemplo de la preparación de un medio de ensayo. Este ejemplo coincide con el ejemplo I, más adelante, y es un ejemplo de referencia.

Los sustratos 8-hidroxiquinolina- β -D-glucurónido, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido y 6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido se añaden en cantidades de 250 mg/l de medio; 70 mg/l de medio; y 175 mg/l de medio, respectivamente. Los sustratos se añaden directamente al medio caliente (75 °C-85 °C) (fórmula a continuación) en un mezclador antes de la esterilización.

Se puede preparar medio de agar-agar estándar añadiendo 15 g de goma agar-agar de calidad bacteriológica a la siguiente fórmula de nutriente

| | |
|--|-------------------------------------|
| Digesto pancreático de caseína | 5,0 g |
| Extracto de levadura | 3,0 g |
| Fosfato dipotásico | 0,3 g |
| Agua desionizada | 990 ml |
| Citrato férrico y amónico | 800 ml en 10 ml de agua desionizada |
| (esterilizada por separado de los demás componentes) | |

y a continuación esterilizando a 121 °C durante 15 minutos. El medio debería ajustarse para dar como resultado un pH de 7,0. El medio de agar-agar esterilizado se deja descender hasta una temperatura de 45 °C en un baño de agua y a continuación se añade la solución estéril que contiene los sustratos preparados como se describe anteriormente. El medio se mezcla intensamente y se vierte en placas petri estériles a un volumen de 20 ml/placa.

Un medio de ensayo a base de pectina puede prepararse usando las mismas etapas descritas anteriormente excepto que se usan 25 g de metoxil pectina baja como agente de solidificación y del medio se vierte a temperatura ambiente en placas petri que contienen una capa fina de gel que contiene iones de calcio que se combinan con la pectina para formar un gel sólido. Un medio de cultivo de pectina adecuado se describe en la patente de EE.UU. n° 4.241.186 y en la patente de EE.UU. n° 4.282.317, cuyas descripciones están incorporadas en la presente memoria por referencia. Se prefiere un medio a base de pectina a un medio de agar-agar normal porque presenta las ventajas de conveniencia e independencia de la temperatura para el usuario. El uso del medio de pectina está bien descrita y aceptada como resultado de los estudios en colaboración de la AOAC y otras investigaciones publicadas y de la misma organización.

Un medio de pectina adecuado está disponible en el mercado en Micrology Laboratories, LLC bajo la denominación comercial Easygel®. El medio acuoso sin el agente de gelificación está disponible en Micrology Labs, Goshen IN., para su uso con los filtros de membrana.

Inoculación del medio de ensayo con la muestra

El medio de ensayo puede inocularse con una muestra en la que debe probarse la presencia de microorganismos por cualquier procedimiento conocido en la materia para inocular un medio con una muestra que contiene microorganismos. Por ejemplo, la muestra que debe analizarse puede añadirse a las placas petri antes de añadir el medio a base de nutriente (técnica de la placa de vertido en la placa) o extender en la superficie de las placas después de que se hayan enfriado y solidificado (técnica de la extensión o del rayado de la placa). Las muestras líquidas pueden también filtrarse a través de una membrana de microporos (tamaño de 0,45 micrómetros) que se coloca a continuación sobre la superficie de un medio sólido o de una almohadilla saturada con el medio.

Incubación del medio de ensayo

El medio de ensayo inoculado se incuba durante un tiempo suficiente y a tal temperatura para que cada uno de los microorganismos presente en la muestra se desarrolle en colonias detectables. Las condiciones de incubación adecuadas para el crecimiento de los microorganismos en un medio son conocidos en la técnica. Normalmente, el medio de ensayo se incuba aproximadamente durante 24 a 48 horas a una temperatura de aproximadamente 30 °C a 40 °C. Puede ser necesario menos tiempo de incubación, tal como aproximadamente 14 horas, para obtener resultados para un sustrato fluorescente.

A menos que se usen inhibidores de la población microbacteriana general, la población microbiana general así como los coliformes generales, *E. coli*, *Aeromonas spp.* y *Samonella spp.* y *Shigella spp.* crecerán en el medio de ensayo incubado. Debido a que los precipitados formados son insolubles (excepto para los sustratos fluorógenos) en el medio de ensayo, permanecen en la proximidad inmediata de los microorganismos que producen las diversas enzimas. Como los microorganismos se reproducen para formar colonias, las colonias se presentan como unidades formadoras de colonias con el color producido por el sustrato específico.

Por ejemplo, *E. coli*, produce β -galactosidasa y α -galactosidasa, pero, a diferencia de las coliformes generales y de *Aeromonas spp.*, también produce β -glucuronidasa. Por lo tanto, los precipitados insolubles de cada uno de los sustratos de β -galactosidasa, el sustrato de α -galactosidasa y el sustrato no cromógeno β -glucurónido se forman por la acción de las enzimas respectivas de modo que las colonias de *E. coli* presentan como un color sustancialmente negro, teniendo a veces un halo violeta-azul alrededor de ellas.

Los coliformes generales producen β -galactosidasa y α -galactosidasa y por consiguiente ambos escinden ambos sustratos de α -galactosidasa y β -galactosidasa. En el presente ejemplo de referencia, el sustrato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactósido produce un color verde cerceta o cerceta, mientras que el 6-cloro-3-indolil- β -D-galactósido produce un color rosado o un color rojo rosado. Así, las colonias de coliforme generales presentarán un color azul-violeta, que es una combinación de los colores producidos por cada uno de los α - y β -galactósidos respectivamente.

De manera significativa, sin embargo, *Aeromonas spp.*, que están íntimamente relacionadas con los coliformes y dan un modelo de ensayo bioquímico y casi idéntico, son β -galactosidasa positiva y α -galactosidasa negativa. Es decir, *Aeromonas spp* no hidrolizarán el sustrato α -galactósido. Por lo tanto, las colonias de *Aeromonas* presentes en el medio de ensayo se presentarán como colonias con color rosa-rojo producido por el sustrato β -galactósido.

Además, los miembros del género *Samonella* son positivos para el género α -galactosidasa, pero negativos para β -galactosidasa. Es decir, *Samonella* no hidrolizará el sustrato de β -galactosidasa. Por lo tanto, las colonias de *Samonella* presentes en el medio de ensayo aparecerán con un color cerceta o verde cerceta producido por el sustrato de α -galactósido.

Examen del medio de ensayo y enumeración de microorganismos

Los sustratos seleccionados para el ejemplo de referencia anterior producen tres colores distintos, y los coliformes generales están indicados por un cuarto color que es una combinación de dos de los tres colores. Es decir, las colonias de *E. coli* se presentan como sustancialmente negras, las colonias de coliformes generales se presentan como azul-violeta, las colonias de *Aeromonas* se presentan como rojo-rosado y las colonias de *Samonella* se presentan como verde cerceta. Aunque cada uno de los tonos de estos colores pueden variar algo en el medio de ensayo debido a factores tales como la producción variable de enzimas de las entidades biológicas, estos cuatro colores son lo suficientemente distintos de modo que la confusión entre ellos es poco probable.

Las colonias de cada tipo de microorganismos pueden enumerarse por el recuento de las colonias o por otros procedimientos conocidos en la técnica para enumerar los microorganismos de una placa de ensayo. El número de colonias de cada placa indica generalmente el número de microorganismos para cada tipo originalmente presente en la muestra antes de la incubación.

45 Ingredientes opcionales

Inhibidores

El procedimiento de la presente invención no necesita inhibidores. Sin embargo el medio puede hacerse más selectivo para coliformes generales y la *E. coli* deseada por la adición de varios compuestos que son inhibidores para la población microbiana general, pero tienen poco o ningún efecto sobre coliformes. Los siguientes son compuestos que pueden usarse: a) sales biliares, aproximadamente 0,3g/l, b) lauril sulfato sódico, aproximadamente 0,2 g/l, c) desoxicolato sódico, aproximadamente 0,2g/l, d) Tergitol 7, aproximadamente 0,1 g/l. El uso de uno o más de estos compuestos reduce la presencia de microorganismos de fondo (no coliformes) y hace una placa menos abarrotada y elimina la posibilidad de inhibición o interferencia por los organismos no coliformes en la muestra. El uso de determinados antibióticos puede conseguir el mismo resultado.

55 La cefsulodina se usa frecuentemente en medios de ensayo actualmente disponibles para inhibir *Aeromonas spp.*

Sin embargo, el uso de cefsulodina como inhibidor requiere una etapa más en el proceso, esto es, la adición estéril de antibióticos esterilizados en el filtro. Esta etapa es difícil de controlar. Además, la presencia de cefsulodina reduce significativamente la estabilidad eficaz del medio. Puede usarse ácido nalidíxico en lugar de cefsulodina para inhibir *Aeromonas spp.* con aproximadamente la misma eficacia. Es preferible el ácido nalidíxico porque puede sobrevivir a la temperatura de 120 °C aproximadamente alcanzada en la esterilización en autoclave del medio de ensayo. Por lo tanto, a diferencia de la cefsulodina, puede añadirse ácido nalidíxico al medio de ensayo como parte de una formulación del medio inicial antes de la esterilización (véase, la preparación del medio de ensayo, anteriormente). También se deduce que la resistencia del ácido nalidíxico a las condiciones medioambientales desfavorables dará como resultado una estabilidad más larga para un medio que lo contiene en comparación con la cefsulodina.

10 Inductores

Es posible que la producción enzimática de los coliformes generales pueda aumentarse por adición a las formulaciones del medio de cantidades muy pequeñas de sustancias conocidas como inductores enzimáticos. Un inductor específico para β -galactosidasa está disponible y es clínicamente conocido como isopropil- β -tiogalactopiranosido. Añadiendo aproximadamente 100 mg/litro de medio tiene un efecto positivo y apreciable sobre la velocidad de la producción enzimática para algunas especies de coliformes. Otros inductores enzimáticos están disponibles y pueden añadirse a las formulaciones del medio si se considera útil el aumento de producción enzimática.

Ejemplos y ejemplos de referencia

A continuación se listan ejemplos de referencia (ejemplos 1 a 16) y un ejemplo según la invención (ejemplo 17) de las combinaciones del sustrato enzimático del medio de ensayo que deben usarse en combinación con la fórmula de nutriente expuesta anteriormente u otras fórmulas de nutrientes adecuadas que pueden prepararse en la práctica de la presente invención.

La tabla III es una matriz de algunas de las posibles combinaciones de cuatro colores disponibles para las entidades biológicas preferidas *E. coli*, coliformes generales, y al menos uno de los géneros *Aeromonas* o *Samonella* que van a detectarse usando la presente memoria. Otras combinaciones de color son posibles. En muchos casos, una multitud de diferentes sustratos conseguirá un resultado deseado, siendo la única diferencia los colores detectados para una enzima específica. La selección de color preferida para la detección de *E. coli* se indica con un asterisco en la tabla III, dependiendo de los colores seleccionados para detectar otros microorganismos. Como se expuso anteriormente, otros sustratos cromógenos no interfieren con el color sustancialmente negro, y el color sustancialmente negro es fácil de distinguir de los demás colores.

Como se expuso anteriormente, el uso de la tabla III requiere tener en cuenta el efecto de color combinado expuesto anteriormente que se produce por la inclusión de múltiples sustratos cromógenos en un solo medio. Por ejemplo, con referencia a la primera entrada en la tabla III, puede sobreentenderse que los coliformes generales aparecerán como una combinación de (1) rojo-rosado (magenta) y (2) verde cerceta, siendo el color resultante azul-violeta. Éste es el caso porque los coliformes generales son sensibles a dos sustratos cromógenos. Del mismo modo, los coliformes generales se presentarán en un medio de ensayo de acuerdo con la segunda entrada de la tabla III como una combinación de (1) rojo-rosado (magenta) y (2) amarillo.

Tabla III

| Posibilidades de colores para la detección de microorganismos preferidos | | | | | | | | | | |
|--|---|---|---------------------------------------|---|---------------------------------------|--------------|--------------|---|----------------------|------------------|
| color deseado* | rojo-rosado o magenta | verde cerceta | verde | amarillo | negro | fluorescente | fluorescente | fluorescente | azul oscuro/ púrpura | azul claro/ gris |
| 1 | coliformes generales <i>Aeromonas</i> | coliformes generales <i>Samonella</i> * | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | | | <i>E. coli</i> | | |
| 2 | coliformes generales <i>Aeromonas</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | coliformes generales <i>Samonella</i> * | <i>E. coli</i> | | | <i>E. coli</i> | | |
| 3 | <i>E. coli</i> | coliformes generales <i>Aeromonas</i> | <i>E. coli</i> | coliformes generales <i>Samonella</i> * | <i>E. coli</i> | | | <i>E. coli</i> | | |
| 4 | coliformes generales <i>Samonella</i> * | <i>E. coli</i> | coliformes generales <i>Aeromonas</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | | | <i>E. coli</i> | | |
| 5 | <i>E. coli</i> | coliformes generales <i>Samonella</i> * | coliformes generales <i>Aeromonas</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | | | <i>E. coli</i> | | |
| 6 | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | coliformes generales <i>Aeromonas</i> | coliformes generales <i>Samonella</i> * | <i>E. coli</i> | | | <i>E. coli</i> | | |
| 7 | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | coliformes generales <i>Aeromonas</i> | | | <i>E. coli</i> | | |
| 8 | coliformes generales <i>Aeromonas</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | | | coliformes generales <i>Samonella</i> * | | |
| 9 | <i>E. coli</i> | coliformes generales <i>Aeromonas</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | | | coliformes generales <i>Samonella</i> * | | |

(continuación)

| Posibilidades de color para la detección de microorganismos preferidos | | | | | | | | | | |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|----------------|----------------------|
| color deseado* | rojo-rosado o magenta | verde cerceta | verde | amarillo | negro | fluorescente | fluorescente | fluorescente | fluorescente | |
| 10 | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | coliformes generales <i>Aeromonas</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | coliformes generales <i>Samonella</i> * | <i>E. coli</i> | | | |
| 11 | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | coliformes generales <i>Aeromonas</i> | <i>E. coli</i> | coliformes generales <i>Samonella</i> * | <i>E. coli</i> | | | |
| 12 | coliformes generales <i>Aeromonas</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | coliformes generales <i>Samonella</i> * | <i>E. coli</i> | | | | |
| 13 | <i>E. coli</i> | coliformes generales <i>Aeromonas</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | coliformes generales <i>Samonella</i> * | <i>E. coli</i> | | | | |
| 14 | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | coliformes generales <i>Aeromonas</i> | <i>E. coli</i> | coliformes generales <i>Samonella</i> * | <i>E. coli</i> | | | | |
| 15 | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | coliformes generales <i>Aeromonas</i> | coliformes generales <i>Samonella</i> * | <i>E. coli</i> | | | | |
| 16 | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | coliformes generales <i>Aeromonas</i> | coliformes generales <i>Samonella</i> * | | |
| 17 | <i>Aeromonas</i> | <i>Samonella</i> | | | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> | | | <i>E. coli</i> | coliformes generales |

* Puede presentarse también *Shigella* en este color.

La tabla IV es una lista parcial de los modelos enzimáticos para entidades biológicas preferidas que deben ser detectadas según las enseñanzas de esta descripción. Debe sobreentenderse que cualquier experto en la materia reconocería fácilmente que otras enzimas que son conocidas y han sido producidas y las enzimas que son conocidas solamente a nivel teórico se realizarían también satisfactoriamente.

5

Tabla IV

| DENOMINACIÓN DE LA ENZIMA | <i>E. coli</i> | COLIFORMES GENERALES | <i>Aeromonas</i> | <i>Samonella</i> | <i>Plesiomonas</i> | <i>Vibrio</i> |
|---|----------------|----------------------|------------------|------------------|--------------------|---------------|
| Aara= α -D-arabinopiranosidasa | + | + | - | + | | |
| Agal= α -D-galactopiranosidasa | + | + | - | + | | |
| Aglu= α -D-glucopiranosidasa | - | + | + | - | + | |
| Bccl= β -D-celopiranosidasa | - | + | - | - | - | - |
| Bfuc= β -D-fucopiranosidasa | + | + | + | - | - | - |
| Bgal= β -D-galactopiranosidasa | + | + | + | - | + | + |
| Bgluc= β -D-glucopiranosidasa | + | + | + | - | - | - |
| Bgluc= β -D-glucopiranosidasa | + | - | - | - | - | - |
| Bman= β -D-manopiranosidasa | + | + | - | + | + | + |
| Bxyl= β -D-xilopiranosidasa | - | + | - | - | | |
| Nagal= N-acetil- β -D-glucopiranosidasa | - | + | + | - | + | + |
| Naglu= N-acetil- β -D-glucopiranosidasa | - | + | + | - | + | + |
| Aman= α -D-glucopiranosidasa | - | - | - | - | - | - |
| esterasa=esterasa | - | - | - | + | - | - |

La tabla V es una matriz que da a conocer una amplia variedad de sustratos y sus colores asociados para su uso en el medio de ensayo según lo dado a conocer en esta exposición. La parte izquierda de la tabla V indica el color que resultará cuando el componente cromógeno listado se escinde de su correspondiente sustrato por la enzima específica para este sustrato. En el caso de los componentes no cromógenos, el color es sustancialmente negro y el mecanismo de reacción requiere la presencia de iones de una sal durante la escisión del sustrato, como se explicó anteriormente.

10

Las enzimas de ensayo que son producidas por determinadas entidades biológicas (véase la tabla IV) se encuentran en el lado derecho de la tabla V. "Componentes del sustrato" se muestran a la izquierda de las enzimas de ensayo específicas. Cada uno de los componentes del sustrato listados en el lado derecho de la tabla V puede combinarse con cualquiera de los componentes cromógenos o no cromógenos listados en el lado izquierdo de la tabla V para identificar un sustrato específico para su uso en un medio de ensayo. Por consiguiente puede sobreentenderse que la tabla V indica una gran cantidad de sustratos posibles para usar de acuerdo con la presente invención. Muchos de los sustratos identificados por el uso descrito anteriormente de la tabla V están disponibles en el mercado, mientras que el procedimiento para producir otros sustratos identificados se describe en la bibliografía. Todavía otros

15

20

sustratos identificados para usar la tabla V son sólo teóricamente posibles.

Componentes no cromógenos están incluidos en el lado izquierdo al final de la tabla V, y son diferentes de los componentes cromógenos porque no forman colores específicos en la escisión. En su lugar, los componentes de quinolina o esculetina se combinan con iones de una sal (por ejemplo, sal férrica) que debe estar presente en el medio cuando el sustrato es escindido por la enzima específica. El precipitado sustancialmente negro formado por los componentes no cromógenos es una combinación del complejo quinolina o esculetina-hierro en lugar de un dímero que está formado por los componentes cromógenos.

A diferencia de los componentes no cromógenos, los componentes cromógenos deberían seleccionarse en vista de todos los demás componentes cromógenos seleccionados para el medio y en vista de los modelos enzimáticos de las entidades que deben detectarse. La selección y composición de los componentes cromógenos maximizaría la distinción entre los respectivos colores producidos.

Aunque en la tabla V están indicadas muchas posibilidades diversas de componente cromógeno y componente del sustrato/enzima, otras posibilidades dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas serían posibles para cualquier experto en la materia. Por ejemplo, como se muestra en la tabla V, cualquier experto en la materia podría combinar un grupo N-acetilo con muchos de los azúcares de los componentes del sustrato relacionados en la tabla V. Por ejemplo, un grupo N-acetilo podría combinarse con β -D-manopiranosido para formar N-acetil- β -D-manosaminida, siendo la enzima correspondiente la N-acetil- β -D-manosaminidasa. Alguno de los componentes cromógenos o de los componentes no cromógenos enumerados en el lado izquierdo de la tabla V podría combinarse a continuación con un componente del sustrato para identificar un sustrato. Si el sustrato está disponible en el mercado o el procedimiento de prepararlo se conoce, el sustrato podría usarse en un medio de ensayo. En la escisión del sustrato por la enzima correspondiente en el medio de ensayo, aparecerá el color listado.

Generalmente, las enseñanzas de este descubrimiento pueden usarse a continuación para preparar un medio de ensayo destinado a detectar varios microorganismos o tipos de células. En primer lugar, se seleccionan los microorganismos deseados que han de detectarse y diferenciarse. Los organismos preferidos que deben detectarse son *E. coli*, coliformes generales y los géneros *Aeromonas* y *Samonella*. Las enzimas producidas por los organismos seleccionados pueden identificarse con referencia a la tabla IV. Equipado con el conocimiento de las enzimas específicas producidas por cada microorganismo, se puede identificar a continuación los correspondientes componentes de los sustratos en el lado derecho de la tabla V. Dependiendo del color deseado, se puede seleccionar un componente cromógeno o no cromógeno de la tabla V para combinarse con el componente del sustrato para identificar un sustrato para su inclusión en el medio de ensayo. Si el sustrato identificado de este modo está disponible en el mercado o se conoce el procedimiento de su síntesis, puede usarse el sustrato en el medio de ensayo.

Tabla V

| Matriz del componente de color y del componente del sustrato | | |
|--|----------------|--|
| COMPONENTE CROMÓGENO Y | (COLOR) | COMPONENTE DEL SUSTRATO – ENZIMA DE ENSAYO |
| 6-fluoro-3-indolil- | (rosa) | α -D-arabinopiranosido – Ara. |
| 6-cloro-3-indolil- | (rojo-rosa) | α -D-celopiranosido – Acel. |
| 5-bromo-6-cloro-3-indolil- | (magenta) | α -D-fucopiranosido – Afuc. |
| 3-indolil- | (cerceta) | α -D-galactopiranosido – Agal. |
| 5-bromo-4-cloro-3-indolil- | (cerceta) | α -D-glucurónido – Agluc. |
| 5-yodo-3-iodolil- | (púrpura) | α -D-manopiranosido – Aman. |
| N-metilindolil- | (verde) | α -D-xilopiranosido – Axil. |
| 4-metilumbeliferil- | (fluorescente) | β -D-arabinopiranosido – Bara. |
| rodamina- (| fluorescente) | β -D-celopiranosido – Bcel. |
| fluoresceína- | (fluorescente) | β -D-fucopiranosido – Bfuc. |
| resorufina- | (fluorescente) | β -D-galactopiranosido – Bgal. |
| cumarina- | (fluorescente) | β -D-glucopiranosido – Bglu. |
| nitrofenil- | (amarillo) | β -D-glucoronido – Bgluc. |
| nitroanelina (amarillo) | | β -D-manopiranosido – Bman. |

(continuación)

| Matriz del componente de color y del componente del sustrato | |
|--|---|
| COMPONENTE NO CROMÓGENO (COLOR) | β-D-xilopiranosido – Bxil. |
| 8-hidroxiquinolina más iones- (sustancialmente negro) | N-acetil-β-D-galactosaminida-Nagal |
| 3,4-cicloenoesculetina más iones (sustancialmente negro) | N-acetil-β-D-glucosaminida-Naglu |
| esculetina más iones- (sustancialmente negro) | N-acetil-β-D-glucuronaminida-Naglu |
| | N-acetil + otros componentes azucarados |
| | butirato - esterasa |
| | caprilato – esterasa |
| | palmitato- esterasa |

La tabla VI es un compendio conciso de los ejemplos específicos. Los ejemplos XXII y XXIII son ejemplos de la presente invención, mientras que los ejemplos I a XXI y XXIV a XXVI son ejemplos de referencia.

5

Tabla VI – Compendios del ejemplo

| Ejemplo nº | Sustrato | <i>E. coli</i> | Coliformes generales | <i>Aeromonas</i> | <i>Salmonella</i> * |
|------------|---|----------------|----------------------|------------------|---------------------|
| I | 8-hidroxiquinolina-β-D-glucurónido | X | | | |
| | 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido | X | X | X | |
| | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido | X | X | | X |
| | color→ | Negro | Púrpura-azul | Rosa | Verde cerceta |
| II | 8-hidroxiquinolina-β-D-glucurónido | X | | | |
| | 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido | X | X | X | |
| | 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido | X | X | | X |
| | 6-cloro-3-indolil-β-D-manósido | | | | |
| | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido | X | X | | X |
| | color→ | Negro | Púrpura-azul | Rojo-rosado | Púrpura-azul |
| IIIA | 8-hidroxiquinolina-β-D-glucurónido | X | | | |
| | 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido | X | X | X | |
| | 6-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido | X | X | | X |
| | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido | X | X | X | |
| | color→ | Negro | Púrpura-azul | Púrpura-azul | Rosa |

(continuación)

| Ejemplo nº | Sustrato | E. coli | Coliformes generales | Aeromonas | Salmonella* |
|------------|--|--------------|----------------------|--------------|---------------|
| IIIB | 8-hidroxiquinolina-β-D-glucurónido | X | | | |
| | 6-cloro-3-indolil-β-Dgalactopiranosido | X | X | | X |
| | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido | X | X | X | |
| | 5-bromo-4-cloro-β-indolil-D-galactopiranosido | X | X | X | |
| | color→ | Negro | Púrpura-azul | Púrpura-azul | Verde-cerceta |
| IIIC | Puede eliminar <i>Aeromonas</i> con inhibidores que permiten eliminación de 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido de los ejemplos IIIA y IIIB | | | | |
| IV | 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido | X | X | X | |
| | 6-cloro-3-indolil-β-D-manosido | X | X | | X |
| | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido | X | X | | X |
| | color→ | Púrpura-azul | Púrpura-azul | Rosa | Púrpura-azul |
| V-A | 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido | X | X | X | |
| | 6-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido | X | X | | X |
| | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido | X | X | X | |
| | color→ | Púrpura-azul | Púrpura-azul | Púrpura-azul | Rosa |
| V-B | 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido | X | X | X | |
| | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido | X | X | | X |
| | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido | X | X | X | |
| | color→ | Púrpura-azul | Púrpura-azul | Púrpura-azul | Verde-cerceta |
| V-C | Puede eliminar <i>Aeromonas</i> con inhibidores que permiten eliminación de sustrato nº 1 del ejemplo V-A y permite la eliminación del sustrato nº 3 del ejemplo V-B | | | | |

(continuación)

| Ejemplo nº | Sustrato | E. coli | Coliformes generales | Aeromonas | Salmonella* |
|------------|---|--------------|----------------------|-------------------|---------------|
| VI | 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido | X | X | | X |
| | 6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido | X | X | X | |
| | color→ | Púrpura-azul | Púrpura-azul | Rosa | Verde-cerceta |
| VII | 8-hidroxiquinolina- β -D-glucurónido | X | | | |
| | 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido | X | X | | X |
| | 6-cloro-3-indolil-N-acetil- β -D-galactomínido | | X | X | |
| | Nota: En el ejemplo 7, <i>Vibrio</i> y <i>Plesiomonas</i> se muestran también rosa junto con <i>Aeromonas</i> color→ | Negro | Púrpura-azul | Rosa (véase nota) | Verde-cerceta |
| VIII | 8-hidroxiquinolina- β -D-glucurónido | X | | | |
| | 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido | X | X | | X |
| | 6-cloro-3-indolil- β -D-manósido | X | X | | X |
| | 6-cloro-3-indolil-N-acetil- β -D-galactopiranosido | | X | X | |
| | color→ | Negro | Púrpura-azul | Rosa (véase nota) | Púrpura-azul |
| | Nota: En el ejemplo 8, <i>Vibrio</i> y <i>Plesiomonas</i> también se muestran rosa junto con <i>Aeromonas</i> | | | | |
| IX | 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido | X | X | | X |
| | 6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido | X | X | X | |
| | 6-cloro-3-indolil-N-acetil- β -D-galactopiranosido | | X | X | |
| | color→ | Púrpura-azul | Púrpura-azul | Rosa | Verde-cerceta |

(continuación)

| Ejemplo nº | Sustrato | E. coli | Coliformes generales | Aeromonas | Salmonella* |
|------------|---|--|----------------------|-------------------|----------------------|
| X | 6-cloro-3-indolil-N-acetil-β-D-galactopiranosido | | X | X | |
| | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido | X | X | | X |
| | 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido | X | X | X | |
| | Nota: En el ejemplo 10, <i>Vibrio</i> y <i>Plesiomonas</i> también presentan color→ rosa junto con <i>Aeromonas</i> | Púrpura-azul | Púrpura-azul | Rosa (véase nota) | Verde-cerceta |
| | 8-hidroxiquinolina-β-D-galactopiranosido | X | | | |
| XI | 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (o) 5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido | X X | X X | X X | |
| | Nota: En el ejemplo 11, <i>Aeromonas</i> puede eliminarse añadiendo inhibidores de color→ | Negro | Rosa o Verde-cerceta | Rosa o cerceta | No detectado |
| XII | 8-hidroxiquinolina-β-D-galactopiranosido | X | X | X | |
| | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido (o) 6-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido | X X | X X | | X X |
| | Nota: en el ejemplo 13, <i>Aeromonas</i> puede eliminarse añadiendo inhibidores de color→ | Negro | Negro | Negro | Verde-cerceta o Rosa |
| XIII | Usar los mismos sustratos que en el ejemplo nº 1, y añadir: 4-metilumbeliferil-β-D-xilopiranosido | <i>Enterobacter</i> y <i>Klebsiella</i> que se presentan en colonias negras producirán fluorescencia, permitiendo de este modo la reducción en el recuento de falsos positivos en <i>E. coli</i> . | | | |
| XIV | 8-hidroxiquinolina-β-D-glucurónido | X | | | |
| | 6-cloro-3-indolil-caprilato | | | | X |
| | color→ | Negro | | | Rojo-rosado |

(continuación)

| Ejemplo nº | Sustrato | E. coli | Coliformes generales | Aeromonas | Salmonella* |
|------------|---|---------------------|---------------------------|--------------------|---------------|
| XV | 8-hidroxi-quinolina-β-D-glucurónido | X | | | |
| | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-caprilato | | | | X |
| | 6-cloro-3-indolil-caprilato | X | X | | X |
| | color→ | Negro | Rojo-rosado | | Azul-violeta |
| XVI | 8-hidroxi-quinolina-β-D-glucurónido | X | | | |
| | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (o) | X | X | Inhibidor presente | |
| | 5-bromo-6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido | X | X | | |
| | color→ | Negro | Verde-cerceta (o) Magenta | | |
| XVII | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónido | X | | | |
| | 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido | X | X | X | |
| | 5-bromo-6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido | X | X | | X |
| | color→ | Púrpura oscuro/Azul | Azul claro-gris | Rosa | Verde-cerceta |
| XVIII | 5-yodo-3-indolil-β-D-glucurónido | X | | | |
| | 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido | X | X | X | |
| | 5-bromo-6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido | X | X | | X |
| | color→ | Púrpura oscuro | Azul claro- gris | Rosa | Verde-cerceta |
| XIX | indoxil-β-D-glucurónido | X | | | |
| | 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido | X | X | X | |
| | 5-bromo-6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido | X | X | | X |
| | color→ | Púrpura oscuro | Azul claro- gris | Rosa | Verde-cerceta |

(continuación)

| Ejemplo nº | Sustrato | E. coli | Coliformes generales | Aeromonas | Salmonella* |
|------------|---|---|--------------------------------|---------------------|------------------------------|
| XX | 4-metilumbeliferil-β-D-glucurónido | X | | | |
| | 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido | X | X | X | |
| | 5-bromo-6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido | X | X | | X |
| | color→ | Azul claro-gris y fluorescente a rayos UV | Azul claro-gris | Rosa | Verde-cerceta |
| XXI | Se usa el mismo sustrato que el ejemplo nº XVII-XIX, y se añade: 4-metilumbeliferil-β-D-glucurónido | X | X | X | X |
| | color→ | Azul oscuro/Púrpura y fluorescente | Azul claro-gris | Rosa | Verde-cerceta |
| XXII | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónido | X | | | |
| | 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido | X | X | X | |
| | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido | X | X | | X |
| | 4-metilumbeliferil-α-D-galactopiranosido | X | X | | X |
| | color→ | Azul oscuro/Púrpura y fluorescente | Azul claro-gris y fluorescente | Rosa | Verde-cerceta y fluorescente |
| XXIII | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónido | X | | | |
| | 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido | X | X | X | |
| | 5-bromo-6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido | X | X | | X |
| | 4-metilumbeliferil-β-D-galactopiranosido | X | X | X | |
| | color→ | Azul oscuro/Púrpura y fluorescente | Azul claro-Gris y fluorescente | Rosa y fluorescente | Verde-cerceta |
| XXIV | 4-metilumbeliferil-β-D-glucurónido | X | | | |
| | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónido | X | | | |
| | color→ | Verde-cerceta y fluorescente | | | |

(continuación)

| Ejemplo nº | Sustrato | <i>E. coli</i> | Coliformes generales | <i>Aeromonas</i> | <i>Salmonella</i> * |
|------------|---|------------------------------|------------------------------|------------------|---------------------|
| XXV | 4-metilumbeliferil-β-D-galactopiranosido | X | X | | X |
| | 5-bromo-6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido | X | X | X | |
| | color→ | Verde-cerceta y fluorescente | Verde-cerceta y fluorescente | Verde-cerceta | Flourescente |
| XXVI | 4-metilumbeliferil-β-D-galactopiranosido | X | X | X | |
| | 5-bromo-6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido | X | X | | X |
| | color→ | Verde-cerceta y fluorescente | Verde-cerceta y fluorescente | fluorescente | Verde-cerceta |

* *Shigella* puede también estar indicada en este color

Ejemplo I (ejemplo de referencia)

5 Los microorganismos seleccionados para ser identificados, cuantificados y diferenciados son *E. coli*, coliformes generales, *Aeromonas* y/o *Salmonella*.

10 Con referencia a la tabla IV, *E. coli* produce la enzima Bgluc, y Bgluc no es producida por ninguno de los demás microorganismos que se desea detectar. Con referencia al lado derecho de la tabla V, puede observarse que la enzima de ensayo Bgluc tiene un componente de sustrato correspondiente de β-D-glucuronido. Por lo tanto, un componente cromógeno o no cromógeno que produce un color distinto en la escisión de Bgluc debería seleccionarse del lado izquierdo de la tabla V. La 8-hidroxiquinolina se selecciona por su color preferido sustancialmente negro. El primer sustrato identificado es por consiguiente 8-hidroxiquinolina-β-D-glucuronido, cuya disponibilidad se describió anteriormente. Se necesita también una sal metálica tal como el citrato férrico y amónico y se añade al medio de ensayo de manera que, en la escisión del sustrato por Bgluc, un complejo insoluble en agua sustancialmente negro se forma en el medio. El precipitado sustancialmente negro consiste en iones férricos y el aglucón liberado cuando el sustrato es hidrolizado por la glucuronidasa procedente de *E. coli*.

20 Haciendo más referencia a la tabla IV, Bgal, Bfuc y Bglu son comunes a *Aeromonas* y coliformes generales. Sin embargo, como se indica en la tabla IV, Bgal, Bfuc y Bglu no son producidas generalmente por *Salmonella*. Por consiguiente, un componente del sustrato correspondiente a uno de Bgal, Bfuc y Bglu puede seleccionarse del lado derecho de la tabla V. Se seleccionan Bgal y el componente β-D-galactopiranosido del sustrato asociado. El componente 6-cloro-3-indolil-cromógeno produce un color rojo-rosado en la escisión de su sustrato en presencia de Bgal y se selecciona como componente cromógeno. El segundo sustrato es por lo tanto 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido.

25 Haciendo referencia de nuevo a la tabla IV, Bman, Aara y Agal son comunes a *Salmonella* y coliformes generales. Sin embargo, como se indica en la tabla IV, Bman, Aara y Agal no son producidos por *Aeromonas*. Así, puede seleccionarse Bman, Aara o Agal y su componente del sustrato asociado identificarse con referencia a la tabla V. Se seleccionan la enzima de ensayo Agal y el componente del sustrato respectivo α-D-galactopiranosido. A continuación, debe seleccionarse un componente cromógeno de la tabla V. Como se muestra en el lado izquierdo de la tabla V, el componente cromógeno 5-bromo-4-cloro-3-indolil produce un color cerceta en la escisión de su sustrato asociado y por consiguiente se selecciona. El tercer sustrato es por lo tanto 5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido.

30 Los coliformes generales presentan un modelo enzimático amplio que es sensible tanto al de sustrato 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido como al de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido. Por consiguiente, los coliformes generales que presentan como cuarto color distinto que es una combinación de los colores producidos por los dos sustratos mencionados anteriormente, respectivamente. En este caso el cuarto color será violeta-azul, que es una combinación de rojo-rosado y cerceta.

35 Por último, como se observa en la tabla IV, *E. coli* presenta también un modelo enzimático amplio y sensibilidad a los tres de los sustratos seleccionados en este ejemplo, esto es, 8-hidroxiquinolina-β-D-glucuronido, 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido. No obstante las colonias de *E. coli*

presentes en el medio de ensayo se mostrarán con un color sustancialmente negro porque, como se expuso anteriormente, los sustratos cromógenos no interfieren con el color sustancialmente negro. Convenientemente, este color sustancialmente negro proporciona un medio superior para distinguir las *E. coli*, así como permite detectar, cuantificar, diferenciar e identificar cuatro microorganismos independientes en un sólo medio de ensayo. Véase la tabla VI.

Ejemplo II (ejemplo de referencia)

Los microorganismos seleccionados para ser identificados, cuantificados y diferenciados son *E. coli*, como primer color, coliformes generales y *Salmonella* como segundo color y *Aeromonas* como tercer color.

Con referencia a la tabla IV, *E. coli* produce la enzima Bgluc, y Bgluc no es producida por ninguno de los demás microorganismos que se desea detectar. Con referencia al lado derecho de la tabla V, puede observarse que la enzima de ensayo Bgluc tiene un componente de β -D-glucuronido de sustrato correspondiente. Por lo tanto, un componente cromógeno o no cromógeno que produce un color distinto en la escisión de Bgluc debería seleccionarse del lado izquierdo de la tabla V. La 8-hidroxiquinolina se selecciona por su color preferido sustancialmente negro. El primer sustrato identificado es por consiguiente 8-hidroxiquinolina- β -D-glucuronido, cuya disponibilidad se describió anteriormente. Se necesita también una sal metálica tal como el citrato férrico y amónico y se añade al medio de ensayo de manera que, en la escisión del sustrato por Bgluc, se forma en el medio un complejo insoluble en agua sustancialmente negro. El precipitado sustancialmente negro consiste en iones férricos y el aglucón liberado cuando el sustrato es hidrolizado por la glucuronidasa procedente de *E. coli*.

Haciendo más referencia a la tabla IV, Bgal, Bfuc y Bglu son comunes a *Aeromonas* y coliformes generales. Sin embargo, como se indica en la tabla IV, Bgal, Bfuc y Bglu no son producidas generalmente por *Salmonella*. Usando la tabla V del modo descrito anteriormente, se selecciona β -D-galactopiranosido como segundo sustrato, que producirá un color rojo-rosado en la escisión tal como indica la lista de componentes cromógenos de la tabla V.

Como se observa en la tabla IV, la enzima Bman es común a *Salmonella* pero no a *Aeromonas*. En la tabla V, el componente del sustrato asociado a Bman, β -D-manopiranosido. En este ejemplo, si se desea producir también el segundo color distinto (rojo-rosado) con *Salmonella*, de modo que, por último las colonias de *Salmonella* presentes en el medio de ensayo presenten el mismo color que los coliformes generales presentes en el medio de ensayo. Por lo tanto, el componente cromógeno es 6-cloro-3-indolil- β -D-manopiranosido.

En éste ejemplo, usando otra vez la tabla V, se identifica un cuarto sustrato que será escindido por una de las enzimas Bman, Aara, Agal comunes a *Salmonella* para producir un tercer color distinto. Usando la tabla V del modo descrito anteriormente, el cuarto sustrato seleccionado es 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido, que produce un color verde cerceta en presencia de Agal común a *Salmonella*.

Los colores resultantes de las colonias presentes en el medio de ensayo pueden predecirse de la forma siguiente. *E. coli* presenta un modelo enzimático amplio que es positivo para los cuatro sustratos seleccionados en este ejemplo, incluyendo el sustrato 8-hidroxi-glucuronido que produce un color sustancialmente negro en la escisión en presencia de los iones de sal férrica. Las colonias de *E. coli* se presentan sustancialmente negras. *Aeromonas* presenta un modelo enzimático que reacciona solamente con el sustrato 6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido seleccionado en este ejemplo y por consiguiente las colonias de *Aeromonas* se presentan como rojo-rosado. La *Salmonella* presenta un modelo enzimático que escinde tanto el tercer como en el cuarto sustratos seleccionados en este ejemplo y por consiguiente las colonias de *Salmonella* se presentan como púrpura-azul (combinación de verde cerceta y rojo-rosado). Por último, los coliformes generales son positivos para cada uno de los sustratos segundo, tercero y cuarto seleccionados y las colonias de los mismos se presentan de color púrpura-azul, indistinguibles de las colonias de *Salmonella*. Como se expuso anteriormente, las diferentes cepas de todas las especies de los diversos géneros no todas producen las mismas cantidades de las diversas enzimas, de modo que pueden existir ligeras variaciones en los tonos de púrpura-azul, por ejemplo.

Ejemplo III A (ejemplo de referencia)

Los microorganismos seleccionados para ser identificados, cuantificados y diferenciados son *E. coli*, como primer color, coliformes generales y *Aeromonas* como segundo color y *Salmonella* como tercer color.

Con referencia a la tabla IV, *E. coli* produce la enzima Bgluc, y Bgluc no es producida por ninguno de los demás microorganismos que se desea detectar. Con referencia al lado derecho de la tabla V, puede observarse que la enzima de ensayo Bgluc tiene un componente de β -D-glucuronido del sustrato correspondiente. Por lo tanto, un componente cromógeno o no cromógeno que produce un color distinto en la escisión de Bgluc debería seleccionarse del lado izquierdo de la tabla V. La 8-hidroxiquinolina se selecciona por su color preferido sustancialmente negro. El primer sustrato identificado es por consiguiente 8-hidroxiquinolina- β -D-glucuronido, cuya disponibilidad se describió anteriormente. Se necesita también una sal metálica tal como el citrato férrico y amónico y se añade al medio de ensayo de manera que, en la escisión del sustrato por Bgluc, se forma en el medio un complejo insoluble en agua sustancialmente negro. El precipitado sustancialmente negro consiste en iones férricos y el aglucón liberado cuando el sustrato es hidrolizado por la glucuronidasa procedente de *E. coli*.

Usando la tablas IV y V de manera similar a la descrita anteriormente con referencia a los ejemplos I y II, se selecciona 6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido como un segundo sustrato para combinar con una de las enzimas Bgal, Bfuc y Bglu común a los coliformes, *Aeromonas* pero negativo para *Salmonella* para producir un segundo color distinto, en este caso sustancialmente rojo-rosado.

- 5 De manera similar, se selecciona 6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido como un tercer sustrato para combinar con Agal, que es común a coliformes y *Salmonella*, pero negativo para *Aeromonas*. En la reacción con la enzima, este sustrato producirá también el mismo segundo color distinto, es decir rojo-rosado.

- 10 El 5-bromo-6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido se selecciona como cuarto sustrato para combinarse con la enzima Bgal, que es común a coliformes y *Aeromonas*, pero negativo para *Salmonella*. Este cuarto sustrato produce un color verde cerceta en la reacción con Bgal.

- 15 Los colores resultantes de las colonias presentes en el medio de ensayo pueden predecirse de la manera siguiente. *E. coli* presenta un modelo enzimático amplio y es positivo para los cuatro sustratos seleccionados en este ejemplo. Por consiguiente, las colonias de *E. coli* se presentarán sustancialmente negras. Las colonias de coliformes generales presentan un modelo enzimático que es positivo para los sustratos segundo, tercero y cuarto, de modo que las colonias coliformes generales se presentan púrpura-azul. Las colonias de *Aeromonas* tienen un modelo enzimático que es positivo para el segundo y cuarto sustratos seleccionados de modo que las colonias de *Aeromonas* también se presentan como púrpura-azul. Por último, las enzimas comunes a *Salmonella* son positivas solamente para el tercero de los cuatro sustratos, de modo que las colonias de *Salmonella* se presentan como rojo-rosado.

20 **Ejemplo IIIB** (ejemplo de referencia)

Como variación, el medio de ensayo IIIA puede prepararse de modo que las colonias de *Salmonella* se presenten como color cerceta en lugar de rosa-rojo, tal puede realizarse sustituyendo el 6-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido del ejemplo IIIA con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido.

Ejemplo IIIC (ejemplo de referencia)

- 25 Un segundo procedimiento independiente para producir los tres mismos colores que en el ejemplo IIIA para los cuatro mismos componentes puede conseguirse añadiendo ácido nalidíxico u otros antibióticos o inhibidores de *Aeromonas* a los componentes relacionados en el ejemplo 1. Al hacer esto, la cefsulodina o el ácido nalidíxico u otra sustancia actúa como inhibidor de *Aeromonas* de modo que las colonias de *Aeromonas* no crecen. Si se elimina *Aeromonas*, entonces las colonias púrpura-azul son todas auténticos coliformes. Si no se elimina, no se contará ninguna *Aeromonas* como parte de los coliformes lo que algunas personas pueden preferir ya que *Aeromonas* es un importante organismo indicador.

Ejemplo IV (ejemplo de referencia)

- 35 En este ejemplo, los microorganismos seleccionados para ser detectados, cuantificados y diferenciados son *E. coli*, coliformes y *Salmonella* como primer color distinto y *Aeromonas* como un segundo color distinto. Un medio de ensayo que consigue este resultado es el medio de ensayo descrito en el ejemplo II, excepto que se omitan el primer sustrato y la sal metálica. Por lo tanto, debido que el modelo enzimático de *E. coli* reacciona con los mismos sustratos que el modelo enzimático de los coliformes generales, *E. coli* y los coliformes generales tendrán el mismo color en este medio de ensayo. Específicamente, las colonias de *E. coli*, de los coliformes y de *Salmonella* se presentarán con un color púrpura-azul, mientras que las colonias de *Aeromonas* se presentarán con un color sustancialmente rojo-rosado.

Ejemplo V (ejemplo de referencia)

- 45 Los microorganismos seleccionados para ser detectados, cuantificados y diferenciados son *E. coli*, coliformes generales y *Aeromonas* como primer color distinto, y *Salmonella* con un segundo color distinto. Un medio de ensayo que consigue este resultado es el medio de ensayo del ejemplo 3 siendo omitidos el primer sustrato y la sal metálica. En este medio de ensayo, *E. coli*, los coliformes generales y las colonias de *Aeromonas* mostrarán un color generalmente púrpura-azul, mientras que las colonias de *Salmonella* mostrarán un color generalmente verde cerceta o un color rojo-rosado.

Opcionalmente, el 6-cloro-5-indolil- α -D-galactósido puede sustituirse por 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido de modo que las colonias de *Salmonella* se muestren como color cerceta, en lugar de rosado.

- 50 Una tercera manera de conseguir el mismo resultado es con un antibiótico, preferentemente ácido nalidíxico, para inhibir el crecimiento de las colonias de *Aeromonas*. Si se elimina las *Aeromonas*, entonces las colonias púrpura-azul son todas coliformes auténticos. Si no se eliminan, no se contará ninguna *Aeromonas* como parte de los coliformes que algunas personas pueden preferir ya que *Aeromonas* es un importante organismo indicador.

Ejemplo VI (ejemplo de referencia)

Los microorganismos seleccionados para ser detectados, cuantificados y diferenciados son *E. coli* y coliformes generales como primer color distinto, *Aeromonas* como segundo color distinto y *Salmonella* como tercer color distinto. Un medio de ensayo que consigue este resultado es el medio de ensayo del ejemplo I siendo omitidos el primer sustrato y la sal metálica. En dicho medio de ensayo, *E. coli*, los coliformes generales y las colonias de *Aeromonas* mostrarán un color púrpura-azul, las colonias de *Aeromonas* mostrarán generalmente un color rojo-rosado y las colonias de *Salmonella* mostrarán generalmente un color verde cerceta.

Ejemplo VII (ejemplo de referencia)

Los microorganismos seleccionados para ser detectados, cuantificados y diferenciados son *E. coli* como primer color distinto que es sustancialmente negro; coliformes generales como un segundo color distinto que es sustancialmente violeta-azul; *Aeromonas/Vibrio/Plesiomonas* como tercer color distinto que es sustancialmente rojo-rosado; y *Salmonella* como cuarto color distinto que es sustancialmente de colorverde azulado.

Con referencia a la tabla IV, *E. coli* produce la enzima Bgluc, y Bgluc no es producido por ninguno de los demás microorganismos que se desean detectar. Por lo tanto, un sustrato que produce un color distinto en la escisión de Bgluc debería seleccionarse de la tabla V. La 8-hidroxiquinoleína- β -D-glucurónido produce un color sustancialmente negro en presencia de Bgluc y sería la elección preferida de sustrato, como se explica a continuación. Una sal metálica como citrato férrico y de amonio se agrega también para formar complejo insoluble en agua sustancialmente negro formado por iones férricos y el aglucón liberado cuando se hidroliza el sustrato por la glucuronidasa de *E. coli*.

Haciendo más referencia a la tabla IV, puede apreciarse que las enzimas Ngal y Naglu son comunes a los microorganismos *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Vibrios*. Por consiguiente, un sustrato adecuado para la experimentación de todos estos microorganismos como un único color distinto es 6-cloro-3-indolil-N-acetil- β -D-galactosaminida, que produce un color sustancialmente rojo-rosado en presencia de estas enzimas.

Haciendo referencia de nuevo a la tabla IV, Bman, Aara y Agal son comunes a *Salmonella* y coliformes generales. Sin embargo, como se indica en la tabla IV, Bman, Aara y Agal no son producidas por *Aeromonas*. Por lo tanto, puede seleccionarse un sustrato de la tabla V que reacciona con uno de Bman, Aara y Agal para producir un tercer color distinto. Como se muestra en la tabla V, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactósido produce un color verde cerceta en presencia de Agal y por consiguiente se selecciona como sustrato.

En este medio de ensayo las colonias de *E. coli* se presentarán como sustancialmente negras, colonias de coliformes generales se presentarán como sustancialmente púrpura-azul, colonias de *Aeromonas*, *Vibrio* y *Plesiomonas* se presentarán como sustancialmente rojo-rosado y las colonias de *Salmonella* se presentarán sustancialmente como color cerceta.

Ejemplo VIII (ejemplo de referencia)

Los organismos seleccionados para ser detectados, cuantificados y diferenciados son *E. coli* como primer color distinto; coliformes y *Salmonella* como segundo color distinto; y *Aeromonas*, *Vibrio* y *Plesiomonas* como tercer color distinto. Un medio de ensayo para conseguir este resultado es el medio de ensayo del ejemplo 2, excepto que el cuarto sustrato seleccionado es 6-cloro-3-indolil-N-acetil- α -D-galactosaminida, a la que cada uno de los organismos *Plesiomonas*, *Vibrio* y *Aeromonas* son sensibles de modo que cada una de estas colonias presentan un color generalmente rojo-rosado.

Ejemplo IX (ejemplo de referencia)

Los organismos seleccionados para ser detectados, cuantificados y diferenciados en este ejemplo son *E. coli* y coliformes generales como primer color distinto que es un azul-púrpura; *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Vibrio* como segundo color distinto que es rojo-rosado; y *Salmonella* como tercer color distinto que es verde cerceta. Este resultado puede conseguirse con el el medio de ensayo del ejemplo 6, excepto con adición de 6-cloro-3-indolil-N-acetil- α -D-galactosaminida, a la que cada uno de los microorganismos *Plesiomonas*, *Vibrio* y *Aeromonas* es sensible.

Ejemplo X (ejemplo de referencia)

Los organismos seleccionados para ser detectados, cuantificados y diferenciados en este ejemplo son *E. coli* y coliformes generales como primer color, *Aeromonas*, *Vibrio* y *Plesiomonas* como segundo color distinto; y *Salmonella* como tercer color distinto. Un medio de ensayo adecuado para conseguir para conseguir este resultado es el medio de ensayo dado a conocer en el ejemplo 7 excepto que se omite el primer sustrato para detectar colonias de *E. coli*. En este ejemplo, *E. coli* y las colonias de coliformes generales se presentan como generalmente púrpura-azul, *Aeromonas*, *Vibrio* y *Plesiomonas* se presentan generalmente de color rojo-rosado y *Salmonella* se presenta generalmente de color verde cerceta. La adición de 6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido es necesaria para dar el color púrpura-azul de las colonias de *E. coli*.

Ejemplo XI (ejemplo de referencia)

Los microorganismos seleccionados para ser detectados, cuantificados y diferenciados en este ejemplo son *E. coli* de color sustancialmente negro y coliformes generales de color rojo-rosado. Con referencia a la tabla IV, *E. coli* produce la enzima Bgluc, y Bgluc no es producida por ninguno de los demás microorganismos que se desean detectar. Por consiguiente, un sustrato que produce un color distinto en la escisión de Bgluc debería seleccionarse de la tabla V. El 8-hidroxiquinolin- β -D-glucurónido produce un color oscuro en presencia de Bgluc y sería la selección preferida de sustrato. Una sal metálica tal como el citrato férrico y amónico se añade también para formar un complejo insoluble en agua negro consistente en iones férricos y aglucón liberado cuando el sustrato es hidrolizado por glucuronidasa de *E. coli*.

Haciendo más referencia a la tabla IV, Bgal, Bfuc y Bglu son comunes a *Aeromonas* y coliformes generales. Sin embargo, como se indica en la tabla IV, Bgal, Bfuc y Bglu no son producidos generalmente por *Salmonella*. Por lo tanto, puede seleccionarse un sustrato de la tabla V que reacciona con Bgal, Bfuc o Bglu para producir un segundo color distinto. 6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido produce un color rosa en presencia de Bgal y se selecciona como segundo sustrato.

Opcionalmente, puede sustituirse el 6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido por 5-bromo- β -cloro-5-indolil- β -D-galactopiranosido de modo que *Aeromonas* y las colonias de coliformes generales se presentan de color cerceta en lugar de rosa.

Como se señala, el segundo sustrato seleccionado dará como resultado colonias de *Aeromonas* que se muestran también generalmente de color rojo-rosado. Para evitar el crecimiento de las colonias de *Aeromonas*, se añade un inhibidor, preferentemente ácido nalidíxico. Así, las colonias de *E. coli* se presentarán sustancialmente negras, mientras que las colonias de coliformes generales se presentarán de un color rojo-rosado.

Ejemplo XII (ejemplo de referencia)

Los microorganismos seleccionados para ser detectados, cuantificados y diferenciados en este ejemplo son *E. coli*, coliformes generales y *Aeromonas spp.* de color sustancialmente negro y *Salmonella spp.* de un segundo color distinto. El primer sustrato seleccionado es 8-hidroxiquinolina- β -D-galactósido, que produce colonias de *E. coli*, coliformes generales y *Aeromonas* que se presentan de color sustancialmente negro. El segundo sustrato seleccionado puede ser ya sea 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido o 6-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido. Si se selecciona el primero de estos dos sustratos las colonias de *Salmonella* presentarán un color verde cerceta, mientras que si se selecciona el último de los dos sustratos mencionados anteriormente, las colonias de *Salmonella* presentarán un color rojo-rosado.

Opcionalmente, en este ejemplo, *Aeromonas* puede eliminarse añadiendo un inhibidor, preferentemente ácido nalidíxico, como se expuso en detalle anteriormente.

Ejemplo XIII (ejemplo de referencia)

Los microorganismos seleccionados para ser detectados, cuantificados y diferenciados en este ejemplo son los mismos que en el ejemplo 1, excepto que este ejemplo ilustra una corrección por falsos positivos. Es decir, es posible que determinados *Enterobacter* y *Klebsiella spp.* Poco comunes se presenten como colonias negras junto con *E. coli* en el medio de ensayo dado a conocer en el ejemplo 1. Por lo tanto, el recuento de *E. coli* podría ser muy inexacto.

En este ejemplo, se añade 4-metil-umbeliferil- β -D-xilopiranosido al medio de ensayo descrito en el ejemplo I. Al hacer esto, *Enterobacter* y *Klebsiella spp.* que se muestran como colonias negras producirán también fluorescencia, permitiendo de este modo la reducción en el recuento de falsos positivos de *E. coli*. El componente fluorescente no interfiere con el color sustancialmente negro de modo que las colonias negras se distinguen fácilmente a simple vista. Todavía, a la luz ultravioleta, pueden detectarse falsos positivos y reducirse sustancialmente examinando las colonias negras por fluorescencia.

Ejemplo XIV (ejemplo de referencia)

Los microorganismos seleccionados para ser detectados, cuantificados, diferenciados e identificados son *E. coli* en color sustancialmente negro y *Salmonella spp.* en color rosa-rojo. Los coliformes generales son incoloros en este ejemplo.

Haciendo referencia al Ejemplo I, *E. coli* es sensible a 8-hidroxi-quinolina- β -D-glucurónido. Los coliformes generales, *Salmonella* y *Aeromonas* no son sensibles a 8-hidroxi-quinolina- β -D-glucurónido. Por lo tanto, el primer sustrato seleccionado es 8-hidroxi-quinolina- β -D-glucurónido.

Con respecto a la tabla IV, la enzima estereasa es positiva para *Salmonella spp.*, pero no cualquiera de los demás organismos preferidos que van a detectarse. Con referencia a la tabla V, el sustrato 6-cloro-3-indolil-caprilato puede identificarse, y producirá un color rosa-rojo en la escisión, y por consiguiente se selecciona como segundo sustrato.

En este medio de ensayo, las colonias de *E. coli* se presentarán en color sustancialmente negro y las colonias de *Salmonella* se presentarán en color rosa-rojo.

Ejemplo XV (ejemplo de referencia)

5 Los microorganismos seleccionados para ser detectados, cuantificados, diferenciados e identificados son *E. coli* en color sustancialmente negro y *Salmonella spp.* en color azul-púrpura y los coliformes generales en color rojo-rosado.

Haciendo referencia al Ejemplo I, *E. coli* es sensible a 8-hidroxi-quinolina-β-D-glucurónido. Los coliformes generales, *Salmonella* y *Aeromonas* no son sensibles a 8-hidroxi-quinolina-β-D-glucurónido. Por lo tanto, el primer sustrato seleccionado es 8-hidroxi-quinolina-β-D-glucurónido.

10 Con respecto a las tabla IV y V, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-caprilato puede identificarse como segundo sustrato al que será sensible *Salmonella*. Haciendo más referencia a la tabla V, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-caprilato forma un color verde cerceta en la escisión.

6-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido, que produce un color rosa-rojo en la escisión se selecciona como tercer sustrato al que son sensibles *E. coli*, coliformes generales y *Salmonella*.

15 En este ejemplo, las colonias de *E. coli* se presentan en color sustancialmente negro, las colonias de coliformes generales se presentan en color rojo-rosado y las colonias de *Salmonella* se presentarán en color azul-violeta (= rojo-rosado + verde cerceta).

Ejemplo XVI (ejemplo de referencia)

Los microorganismos seleccionados para ser detectados, cuantificados y diferenciados en este ejemplo son *E. coli* en color sustancialmente negro y los coliformes generales en un segundo color distinto.

20 Con referencia a la tabla IV, *E. coli* produce la enzima Bgluc, y Bgluc no es producida por ninguno de los demás microorganismos que se desean detectar. Por consiguiente, un sustrato que produce un color distinto en la escisión de Bgluc debería seleccionarse de la tabla V. El 8-hidroxiquinoleína-β-D-glucurónido produce un color oscuro en presencia de Bgluc y sería la elección preferida de sustrato. Una sal metálica tal como el citrato férrico y de amonio se agrega también para formar un complejo insoluble en agua sustancialmente negro formado por iones férricos y el aglucón liberado cuando se hidroliza el sustrato por la glucuronidasa de *E. coli*.

25 Haciendo más referencia a la tabla IV, Bgal, Bfuc y Bglu son comunes a *Aeromonas* y coliformes generales. Sin embargo, como se indica en la tabla IV, Bgal, Bfuc y Bglu no son producidos generalmente por *Salmonella*. Por lo tanto, puede seleccionarse un sustrato de la tabla V que reacciona con Bgal, Bfuc o Bglu para producir un segundo color distinto. 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido puede seleccionarse como segundo sustrato, en el que las presentes colonias de *E. coli* aparecerán como sustancialmente negras y las colonias de coliformes generales aparecerán con color verde cerceta. Opcionalmente, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido puede seleccionarse como segundo sustrato, en el que las presentes colonias de *E. coli* aparecerán como sustancialmente negras y las colonias de coliformes generales aparecerán con color magenta. Para evitar el crecimiento de las colonias de *Aeromonas*, se añade un inhibidor, preferentemente ácido nalidíxico. Por lo tanto, las colonias de *E. coli* presentarán un color sustancialmente negro, mientras que las colonias de coliformes generales presentarán un color magenta.

Ejemplo XVII (ejemplo de referencia)

40 Algunos microorganismos seleccionados que pueden detectarse, cuantificarse y diferenciarse en este ejemplo son *E. coli*, coliformes generales, *Aeromonas* y/o *Salmonella*. Los sustratos 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónido, 6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido se añaden en cantidades de aproximadamente 125 mg/l de medio; 200 mg/l de medio; y 65 mg/l de medio, respectivamente. La preparación restante y la inoculación del medio de ensayo en este ejemplo es similar a la expuesta anteriormente, excepto que no se necesitan iones de sal cuando el medio no tiene un sustrato no cromógeno. En este medio, *E. coli*, que reacciona con todos los sustratos, aparecerá de color azul muy oscuro y/o púrpura porque predominará la alta concentración del β-D-glucurónido. Los coliformes generales, que reaccionan tanto con el α- como con el β-D-galactopiranosido aparecen con un color azul-gris luminoso. *Salmonella*, que reacciona con el α-D-galactopiranosido tendrá un color verde cerceta, y *Aeromonas* que reacciona con el β-D-galactopiranosido tendrá un color rosa-rojo. Puede ser útil si la concentración o cantidad usada del β-D-glucurónido es mayor que la del β-D-galactopiranosido para aumentar la diferencia en la coloración/oscuridad entre el *E. coli* y los coliformes generales, ya que estos sustratos usan el mismo compuesto coloreado en este ejemplo. Sin embargo, si se usan incluso las mismas cantidades de β-D-glucurónido y β-D-galactopiranosido, la *E. coli* puede ser todavía más oscura y distinguible de los coliformes generales, ya que reacciona con ambos sustratos mientras que los coliformes generales no reaccionan con el β-D-glucurónido.

Ejemplo XVIII (ejemplo de referencia)

Un sustrato de β -D-glucurónido alternativo que puede usarse es 5-yodo-3-indolil- β -D-glucurónido que es conocido vulgarmente como yodo-Gluc. Los microorganismos seleccionados que deben detectarse, cuantificarse y diferenciarse en este ejemplo son *E. coli*, coliformes generales, *Aeromonas* y *Salmonella*. La concentración del β -D-glucurónido debe ser suficiente para proporcionar un color púrpura muy oscuro que puede diferenciarse fácilmente del color azul-gris de los coliformes generales.

Ejemplo XIX (ejemplo de referencia)

Otro sustrato de β -D-glucurónido alternativo que puede usar es indoxil- β -D-glucurónido, que es conocido vulgarmente como IBDG. Con una concentración suficiente de IBDG, *E. coli* aparecerá más oscura que las demás colonias con un color azul-púrpura oscuro. Los coliformes generales, *Salmonella* y *Aeromonas* aparecerán con un color azul-gris claro, verde cerceta y rojo-rosado respectivamente.

Ejemplo XX (ejemplo de referencia)

En este ejemplo, se usa el 4-metilumberifeil- β -D-glucurónido, conocido vulgarmente como MUgluc, en lugar de un β -D-glucurónido cromógeno o no cromógeno. Con este medio, *E. coli* será de color azul claro-gris y producirá fluorescencia a la luz ultravioleta, y los coliformes generales serán de color azul claro-gris, *Salmonella* será de color verde cerceta y *Aeromonas* será de color rosa-rojo a la luz ambiental. Una ventaja del MUGluc es que los tiempos de incubación necesarios para la detección de las colonias serán sustancialmente menores que los necesarios con los demás sustratos cromógenos o no cromógenos. Un tiempo de incubación de aproximadamente 14 horas sería suficiente para detectar *E. coli* con este sustrato. Un inconveniente es que los productos fluorescentes son más fácilmente difundibles que los demás compuestos y pueden hacer más difícil cuantificar la *E. coli*. Sin embargo, aún si la *E. coli* no puede cuantificarse en un ensayo dado, todavía sin duda será adecuado para un ensayo de presencia o ausencia de *E. coli*.

Ejemplo XXI (ejemplo de referencia)

En este medio, un 4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido (MCTGluc) se combina con uno de los sustratos de glucurónido cromógeno o no cromógenos mencionados anteriormente así como α - y β -D-galactopiranosidos cromógenos. Este medio ofrece la ventaja de que un ensayo de presencia o ausencia para *E. coli* puede realizarse con tiempos de incubación más breves que los requeridos por los sustratos cromógenos y no cromógenos. Además, si por cualquier razón, es dudoso si las colonias de los organismos detectados son *E. coli* o coliformes generales, el medio puede examinarse a la luz ultravioleta de modo que las colonias de *E. coli* pueden confirmarse por fluorescencia. Esto proporciona una doble comprobación en la precisión de la identidad de las colonias.

Ejemplo XXII (según la invención)

En este ejemplo, uno de los sustratos de β -D-glucurónido cromógeno o no cromógeno mencionado anteriormente se combina con un α -D-galactopiranosido cromógeno y un β -D-galactopiranosido cromógeno. Además, el medio incluye un 4-metilumberiferil- α -D-galactopiranosido. El sustrato glucurónido, es en un ejemplo un 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido cromógeno. El medio también incluye un 6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido y un 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido. Este medio ofrece la ventaja de que muchos organismos que reaccionan con un α -D-galactopiranosido producirán fluorescencia a la luz ultravioleta. Además, los resultados fluorescentes tienden a aparecer más rápido que algunos resultados que tienen una reacción positiva a los sustratos cromógenos o no cromógenos. Por consiguiente, *E. coli*, los coliformes generales y *Salmonella*, que reaccionan todos con α -D-galactopiranosido, producirán fluorescencia a la luz ultravioleta. Además, cuando las reacciones con los sustratos cromógenos han tenido suficiente tiempo, este *E. coli* será un azul muy oscuro debido a la reacción tanto con los sustratos verde cerceta del glucurónido como del α -D-galactósido y el sustrato de β -D-galactósido rosado. Los coliformes se presentarán con un color azul más claro que *E. coli* debido a una combinación del sustrato α -D-galactósido de color verde cerceta y el sustrato β -D-galactósido rosado. *Aeromonas* será de color rosado en respuesta a la reacción con el sustrato de β -D-galactósido y *Salmonella* será de color verde cerceta en respuesta a la reacción con el sustrato de α -D-galactósido.

Ejemplo XXIII (según la invención)

Este ejemplo usa sustratos cromógenos de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido, 6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido. Sin embargo, en lugar de 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido se usa un 4-metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido a la luz ambiental, *E. coli*, los coliformes generales, *Aeromonas* y *Salmonella* tendrán los mismos colores que en el ejemplo XXII. Además, *E. coli* y los coliformes generales producirán todavía fluorescencia, ya que ambos reaccionarán con el sustrato β -D-galactósido. Sin embargo, en este caso, *Aeromonas* producirá también fluorescencia a la luz ultravioleta debido a la actividad de β -D-galactosidasa. *Salmonella*, sin embargo, no producirá fluorescencia ya que es negativa para β -D-galactopiranosido.

En los ejemplos XXII y XXIII, se usa el mismo componente de color cromógeno en el β -D-glucurónido y el α -D-galactopiranosido. La misma cantidad de componente cromógeno puede usarse en cada sustrato, y la *E. coli* aparecerá todavía con un color azul más oscuro que los coliformes generales ya que los productos formados en presencia de *E. coli* proceden tanto del β -D-glucurónido como del α -D-galactopiranosido, los cuales producen un color verde cerceta, así como el β -D-galactopiranosido, que produce un color rosado, mientras que los coliformes reaccionan solamente con los α - y β -D-galactopiranosidos. También es posible aumentar la cantidad del componente cromógeno en el β -D-glucurónido en comparación con el α -D-galactopiranosido de modo que la *E. coli* aparecerá aún más oscura, haciendo más fácilmente distinguible la *E. coli* de los coliformes generales. Además como otra alternativa, puede usarse un sustrato no cromógeno tal como 8-hidroxiquinolina más iones para el β -D-glucurónido en lugar de un sustrato cromógeno como en otros ejemplos anteriores.

Ejemplo XXIV (ejemplo de referencia)

En este ejemplo, se usa un 4-metilumbiferil- β -D-glucurónido conocido vulgarmente como MUGluc en combinación con un sustrato de β -D-glucurónido cromógeno o no cromógeno. Por ejemplo, puede usarse un sustrato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido. Este medio proporciona capacidad para realizar una doble validación de resultados positivos para *E. coli* en un solo ensayo. Además, el procedimiento proporciona medios de llevar a cabo una comprobación inicial para *E. coli* a la luz ultravioleta ya que *E. coli*, que reacciona con β -D-glucurónido producirá fluorescencia cuando se expone a la luz ultravioleta. Además, la *E. coli* reaccionará también con el sustrato cromógeno se apreciará con un color verde cerceta a la luz ambiental. Los resultados de MUGluc es probable que estén disponibles antes de los resultados con un sustrato cromógeno para un examen inicial, y el examen siguiente del medio para la presencia de colonias verde cerceta confirmará la presencia de *E. coli* y permitirá cuantificar las colonias. Este procedimiento ofrece una ventaja significativa sobre otras pruebas de verificación actuales para comprobar *E. coli*, tal como un ensayo para comprobar la presencia de triptofanasa, que es también exclusiva para *E. coli* y no está generalmente presente en otros coliformes. Sin embargo, no existe ningún modo actual de incorporar el ensayo tanto para triptofanasa como para glucurónido en el mismo medio, de modo que la comprobación de triptofanasa requiere una preparación y ensayo independientes.

Ejemplo XXV (ejemplo de referencia)

En este medio, se usan un 4-metilumbiferil- α -D-galactopiranosido fluorescente y un 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido cromógeno. *E. coli* y los coliformes generales reaccionan ambos con α -D-galactopiranosido y β -D-galactopiranosido de modo que los coliformes totales aparecerán con un color verde cerceta a la luz ambiental y producirán fluorescencia a la luz ultravioleta. *E. coli* tendrá el mismo color que los coliformes generales en este medio específico. *Aeromonas* que reaccionan con β -D-galactopiranosido aparecerán de color verde cerceta a la luz ambiental y no producirá fluorescencia, y *Salmonella* que no estará coloreada a la luz ambiental producirá fluorescencia a la luz ultravioleta.

Ejemplo XXVI (ejemplo de referencia)

Este ejemplo usa un 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido cromógeno y 4-metilumbiferil- β -D-galactopiranosido fluorescente. Como en el ejemplo XXV, *E. coli* y los coliformes generales aparecerán iguales de modo que los coliformes totales serán de color verde cerceta a la luz ambiental y producirán fluorescencia a la luz ultravioleta. *Aeromonas* no tendrá ningún color a la luz ambiente pero producirá fluorescencia a la luz ultravioleta, y *Salmonella* se mostrará de color verde cerceta a la luz ambiental y no producirá fluorescencia a la luz ultravioleta. Debe ser evidente que otros sustratos cromógenos y no cromógenos o fluorógenos puedan ser sustituidos por los especificados en los ejemplos XXV y XXVI.

Aunque anteriormente se han descrito varios ejemplos extensos que incorporan la presente invención y ejemplos de referencia, debe sobreentenderse que la invención no está restringida por los ejemplos dados a conocer en la presente memoria. De hecho, la exposición y los ejemplos anteriores enseñan a cualquier experto que un número prácticamente ilimitado de medios de ensayo estará comprendido dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas a ésta.

Además, aunque la presente invención se ha descrito con un diseño preferido, la presente invención puede modificarse más dentro del alcance de esta exposición. Esta solicitud pretende por consiguiente cubrir algunas variaciones, usos o adaptaciones de la invención usando los principios generales. Además, esta solicitud pretende cubrir tales desviaciones del presente descubrimiento que están comprendidas dentro de la práctica habitual en la técnica a la que pertenece la presente invención y que están comprendidas dentro de los límites de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Medio de ensayo para detectar, cuantificar o diferenciar organismos coliformes generales, *E. coli*, *Aeromonas* y *Salmonella*, comprendiendo dicho medio de ensayo:
- 5 un sustrato cromógeno o no cromógeno de β -D-glucurónido, que forma un primer producto que es visible a la luz ambiental en presencia de *E. coli*;
- un sustrato cromógeno de α -D-galactósido, que forma un segundo producto que es visible a la luz ambiental en presencia de *Salmonella*, *E. coli* y otros organismos coliformes; y
- 10 un sustrato cromógeno de β -D-galactósido, que forma un tercer producto que es visible a la luz ambiental en presencia de *Aeromonas*, *E. coli* y otros organismos coliformes, formando tales productos de sustratos de dicho α -D-galactósido y de dicho β -D-galactósido una combinación de color en presencia de coliformes generales y *E. coli* y en el que todos los coliformes generales, *E. coli*, *Aeromonas* y *Salmonella*, se distinguen unos de otros, y
- 15 un cuarto sustrato, a saber un sustrato de α -D-galactósido o un sustrato de β -D-galactósido, que forma un producto que produce fluorescencia a la luz ultravioleta en presencia de al menos uno de entre *E. coli*, coliformes generales, *Salmonella* o *Aeromonas*.
2. El medio de ensayo como se expone en la reivindicación 1, en el que dicho cuarto sustrato es un sustrato de α -D-galactósido, y el producto del cuarto sustrato formado en presencia de *E. coli*, de coliformes generales y/o de *Salmonella* produce fluorescencia a la luz ultravioleta.
3. El medio de ensayo como se expone en la reivindicación 1, en el que dicho cuarto sustrato es un sustrato de β -D-galactósido, y el producto se forma en presencia de *E. coli*, coliformes generales y/o *Aeromonas* produce fluorescencia a la luz ultravioleta.
- 20 4. El medio de ensayo como se expone en la reivindicación 1, en el que dicho sustrato cromógeno o no cromógeno de β -D-glucurónido produce color y uno de entre dicho sustrato cromógeno de α -D-galactósido o dicho sustrato cromógeno para β -D-galactósido incluye el mismo componente de color que dicho sustrato de β -D-glucurónido cromógeno o no cromógeno.
- 25 5. El medio de ensayo como se expone en la reivindicación 4, en el que dicho sustrato cromógeno o no cromógeno y dicho sustrato cromógeno de α -D-galactósido o dicho sustrato cromógeno de β -D-galactósido están presentes en cantidades iguales.
6. El medio de ensayo de la reivindicación 4, en el que dicho sustrato de β -D-glucurónido y uno o el otro de entre dicho sustrato cromógeno de α -D-galactósido o de dicho sustrato cromógeno de β -D-galactósido están presentes en cantidades diferentes.
- 30 7. El medio de ensayo de la reivindicación 6, en el que hay más de dicho sustrato de β -D-glucurónido que de dicho sustrato cromógeno de α -D-galactósido o de dicho sustrato cromógeno de β -D-galactósido del mismo componente de color.
- 35 8. El medio de ensayo de la reivindicación 1, en el que dicho cuarto sustrato incluye el componente fluorescente, 4-metilumbeliferilo.
9. El medio de ensayo de la reivindicación 6, en el que el producto de dicho sustrato de β -D-glucurónido formado en presencia de *E. coli* aparece más oscuro que el producto formado en presencia tanto de *Salmonella* como de *Aeromonas* que se forma del mismo componente cromógeno.
- 40 10. El medio de ensayo como se expone en la reivindicación 1, en el que dicho medio ofrece una doble verificación de la presencia de *E. coli*, en la que dicha primera verificación es la fluorescencia de *E. coli* a la luz ultravioleta y la segunda verificación es una identificación a simple vista a la luz ambiental de un producto de sustrato cromógeno o no cromógeno.
- 45 11. El medio de ensayo como se expone en la reivindicación 10, en el que dicha verificación de *E. coli* al producir fluorescencia a la luz ultravioleta es detectable antes de identificación visible del sustrato cromógeno o no cromógeno.
12. El medio de ensayo como se expone en la reivindicación 1, en el que dicho sustrato de α -D-galactósido cromógeno es 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactopiranosido y el producto formado en presencia de coliformes totales es de color cerceta, y un producto de color cerceta se forma también en presencia de *Salmonella*.
- 50 13. El medio de ensayo como se expone en la reivindicación 1, en el que dicho sustrato de β -D-galactósido cromógeno es 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido, y el producto formado en presencia de los coliformes totales es de color cerceta, y un producto de color cerceta se forma también en presencia de *Aeromonas*.
14. El medio de ensayo como se expone en la reivindicación 1, en el que dicho sustrato de β -D-glucurónido es el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido.