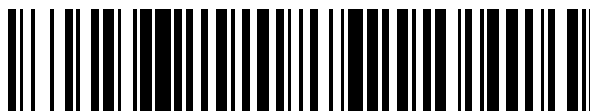


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 076**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2010** **E 10770572 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2013** **EP 2478112**

54 Título: **Procedimiento de identificación de bacterias del grupo Bacillus cereus**

30 Prioridad:

18.09.2009 FR 0904470

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.11.2013

73 Titular/es:

BIOMÉRIEUX (100.0%)
Chemin de l'Orme
69280 Marcy L'etoile, FR

72 Inventor/es:

CELLIER, MARIE;
MILLS, JOHN;
MOSTICONE, DAVID;
ORENGA, SYLVAIN y
VIMONT, ANTOINE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 428 076 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

Procedimiento de identificación de bacterias del grupo *Bacillus cereus*

La presente invención se refiere al campo del control microbiológico alimentario. Más particularmente, se basa en un método de discriminación de bacterias del grupo *Bacillus cereus* con respecto a otras bacterias, por hidrólisis de un sustrato fluorescente de lecitinasa o fosfatidilcolina fosfolipasa C, que se denomina en lo sucesivo PC-PLC.

El control microbiológico en el campo agroalimentario requiere la utilización de técnicas que permitan la detección y/o la identificación y/o la enumeración de microorganismos, y que la obtención de resultados con ellas sea lo más rápido posible. Dichos microorganismos pueden ser no patógenos, por ejemplo bacterias de interés tecnológico tales como los fermentos o tales como los indicadores de calidad; estos últimos permiten validar el proceso de producción, materias primas o productos crudos, llegando hasta productos terminados. Sin embargo, dichos microorganismos son con frecuencia patógenos y la detección rápida y precisa de contaminaciones supuestas exige llevar a cabo acciones correctivas. Alternativamente, las toxinas producidas por dichos microorganismos y que son responsables de los efectos patógenos, pueden ser investigadas.

El diagnóstico clínico utiliza las mismas técnicas : o bien la detección y/o la enumeración de las propias bacterias. o bien la detección de las toxinas. En todos los casos, los factores importantes para los ensayos diagnósticos son la sensibilidad, la selectividad y el tiempo de obtención de los resultados.

El género *Bacillus* comprende bacterias Gram positivas presentes en la naturaleza en todas partes:: en la tierra, en el agua y en el aire, así como en los productos alimentarios, granos de cereales, leches en polvo, productos harinosos, especias etc. La capacidad de formar esporas las confiere una resistencia muy grande en el medio exterior. Las esporas de *Bacillus cereus* (*B. cereus*), en particular, pueden contaminar los alimentos, materias primas y productos manufacturados. La supervivencia de dichas esporas se mantiene a todo lo largo de la cadena alimentaria. En circunstancias normales, el *B. cereus* está presente en una cantidad inferior a 10^3 células por gramo de alimento y carece de incidencia patógena, El nivel mínimo patógeno es superior a 10^5 células por gramo de alimento. La contaminación de un individuo a partir de un alimento puede ser responsable, por tanto, de una gastroenteritis. Las gastroenteritis asociadas con *B. cereus* se traducen o bien en vómitos, o bien en diarreas. Diversos alimentos pueden estar involucrados; carnes, arroz, platos deshidratados, salsas, sopas, etc. También pueden observarse infecciones oportunistas por *B. cereus* en pacientes debilitados tales como sujetos alcohólicos, inmunodeprimidos, o como consecuencia de heridas tales como quemaduras.

La detección y determinación cuantitativa de las bacterias del grupo *Bacillus cereus* es, por tanto, fundamental para los laboratorios de garantía de calidad de la industria agroalimentaria, así como para los laboratorios de diagnóstico clínico. Normalmente, el aislamiento se lleva a cabo en medios de cultivo selectivos, convencionales, en placa, por ejemplo las normas de tipo ISO (International Organization for Standardization) o los métodos BAM-FDA (Bacteriological Analytical Manual of the Food and Drug Administration) que recomiendan medios tales como el Agar-azul de bromotimol-manitol-yema de huevo-polimixina (PEMBA) o el Agar-polimixina-yema de huevo-manitol (MYP) según sus denominaciones anglosajonas. La identificación se lleva a cabo según las características morfológicas y las de los cultivos, o características metabólicas..

Estos medios PEMBA o MYP pueden dar lugar a falsos positivos potenciales asociados a un sistema inhibidor poco eficaz, o a falsos negativos, asociados con la ausencia posible de las características citadas, morfológicas o metabólicas, de ciertas cepas. Finalmente, ciertas cepas presentan reacciones ambiguas, tales como ha sido descrito por Fricker et al., International Journal of Food Microbiology; 121 (2008) : 27-34. Han sido desarrollados medios cromógenos en placa para paliar los falsos negativos. Estos medios contienen sustratos naturales o sustratos sintéticos cromógenos. De este modo son detectadas actividades enzimáticas específicas de ciertas cepas mediante la selección de estos sustratos. La especificidad de la detección puede mejorarse mediante la adición al medio de cultivo de sistemas inhibidores, mezclas de compuestos antimicrobianos y/o antifúngicos destinadas a limitar el crecimiento de otros microorganismos. No obstante, las mezclas de inhibidores retardan igualmente el crecimiento de microorganismos considerados dianas, en la medida en que están destinados a limitar el crecimiento de microorganismos del mismo género que dichos microorganismos considerados dianas .

Medios cromógenos o fluorescentes basados en la detección de la actividad de la fosfolipasa C específica del fosfatidilinositol (en lo sucesivo denominada PI-PLC), han sido descritos en las patentes US 6.284.517 B, EP 1 219 628 B y US 6.558.917 B, así como en la publicación de Fricker et al., 2008 (referencia bibliográfica anterior). Estos medios presentan el inconveniente de dar lugar a falsos negativos, en particular con ciertas cepas del grupo *Bacillus cereus* que no presentan actividad PI-PLC (*B. cereus*, *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis*) o que presentan pequeña actividad PI-PLC (*B. anthracis*), o a falsos positivos. Además, el sustrato fluorescente 4MU-MIP (4-metilumbeliferil-mioinositol-1 fosfato) presenta una estabilidad reducida en medio acuoso lo que impone condiciones excesivamente rigurosas para su utilización, en particular una medida discontinua de la fluorescencia llevada a cabo en condiciones precisas de pH según indica la patente US 6.558.917. Más propiamente, es necesario realizar el cultivo a pH ácido y después alcalinizar el medio para aumentar la fluorescencia, leída en el punto final. La patente US 7.309.580 B2 describe un medio en placa de cultivo que combina un sustrato cromógeno de PC-PLC y un sustrato cromógeno de PI-PLC. Los colores respectivos, del medio, del primer sustrato y del

segundo sustrato, son diferentes y pueden igualmente diferenciarse del tercer color que resulte de la mezcla posible de los productos procedentes de reacciones enzimáticas.

El medio BCM, suministrado por Biosynth® (Suiza) utiliza un sustrato cromógeno de PI-PLC y un sistema inhibidor de la flora bacteriana no considerada diana, que comprende polimixina B, trimetoprima, sulfametoxazol y cicloheximida. Los comportamientos del ensayo están mejorados con respecto a los medios estándar, pero ciertas cepas atípicas pueden quedar mal identificadas (Fricker et al., 2008, referencia anterior).

Existen medios cromógenos que se basan en la hidrólisis de sustratos de β -glucosidasa tales como el Brilliance™ *Bacillus cereus* Agar suministrado por Oxoid™. No obstante, este medio genera falsos positivos Gram positivos a pesar de la presencia de un sistema inhibidor anti-Gram positivos que comprende polimixina B y trimetoprima, así como también falsos negativos (Fricker et al., 2008).

Finalmente, existe un medio cromógeno en placa, que se basa en la hidrólisis de un sustrato cromógeno de PC-PLC: R&F® *Anthraxis* Chromogenic Agar. Este medio proporciona una indicación de resultado negativo para el *Bacillus anthracis* en 24 horas y un resultado potencialmente positivo en 48 horas. El tiempo de obtención del resultado es largo y la especificidad necesita la presencia de varios antibióticos. (Juergensmeyer et al., Journal of food protection; vol. 69, No. 8 (2006): 2002-2006, así como la patente US 2004/005652, describen igualmente la utilización de tales medios cromógenos.)

Resulta de este estado de la técnica que hasta la fecha no existe un procedimiento que permita detectar y/o enumerar bacterias del grupo de *Bacillus cereus* con ayuda de un medio de reacción que comprende un inhibidor de bacterias Gram negativas y un sustrato fluorescente de PC-PLC, cuyo medio de reacción permita obtener un resultado en 6 a 30 horas. Un procedimiento tal presenta un valor real añadido para el diagnóstico clínico o industrial, en particular en el campo de la industria agroalimentaria.

Teniendo en cuenta los inconvenientes manifestados en el estado de la técnica considerado anteriormente, los objetivos esenciales de la presente invención son:

- obtener un resultado positivo más rápidamente que con los ensayos existentes;
- reducir el número de falsos positivos;
- mejorar la sensibilidad, en particular para niveles pequeños de contaminación de la muestra, gracias a la utilización de un sistema inhibidor reducido;
- presentar gran facilidad de lectura e interpretación gracias a la utilización de un solo sustrato específico, pudiendo, además, automatizarse dicha lectura;
- presentar condiciones de reacción y/o de cultivo simplificadas, en particular para la preparación del medio y la estabilidad del sustrato.

Según un primer modo de realización, la invención se basa en un procedimiento de identificación de bacterias del grupo *Bacillus cereus*, que comprende las etapas que consisten en:

- poner en contacto en un recipiente, una muestra capaz de contener bacterias del grupo *Bacillus cereus*, un medio de reacción que comprende al menos un sustrato fluorescente de PC-PLC y un inhibidor de bacterias Gram negativas;
- incubar el conjunto;
- identificar las bacterias del grupo *Bacillus cereus* mediante la detección de la reacción de hidrólisis del sustrato de PC-PLC

en el que el pH del medio de reacción y el tiempo necesario para detectar la reacción de hidrólisis del sustrato de PC-PLC empleado, están adaptados de tal modo que dicha reacción de hidrólisis por las bacterias del grupo *Bacillus cereus* es detectada antes de que la hidrólisis del sustrato de PC-PLC por las bacterias Gram positivas distintas de las que pertenecen al grupo *Bacillus cereus* y potencialmente presentes en la muestra, no pueda detectarse.

Se entiende por "tiempo necesario para la detección de la hidrólisis del sustrato" el tiempo que transcurre entre la puesta en contacto, en un recipiente, de la muestra, el medio de reacción y el sustrato, y la detección de la señal. En concreto, este tiempo está fijado y puede ser asimilado al tiempo de reacción. Dicha señal puede ser considerada, por tanto, como un resultado. Por "antes que la hidrólisis del sustrato de PC-PLC por las bacterias Gram positivas distintas de las que pertenecen al grupo *Bacillus cereus* y potencialmente presentes en la muestra, no pueda detectarse", se entiende: : antes de alcanzar, en ausencia de bacterias del grupo *Bacillus cereus*, una señal que corresponde al umbral de detección de dichas bacterias del grupo *Bacillus cereus*. El resultado se considera como negativo si la señal obtenida no es significativamente diferente del ruido de fondo, o dicho de otro modo, si la señal no sobrepasa el umbral de detección. Dicho resultado es positivo si la señal obtenida es significativamente diferente del ruido de fondo.

Preferentemente, el pH del medio de reacción está comprendido entre 6,8 y 8,0.

Preferentemente, el tiempo necesario para la detección de la hidrólisis del sustrato del PC-PLC está comprendido entre 6 y 30 horas.

El medio de reacción utilizado en el procedimiento según la invención está, preferentemente, en forma sólida, líquida o de gel.

- 5 Ventajosamente, el medio de reacción utilizado en el procedimiento según la invención puede ser un medio de cultivo.

Ventajosamente, es asimismo posible una enumeración de las bacterias del grupo *Bacillus cereus* presentes en la muestra.

- 10 Según un modo particular de realización, el procedimiento según la invención puede ser llevado a cabo en microplacas, microcúpulas, microtubos, capilares o placas de muchos pocillos tales como las VITEK® o TEMPO® desarrolladas y comercializadas por el Solicitante. Ventajosamente, el procedimiento según la invención puede asociarse a un dispositivo automático de control microbiológico del tipo TEMPO®, tal como el desarrollado y comercializado por el Solicitante.

- 15 Según otro modo de realización, el procedimiento según la invención comprende, además, una etapa preliminar de pre-enriquecimiento..

Ventajosamente, el medio de reacción utilizado en el procedimiento según la invención, comprende, además, al menos un segundo sustrato, cromógeno o fluorescente. Según un modo de realización particular, dicho sustrato es un sustrato de PI-PLC, que permite discriminar *Bacillus anthracis* de *Bacillus cereus* y de *Bacillus thuringiensis*.

Preferentemente, el sustrato fluorescente de PC-PLC corresponde a 4 MU-CP (4-metil-umbeliferil-colina fosfato).

- 20 Según un modo particular de realización del procedimiento según la invención, las bacterias del grupo *Bacillus cereus* están escogidas entre *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* y *Bacillus weihenstephanensis*, y las otras bacterias están escogidas entre *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Staphylococcus* u otras especies del genero *Bacillus spp.* tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lentus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium* o *Paenibacillus polymyxa*.

- 25 El procedimiento objeto de la invención puede ser llevado a cabo con ayuda de un kit que comprende: un medio de reacción que contiene, al menos, un inhibidor de bacterias Gram negativas, y un sustrato fluorescente específico de PC-PLC. Dicho medio se pone de nuevo en suspensión por una parte alícuota de la muestra a analizar. Ventajosamente, el kit que permite poner en práctica en procedimiento según la invención puede contener también un recipiente sólido de tipo microplaca, microtubo, microcúpula, capilar, o placa de muchos pocillos tal como la VITEK® o la TEMPO®. Preferentemente, el sustrato fluorescente de PC-PLC utilizado en el kit corresponde al 4-metil-umbeliferil-colina fosfato (4 MU-CP). Ventajosamente, el kit que permite la puesta en práctica del procedimiento según la invención, comprende, además, al menos un sustrato suplementario, cromógeno o fluorescente. Preferentemente, dicho sustrato es un sustrato de PI-PLC que permite discriminar *Bacillus anthracis* de *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus mycoides* y *Bacillus pseudomycoides*.

- 30 La especificidad de un ensayo se define por la combinación de la sensibilidad y la selectividad. La sensibilidad se define como el poder de poner de manifiesto la especie buscada, cuando ésta se encuentra presente en una cantidad pequeña en la muestra a ensayar. Una sensibilidad pequeña se traducirá en resultados falsamente negativos. La selectividad, se define como el poder de detectar la especie investigada en la muestra que contiene, igualmente, otras especies. La utilización de sustratos específicos del metabolismo de la especie investigada mejora la selectividad. Pero cepas que expresan poco la actividad enzimática investigada, pueden no ser detectadas y dar lugar a resultados falsamente negativos. Igualmente, la utilización de mezclas de inhibidores, o dicho de otro modo, de compuestos capaces de lentificar, limitar o bloquear el crecimiento de especies potencialmente presentes pero cuya detección no se desea, mejora la selectividad. Un sistema inhibidor de escaso comportamiento puede dar lugar a resultados falsamente positivos..

- 35 Por muestra se entiende una parte pequeña o una cantidad pequeña aislada de una entidad para su análisis. La muestra puede ser de origen industrial, o bien, según una lista no exhaustiva, tomada de aire, una toma de agua, una toma realizada sobre una superficie, una pieza o un producto manufacturado, o un producto de origen alimentario. Entre las muestras de origen alimentario se puede citar de modo no exhaustivo, una muestra de productos lácteos (yogures, quesos...), de carne, de pescado, de huevos, de frutas, de legumbres, de agua, o de bebidas (leche, jugos de frutas, soda, etc.). Estas muestras de origen alimentario pueden proceder, asimismo, de salsas o de platos elaborados. Una muestra alimentaria puede provenir, finalmente, de un alimento destinada a los animales, tal como en especial harinas animales. La muestra puede ser de origen biológico, tanto de origen animal, como vegetal o humano. Por consiguiente, puede corresponder a una toma de un fluido biológico (sangre total, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, o secreción orgánica), o una muestra obtenida de un tejido o de células aisladas. Esta toma puede ser utilizada tal cual, o con anterioridad al análisis, ser sometida a una

preparación de tipo enriquecimiento, extracción, concentración o purificación, según métodos conocidos por los expertos en la técnica.

El control microbiológico corresponde al análisis de una muestra con objeto de aislar y/o de identificar y/o de enumerar microorganismos potencialmente presentes, tales como bacterias o levaduras. Por medio de reacción se entiende un medio que comprende todos los elementos necesarios para la supervivencia y/o para el crecimiento de los microorganismos. Este medio de reacción puede o bien servir únicamente de medio de revelación, o bien servir de medio de cultivo y de revelación. En el primer caso, el cultivo de los microorganismos puede llevarse a cabo antes de realizar la siembra, y, en el segundo caso, el medio de reacción constituye igualmente el medio de cultivo. El medio de reacción puede ser sólido, semisólido o líquido. Por medio sólido se entiende, por ejemplo, un medio gelificado. Preferentemente, el medio según la invención es un medio gelificado. El agar es el agente de gelificación tradicional en microbiología para el cultivo de los microorganismos, pero es posible utilizar otros agentes gelificación tales como, por ejemplo, la gelatina, la gelatina o la agarosa. El medio de reacción según la invención puede contener otros aditivos eventuales tales como, por ejemplo, peptonas, uno o varios factores de crecimiento, hidratos de carbono, uno o más agentes selectivos, tampones, uno o varios agentes de gelificación, etc. Este medio de reacción puede presentarse en forma de líquido, o de gel listo para emplear, es decir, listo para realizar la siembra en tubos, en frascos o en placas de Petri.

En general, el medio de reacción puede contener en sí mismo un sustrato que permite la detección de una actividad enzimática o metabólica de los microorganismos considerados dianas, gracias a una señal que pueda detectarse directa o indirectamente. Para una detección directa, este sustrato puede asociarse a una parte que desempeñe el papel de marcador, fluorescente o cromógeno. Para una detección indirecta el medio de reacción según la invención, puede comprender en sí mismo un indicador de pH sensible a la variación de pH inducida por el consumo del sustrato y que revela el crecimiento de los microorganismos considerados dianas. Dicho indicador de pH puede ser un cromóforo o un fluoróforo. Como ejemplos de cromóforos se pueden citar el rojo neutro, el azul de anilina o el azul de bromocresol. Los fluoróforos comprenden, por ejemplo, la 4-metilumbeliferona, los derivados de la hidroxycumarina o los derivados de la resorufina. Asimismo, el sustrato fluorescente de PC-PLC utilizado preferentemente para la puesta en práctica del procedimiento según la invención, corresponde al 4-metil-umbeliferil-colina fosfato (4 MU-CP).

La comprensión del procedimiento según la invención será favorecida mediante los ejemplos que siguen, que no tienen en modo alguno carácter limitativo, en combinación con los dibujos, en los que:

- la Figura 1 ilustra medidas cinéticas de la actividad PC-PLC de diferentes bacterias Gram positivas;
- la Figura 2 ilustra la medida cinética de la actividad PC-PLC de la cepa *Bacillus cereus* ATCC 7064 en función del pH del medio fijado, respectivamente, en 7,23 ó 6,8;
- la Figura 3 ilustra la intensidad de coloración o de fluorescencia obtenida en 24 horas para diversas cepas de *Bacillus spp* en función del tipo de sustrato utilizado.

Ejemplo 1: Estudio de la actividad PC-PLC de *Bacillus cereus* frente a la observada para otras bacterias Gram positivas (Figura 1 y Tabla 1)

Diferentes cepas puras del género *Bacillus* así como otras bacterias Gram positivas fueron ensayadas en microplacas en presencia del medio que se indica. Seguidamente se realizó la lectura de la aparición de fluorescencia, en cinética, en cada uno de los diferentes pocillos de la microplaca durante 44 horas de incubación a 37°C.

1. MEDIO

Se utilizó el medio de la siguiente composición (composición en g/l), pH 7,2:

Compuestos	Concentración en g/l
Extracto de levadura	5
Piruvato de sodio	2
Glicerofosfato de magnesio	1
Tampón HEPES básico	13,8
Tampón HEPES ácido	11,92
4- Metilumbeliferil-colina fosfato ¹	0,4

¹4-Metilumbeliferil-colina fosfato (4-MU-PC), Biosynth®, Ref. M-5528

2. ENSAYOS

Los pocillos de la microplaca se inoculan con 10 Unidades que Forman Colonia (UFC) de bacterias del grupo *Bacillus cereus* y 1.000 UFC de las otras bacterias *Bacillus no cereus* y otras bacterias Gram positivas. Seguidamente la microplaca se incuba durante 44 horas a 37°C en un lector de microplacas con la finalidad de

evaluar la actividad PC-PLC de estas diversas cepas, en forma de cinética de hidrólisis del sustrato 4MU-CP, es decir, de detectar y medir la aparición de fluorescencia. El umbral de detección del aparato de medida se fija en 30.000 RFU (unidad relativa de fluorescencia)

3. RESULTADOS E INTERPRETACIÓN

- 5 La Figura 1 muestra una diferencia significativa entre la actividad PC-PLC observada en el *Bacillus cereus* (señal positiva a partir de 15 horas) y la observada en las otras bacterias Gram positivas (señal positiva que puede detectarse únicamente después de 40 horas de incubación). No es necesario añadir al medio un sistema inhibidor complejo para obtener este resultado.
- 10 Estos resultados han sido confirmados para 10 cepas pertenecientes al grupo *Bacillus cereus* frente a otras 15 cepas que no pertenecían al grupo *Bacillus cereus*. Estos últimos resultados están reagrupados en la Tabla 1.
- La discriminación de las cepas del grupo *Bacillus cereus* frente a las otras bacterias Gram positivas, es posible, por tanto, sin mezcla compleja de inhibidores (presencia únicamente de un inhibidor anti Gram negativas) en un intervalo de lectura comprendido entre 6 y 30 horas.
- 15 Tabla 1. Nivel de fluorescencia generado a 24 y 40 horas por hidrólisis del 4MU-PC por diversos microorganismos. Umbral de detección: 30.000 RFU. Las bacterias que pertenecen al grupo *Bacillus cereus* están indicadas en negrita.

Especies bacterianas	Niveles de fluorescencia en 24 horas (RFU)	Niveles de fluorescencia en 49 horas (RFU)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 7064	> 60000	> 60.000
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 6464	> 60000	> 60000
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9139	> 60000	> 60000
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	> 60000	> 60000
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 33019	> 60000	> 60000
<i>Bacillus cereus</i> NCTC 11145	> 60000	> 60000
<i>Bacillus thuringiensis</i> 0240015	> 60000	> 60000
<i>Bacillus mycoides</i> ATCC 6463	> 60000	> 60000
<i>Bacillus licheniformis</i> 93.08.043	2000	2000
<i>Bacillus sphaericus</i> 87.10054	20000	> 60000
<i>Bacillus circulans</i> ATCC 4513	20000	20000
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	10000	20000
<i>Bacillus lentus</i> ATCC 10840	5000	10000
<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061	5000	10000
<i>PaeniBacillus polymyxa</i> ATCC 21551	5000	10000
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	5000	5000
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19118	4000	15000
<i>L. monocytogenes</i> 0301902	5000	10000
<i>L. ivanovii</i> ATCC 49954	2000	10000
<i>L. ivanovii</i> 0002147	2000	10000
<i>S. aureus</i> 8407603	2000	2000
<i>S. aureus</i> 25923	2000	2000
Línea de base	2000	2000

- 20 Ejemplo 2: Estudio de la actividad PC-PLC de *Bacillus cereus* a pH 7,2 frente a pH 6,8 (Figura 2)

La dinámica de la actividad PC-PLC de *Bacillus cereus* ATCC 7064 se evaluó a pH 7,2 (medio A) frente a pH 6,8 (medio B)

1. MEDIOS

El medio A tiene la composición siguiente, pH 7,2

Compuestos	Concentración en g/l
Extracto de levadura	5
Piruvato de sodio	2
Glicerofosfato de magnesio	1
Tampón HEPES básico	13,8
Tampón HEPES ácido	11,92
4-Metilumbeliferil-colina fosfato	0,4

El medio B tiene la composición siguiente, pH 6,8:

Compuestos	Concentración en g/l
Extracto de levadura	5
Piruvato de sodio	2
Glicerofosfato de magnesio	1
Tampón PIPES Na	16,22
Tampón PIPES diNa	17,32
4- Metilumbeliferil-colina fosfato	0,4

2. ENSAYOS

- 5 Diez UFC de *Bacillus cereus* ATCC 7064 se inocularon en los pocillos de la microplaca en presencia del medio A (pH 7,2) y del medio B (pH 6,8). Después se incubó la microplaca durante 44 horas a 37°C en un lector de microplacas con la finalidad de evaluar la actividad PC-PLC de la cepa de *Bacillus cereus* ATCC 7064 a los dos pH estudiados

3. RESULTADOS E INTERPRETACION

- 10 La dinámica de la actividad PC-PLC del *Bacillus cereus* ATCC 7064 y las señales RFU así obtenidas a pH 7,2 son superiores. En efecto, la intensidad de la emisión de fluorescencia de la 4MU aumenta con el pH del medio (pH óptimo de emisión = 10).

- 15 Considerando el crecimiento y la actividad PC-PLC de *Bacillus cereus*, el pH óptimo del medio es 7,2. La obtención de señales superiores permite, por tanto, disminuir el tiempo de detección, es decir, de 10 horas en este caso preciso si se toma en consideración el umbral de detección en 30.000 RFU.

Nota: En el caso de una utilización del 4MU-MIP (4-Metilumbeliferil-mioinositol-1-fosfato, N-metil-morfolina sal, Biosynth®, Ref. M-5717) para diferenciar las bacterias del grupo *Bacillus cereus*, este pH de 7,2 no puede utilizarse debido a una inestabilidad del sustrato demasiado importante. Por consiguiente, se requiere un pH de 6,8 lo que arrastra un aumento del tiempo de detección

- 20 Ejemplo 3 : Estudio de los comportamientos de diferentes sustrato (cromogénicos frente a fluorogénicos) para poner de manifiesto la actividad PC-PLC de las bacterias del grupo *Bacillus cereus* frente a *Bacillus spp.* (Figura 3)

Se ensayaron diferentes cepas del género *Bacillus* en 10 medios diferentes. La lectura de las placas se efectuó después de 24 horas y 48 horas de incubación a 37°C.

- 25 Los sustratos ensayados han sido el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-colina fosfato (X-CP), cromógeno, el 5-bromo-6-cloro-3-indoxil-colina fosfato (magenta-CP), cromógeno, y el 4-metilumbeliferona-colina fosfato (4MU-CP), fluorescente.

1. MEDIOS

Se utilizó el medio de la composición siguiente (composición en g/l):

- 30
- extracto de levadura : 5 g/l
 - glicerofosfato de magnesio: 1 g/l
 - agar : 13 g/l
 - LiCl : 3 g/l
 - MOPS: 12,6 g/l
 - MOPS, sal sódica : 20,78 g/l.

- 35 Este medio se repartió en 10 frascos diferentes (T. 1. 9) que después fueron esterilizados mediante un ciclo de autoclave de 15 min/121°C. El medio T sirve de testigo de crecimiento. Se prepararon soluciones madre a 30 g/l de 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-colina fosfato (X-CP), 5-bromo-6-cloro-3-indoxil-colina fosfato (magenta-CP) y 4-metilumbeliferona-colina fosfato (4MU-CP) en agua de ósmosis inversa. Luego un volumen que correspondía a una concentración final de X-CP de 100, 300 y 900 mg/l, respectivamente, se añadió a los medios en sobrefusión, denominados respectivamente 1, 2 y 3. Se repitió la misma operación para los medios 4, 5 y 6 y 7, 8 y 9 que
- 40 contenían, respectivamente, 100, 300 y 900 mg/l de magenta-CP y 100, 300 y 900 mg/l de 4 MU-CP. Estos medios gelosados fueron distribuidos en placas de Petri.

2. ENSAYOS

La inoculación de las diferentes cepas de *Bacillus* se efectuó por aislamiento en tres cuadrantes a partir de suspensiones de 0,5 McF (unidades McFarland). Las placas se incubaron después durante 48 horas a 37°C.

Las colonias formadas se examinaron visualmente al cabo de 24 y 48 horas de incubación. La coloración o la fluorescencia (leída bajo lámpara UV a 366 nm) de estas colonias así como las intensidades, fueron anotadas.

3. RESULTADOS

5 Las intensidades de coloración y fluorescencia se leen en una escala relativa que va de 0 (ninguna coloración/fluorescencia) a 4 (coloración/fluorescencia muy intensa).

Los resultados están ilustrados en la Figura 3 (expresión de la actividad PC-PLC al cabo de 24 horas de incubación sobre diferentes especies de *Bacillus*). La ausencia de barra indica que la intensidad de la coloración o de la fluorescencia medida no es significativamente diferente del ruido de fondo y, por tanto, se trata de un resultado negativo.

10 4. INTERPRETACIÓN

La utilización del sustrato fluorogénico de PC-PLC, el 4MU-CP, al contrario que los sustratos cromogénicos (X-CP y magenta-CP), permite la detección y la discriminación de las bacterias del grupo *Bacillus cereus* frente a *Bacillus subtilis* con una sensibilidad y una especificidad de detección elevadas (100%); especialmente después de 24 horas de incubación a 37°C y sobre el conjunto de las cepas ensayadas.

15

REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento de identificación de bacterias del grupo *Bacillus cereus*, que comprende las etapas que consisten en:
 - 5 • poner en contacto, en un recipiente, una muestra susceptible de contener bacterias del grupo *Bacillus cereus*, un medio de reacción que comprende al menos un sustrato fluorescente de PC-PLC y un inhibidor de bacterias Gram negativas;
 - incubar el conjunto;
 - identificar las bacterias del grupo *Bacillus cereus* por detección de la reacción de hidrólisis del sustrato de PC-PLC;
- 10 caracterizado porque el pH del medio de reacción y el tiempo necesario para la detección de la reacción de hidrólisis del sustrato de PC-PLC utilizado, están adaptados de tal modo que dicha reacción de hidrólisis por las bacterias del grupo *Bacillus cereus* es detectada antes de que la hidrólisis del sustrato de PC-PLC por las bacterias Gram positivas distintas de las que pertenecen al grupo *Bacillus cereus* y potencialmente presentes en la muestra, no pueda detectarse.
- 15 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el pH del medio de reacción está comprendido entre 6,8 y 8,0.
- 3.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el tiempo necesario para la detección de la hidrólisis del sustrato de PC-PLC, está comprendido entre 6 y 30 horas.
- 20 4.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el medio de reacción está en forma líquida, de gel o sólida.
- 5.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el medio de reacción es un medio de cultivo.
- 6.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, que comprende una etapa previa de enriquecimiento de la muestra.
- 25 7.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el medio comprende, además, al menos un segundo sustrato, cromógeno o fluorescente.
- 8.- Procedimiento según la reivindicación precedente, en el que el segundo sustrato es un sustrato de PI-PLC que permite discriminar *Bacillus anthracis* de *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus mycoides* y *Bacillus pseudomycoides*.
- 30 9.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque es igualmente posible una enumeración de las bacterias del grupo *Bacillus cereus*.
- 10.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el recipiente está tomado del grupo constituido por microplacas, microcúpulas, microtubos, capilares o placas de muchos pocillos.
- 35 11.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el sustrato fluorescente de PC-PLC corresponde al 4 MU-CP (4-metil-umbeliferil-colina fosfato)
- 12.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que las bacterias del grupo *Bacillus cereus* están escogidas entre *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* y *Bacillus weihenstephanensis*, y las otras bacterias están escogidas entre *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Staphylococcus* o las otras especies del género *Bacillus spp.* tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lentus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium* y *Paenibacillus polymyxa*.
- 40 13.- Kit de diagnóstico que permite la utilización del procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, y que comprende un medio de reacción selectivo o no, cuyo medio comprende al menos un inhibidor de bacterias Gram negativas y un sustrato fluorescente de PC-PLC.
- 45 14.- Kit de diagnóstico según la reivindicación precedente, que comprende, además, un recipiente, tomado del grupo constituido por microplacas, microcúpulas, microtubos, capilares y placas de muchos pocillos.
- 15.- Kit de diagnóstico según una de las reivindicaciones 13 ó 14, en el que el sustrato fluorescente de PC-PLC corresponde al 4 MU-CP (4-metil-umbeliferil-colina fosfato).
- 50 16.- Kit de diagnóstico según una de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el medio de reacción comprende, además, al menos un segundo sustrato, cromógeno o fluorescente.

17.- Kit de diagnóstico según la reivindicación 16, en el que el segundo sustrato es un sustrato de PI-PLC que permite discriminar *Bacillus anthracis* de *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus mycoides* y *Bacillus pseudomycoides*.

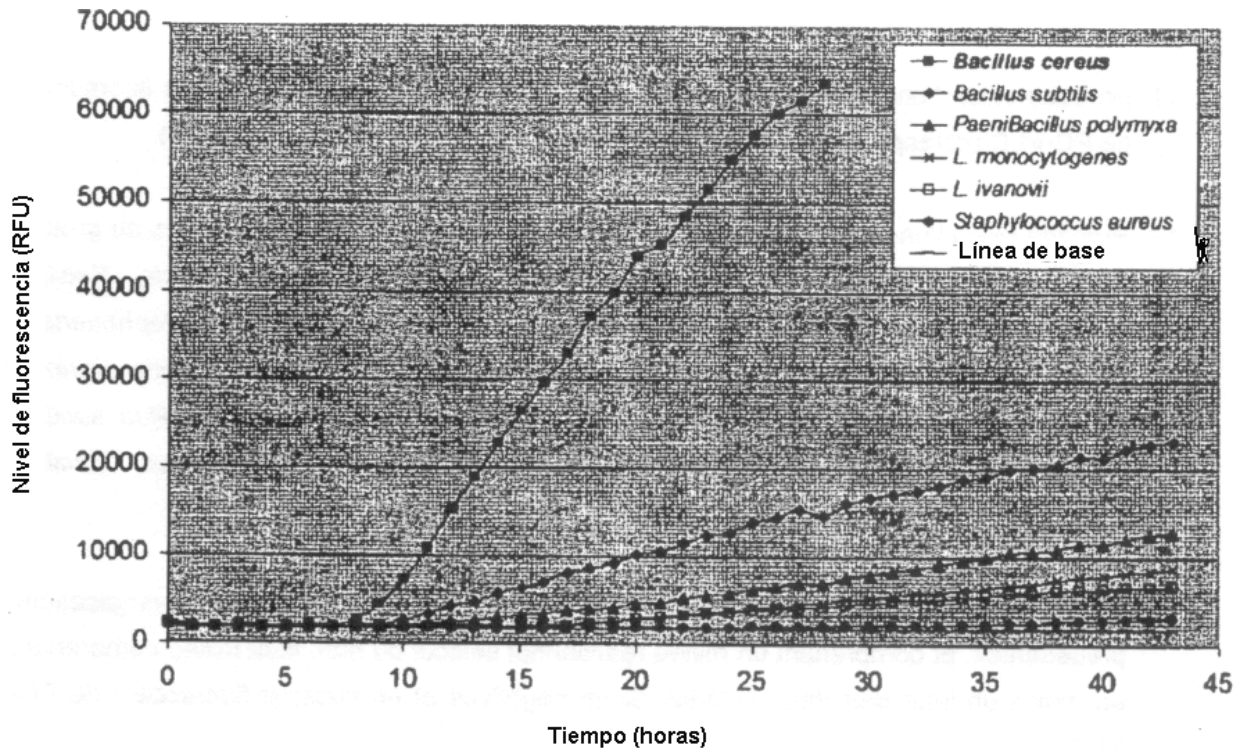


Figura 1

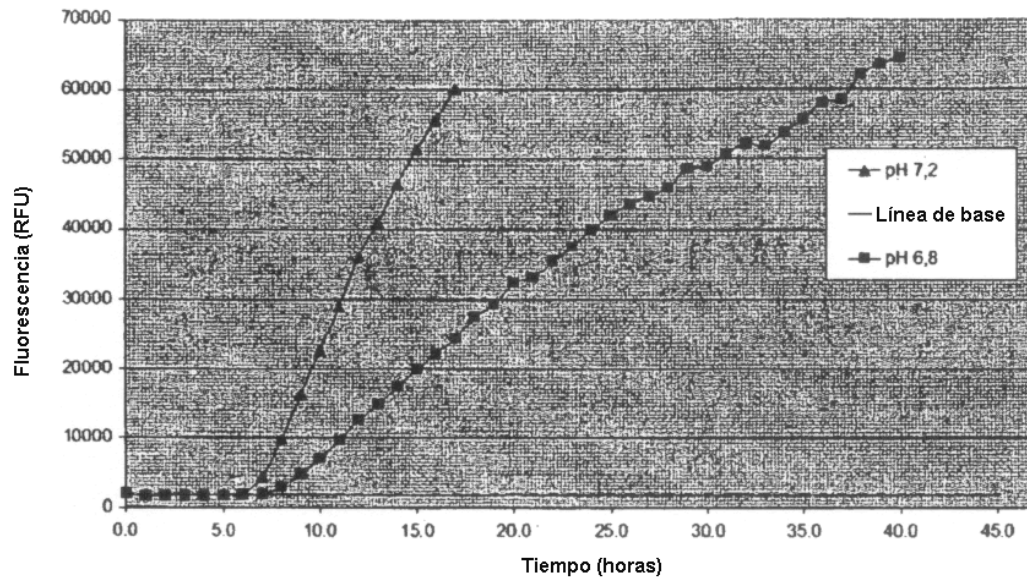
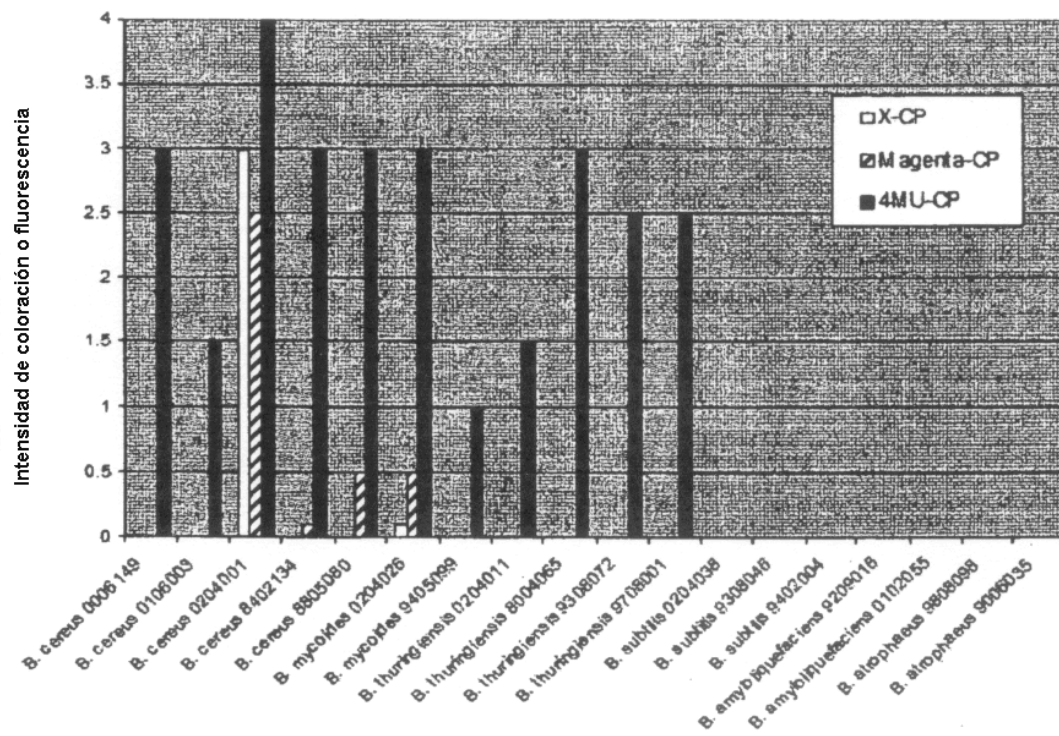


Figura 2



Cepas
Figura 3