

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 132**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2012 E 12707829 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014 EP 2670858**

54 Título: **Medio de cultivo de microorganismos que comprende el ácido para-aminobenzoico como agente selectivo**

30 Prioridad:

01.02.2011 FR 1150768

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

17.02.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ROCHE, JEAN-MARC

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 529 132 T3

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

DESCRIPCIÓN

Medio de cultivo de microorganismos que comprende el ácido para-aminobenzoico como agente selectivo

El campo de la invención es el del análisis de microorganismos diana en una muestra compleja.

Más particularmente, la presente invención se refiere a la detección de microorganismos tales como las bacterias del género *Salmonella*, mediante un medio de cultivo que contiene el ácido para-aminobenzoico como agente selectivo.

La calidad y la seguridad de los productos disponibles en el mercado forman parte de las preocupaciones principales de la industria agroalimentaria a nivel mundial. En las materias primas y en los productos finales, debe ser posible detectar, identificar y cuantificar la flora microbiana, y garantizar así el valor de los productos, desde su fabricación hasta su consumo. Es importante distinguir, por un lado, los indicadores de calidad del producto, reflejo de un porcentaje de contaminación global por una flora de alteración a la que pertenecen las enterobacterias como *Escherichia coli*, los estafilococos coagulasa positivos, los *Pseudomonas*, los *Bacillus*, las levaduras, los mohos, etc. y, por otro lado la detección de los patógenos tales como las bacterias del género *Salmonella* o *Listeria monocytogenes*. Para ello, el análisis microbiológico es primordial en términos de salud pública y en términos económicos para esta industria.

El desarrollo de ensayos de detección de microorganismos diana en una muestra responde a fuertes restricciones y es necesario encontrar un compromiso entre la sensibilidad, definida como la capacidad de poner en evidencia la especie buscada, cuando esta está presente en baja cantidad en una muestra a ensayar, y la selectividad, definida como la capacidad para detectar la especie buscada en la muestra que contiene también otras especies. La combinación de los componentes que aseguran la sensibilidad, con los que aseguran la selectividad, permite obtener un ensayo específico.

El criterio de sensibilidad impone frecuentemente recurrir a una composición que permite cultivar los microorganismos diana, a fin de hacerlos detectables. La especificidad puede así ser aportada por la incorporación en el medio de cultivo de una molécula marcadora implicada en el metabolismo de los microorganismos diana; produciendo esta interacción una señal medible.

Por otro lado, dependiendo de si se desea detectar y enumerar un género específico o la totalidad de los gérmenes viables, se podrá utilizar o no un medio selectivo.

En el caso de la búsqueda de microorganismos dianas, en particular de bacterias, la utilización de medios de cultivos cromogénicos es cada vez más importante. La ventaja de tales medios es contener unos sustratos enzimáticos específicamente escindidos o digeridos por las bacterias diana, de manera que se genera un producto de reacción coloreado, permaneciendo generalmente localizado en las colonias de dichas bacterias. Esto permite diferenciar dichas bacterias diana de otros géneros bacterianos eventualmente presentes en la muestra, en particular en el caso de muestra agroalimentaria. Tales medios de cultivo permiten también la identificación de una especie bacteriana contenida en una muestra clínica, siendo esta especie generalmente el origen de una infección.

En el caso de la búsqueda de microorganismos diana patógenos en muestras agroalimentarias, parece generalmente que el microorganismo diana está presente en la población mixta de microorganismos y en cantidad más baja que los microorganismos no-diana. Además de la simple diferenciación del microorganismo diana con respecto a los microorganismos no-diana, existe también la necesidad de inhibir selectivamente el crecimiento de dichos microorganismos no-diana, a fin de poder detectar el microorganismo diana, sin lo cual el desarrollo de dichos microorganismos no-diana tendería a ocultar el microorganismo diana, a pesar de que las colonias de este último se encuentran coloreadas, y así conducir a resultados falsamente negativos.

En particular, es pertinente poder diferenciar las bacterias del género *Salmonella* de otros tipos bacterianos y en particular de bacterias gram negativas, tales como las bacterias de la especie *Escherichia coli* (*E. coli*) que están entre las bacterias comensales presentes en las muestras.

Para ello, el documento WO-A-96/30543 describe un medio de cultivo para la detección de *Salmonella* que comprende un sustrato cromogénico para las especies de enterobacterias β -galactosidasa positivas tales como *E. coli*, y una mezcla de azúcares metabolizados por las *Salmonella* que generan un compuesto ácido y un indicador de pH que pone en evidencia la acidificación del medio. Por otra parte, unas sales biliares están presentes en el medio para inhibir selectivamente las especies gram positivas.

En los documentos EP-B-1 334 175 y EP-A-1 325 024 se ha descrito un método alternativo que permite detectar de manera específica las bacterias del género *Salmonella* y diferenciarlas de las bacterias gram negativas. Este método consiste en utilizar en un medio de cultivo, un agente selectivo que se presenta en forma de un sustrato denominado "suicida". Tal sustrato está constituido de una parte denominada "transportadora" y de una parte denominada "tóxica", estando estas partes unidas entre sí por un enlace destinado a ser cortado por las bacterias *E. coli* y no por

Salmonella, lo que conlleva la liberación y la concentración de la parte tóxica en el interior de *E. coli* e inhibiendo así su crecimiento, en beneficio de la *Salmonella*. El sustrato suicida favorito es la alafosfalina.

5 Tal sustrato presenta como principal inconveniente que entra en competición con los aminoácidos presentes en el medio de cultivo. Asimismo, para que sea activo en un gran número de especies bacterianas, es necesario disponer de un medio de cultivo relativamente pobre en aminoácidos, lo que no favorece el crecimiento de las bacterias del género *Salmonella*. Además, la alafosfalina es un compuesto relativamente caro, lo que incrementa de manera importante el precio del medio.

10 La presente invención permite paliar estos inconvenientes proponiendo una solución que consiste en un medio de cultivo que comprende, a título de agente selectivo, el ácido para-aminobenzoico. Un medio de cultivo está aquí definido como un medio que comprende todos los elementos necesarios para la supervivencia y/o el crecimiento de microorganismos, a saber aminoácidos o hidrolizados de proteínas, de minerales, de vitaminas y de manera general, todos los nutrientes y todas las fuentes metabólicas conocidas por el experto en la materia para permitir el crecimiento microbiano.

15 En efecto, los inventores han demostrado, de manera muy sorprendente, que la adición de ácido para-aminobenzoico a concentración relativamente elevada, en un medio de cultivo adecuado, permite inhibir o ralentizar en particular el crecimiento de las bacterias gram negativas, tales como las enterobacterias, en beneficio de las bacterias del género *Salmonella*.

Más particularmente, la invención se refiere a un medio de cultivo para microorganismos que comprende:

25 * al menos un sustrato, natural o sintético, de fermentación o de actividad enzimática, y

* al menos un agente selectivo, constituido por el ácido para-aminobenzoico, uno de sus derivados o una de sus sales, a una concentración comprendida entre 0,05 y 1 g/l, preferiblemente entre 0,05 y 0,8 g/l.

30 De manera preferida, el microorganismo diana es una bacteria del género *Salmonella*.

Los microorganismos no-diana se escogen del grupo de bacterias gram negativas que comprenden en particular las enterobacterias.

35 Un derivado del ácido para-aminobenzoico puede ser seleccionado del grupo que comprende en particular el ácido 4-aminobenzoico, el ácido 4-(metilamino)benzoico, el ácido 4-amino-2-clorobenzoico, el ácido 4-amino-3-nitrobenzoico, el ácido 4-aminosalicílico.

40 Una sal aceptable puede ser, por ejemplo, una sal de potasio o una sal de sodio. Así, se puede utilizar como compuesto el 4-aminobenzoato de potasio o también el 4-aminobenzoato de sodio.

Ventajosamente, el medio de cultivo según la invención comprende al menos un sustrato enzimático cromogénico o fluorogénico.

45 Preferiblemente, el medio de cultivo según la invención comprende además unas sales biliares. Puede, por ejemplo, comprender desoxicolato de sodio.

De manera ventajosa, dicho medio de cultivo puede comprender al menos otro agente selectivo escogido del grupo que comprende: Novobiocina, Vancomicina, Amfotericina, Cefsulodina.

50 En el sentido de la presente invención, el sustrato se selecciona entre todos los sustratos que pueden ser hidrolizados en un producto que permite la detección, directa o indirecta, de una actividad enzimática específica del microorganismo buscado. En el caso de la detección directa, el sustrato comprende una primera parte específica de la actividad enzimática y una segunda parte que actúa como marcador, que puede ser cromogénico o fluorescente.

55 El sustrato puede también ser un sustrato metabólico, tal como una fuente de carbón o de nitrógeno, cuyo producto de degradación hace variar el pH, variación detectable gracias a un indicador de pH. El indicador de pH es una sustancia química cuyo color varía en función de modificaciones del pH asociadas al crecimiento microbiano. Se citarán como ejemplos de indicador de pH, el rojo neutro, el azul de anilina, el azul de bromocresol. En un segundo modo de realización, el indicador de pH es un fluoróforo (por ejemplo la 4-metilumbelliferona, los derivados de cumarina, o los derivados de la resorufina).

60 En el sentido de la invención, se entiende por agente selectivo, cualquier compuesto susceptible de promover el crecimiento de un microorganismo diana y/o inhibir el crecimiento de uno o más microorganismos no-diana.

El medio de cultivo, objeto de la invención, puede estar en forma de polvo, en forma de gel o en forma líquida, listos para el uso, es decir listos para la siembra en un tubo, frasco, o sobre placa de Petri. En el caso de un medio

5 gelificado, el agar es el agente gelificante tradicional en microbiología para el cultivo de los microorganismos, pero es posible utilizar otro agente gelificante como, por ejemplo, gelatina o agarosa. Finalmente, el medio puede estar envasado en una botella, en un cartucho o en una tarjeta específicas de un aparato automatizado de bacteriología. Se citará a título de ejemplo la tarjeta Vitek[®], el mapa Tempo[®] y la botella Bact/ALERT[®], comercializados por la solicitante.

La invención se refiere también a un procedimiento de detección de un microorganismo diana, en una población mixta de células diana y no-diana, que comprende las etapas que consisten en:

10 * poner en contacto una muestra en la que se desea poner en evidencia dichos microorganismos diana con un medio de cultivo según la invención,

* incubar el conjunto a una temperatura que favorece la multiplicación de dichos microorganismos,

15 * observar los microorganismos sobre dicho medio de cultivo.

20 La temperatura que favorece el crecimiento de los microorganismos está comprendida entre 20 y 44°C y la muestra se mantiene a esta temperatura durante un tiempo suficiente para permite la detección de los microorganismos, es decir un tiempo comprendido entre 2 y 96 horas. Tratándose de la atmósfera de incubación, ésta es preferiblemente aeróbica, pero puede también ser anaeróbica, microaeróbica o bajo CO₂. La identificación puede llevarse a cabo a simple vista o por visualización de un cambio de coloración, que no se difunde en el medio de cultivo, por lo tanto se concentra a nivel de las colonias. En el caso de la revelación de la fluorescencia, se utilizan los dispositivos de lectura de la fluorescencia conocidos por el experto en la materia.

25 El medio de cultivo y el método de detección, objetos de la invención, son utilizados para muestras de origen alimentario, medioambiental o clínico. La muestra está definida como una pequeña parte o pequeña cantidad aislada de una entidad para el análisis.

30 Para las muestras de origen alimentario, se pueden citar de manera no exhaustiva una muestra de productos lácteos (yogures, quesos, etc.), de carne, de pescado, de huevos, de frutos, de verduras, de agua, de bebida (leche, zumo de frutas, soda, etc.). Una muestra alimentaria puede finalmente proceder de una alimentación destinada a los animales, tal como en particular unas harinas animales.

35 Se mencionarán también las muestras relacionadas con el medioambiente tales como muestras de superficie, de agua, de aire.

40 Las muestras de origen clínico pueden corresponder a unas extracciones de sangre total, de suero, de plasma, de orina, de heces, de líquido cefalorraquídeo, extracciones de la nariz, de la garganta, de la piel, de heridas, de órganos, de tejidos o de células aisladas, etc.

La invención se refiere finalmente a la utilización *in vitro* del ácido para-aminobenzoico, a uno de sus derivados o una de sus sales, a título de agente selectivo. De manera ventajosa, se utiliza a una concentración comprendida entre 0,05 y 1 g/l, preferiblemente entre 0,05 y 0,8 g/l.

45 Los ejemplos siguientes son dados a título ilustrativo y no tienen ningún carácter limitativo. Permiten comprender mejor la invención.

Ejemplos

50 Ejemplo 1 – Medio de cultivo para la detección de bacterias del género *Salmonella* que comprende 3 sustratos cromogénicos, una combinación de antibióticos (Novobiocina, Cefsulodina, Vancomicina, anfotericina) y diferentes concentraciones en ácido para-aminobenzoico (PABA).

1. Preparación de los medios ensayados

55 Los medios ensayados son los siguientes:

* Medio control: medio chromID[®] Salmonella (ref. 43621) comercializado por la solicitante que contiene Novobiocina, Vancomicina, anfotericina y Cefsulodina y los tres sustratos cromogénicos

60 * Medio 1: medio control, con adición de PABA 0,1 g/l,

* Medio 2: medio control, con adición de PABA 0,3 g/l,

65 * Medio 3: medio control, sin antibiótico y con adición de PABA 0,5 g/l,

Estos medios son unos medios en caja de Petri de 90 milímetros.

2. Siembra y lectura de los medios

5 Unas cepas de diferentes especies o serotipos de *Salmonella* (*S. enteritidis*, *S. thyphimurium*, *S. cubana*, *S. gallinarum*, *S. paratyphi* por ejemplo) y otros géneros microbianos tales como las bacterias gram negativas (*E. coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Hafnia*), todas procedentes de la colección de la solicitante, se pusieron en suspensión en agua fisiológica, y después se sembraron sobre los medios, según la técnica de los 4 cuadrantes. Las cepas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Las colonias formadas se examinaron visualmente después de 24 horas de incubación.

3. Resultados:

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 1 siguiente.

Medio	<i>Salmonella</i> detectadas / <i>Salmonella</i> ensayadas	Otras cepas Gram – diferentes de <i>Salmonella</i> con crecimiento / Otras cepas Gram – diferentes de <i>Salmonella</i> ensayadas
Control	9/9	8/10
1	9/9	6/10
2	9/9	7/10
3	9/9	1/5

Tabla 1

Estos resultados muestran una buena sensibilidad de detección de las cepas de *Salmonella* para todos los medios de cultivo. Sin embargo, sólo los medios 1 a 3 permiten disminuir el crecimiento de las otras bacterias Gram negativas.

Ejemplo 2 – Medio de cultivo para la detección de bacterias del género *Salmonella* que comprende 3 sustratos cromogénicos, una combinación de elementos selectivos (Novobiocina, Cefsulodina, Vancomicina, anfotericina, sales biliares, desoxicolato de sodio) y del ácido para-aminobenzoico (PABA)

1. Preparación del medio según la invención

Los medios ensayados en los experimentos son los siguientes:

* Medio control: medio chromID® *Salmonella* (ref. 43621) que contiene Novobiocina, Vancomicina, anfotericina y Cefsulodina, sales biliares 1,5 g/l y 3 sustratos cromogénicos

* Medio 1: medio control, con adición de PABA 0,1 g/l, sales biliares aumentadas a 3 g/l

* Medio 2: medio control, con adición de PABA 0,1 g/l, sales biliares aumentadas a 3 g/l y desoxicolato de sodio a 5 g/l

2. Siembra y lectura de los medios

Unas cepas que pertenecían a diferentes especies o serotipos de *Salmonella* (*S. enteritidis*, *S. thyphimurium*, *S. cubana*, *S. gallinarum*, *S. paratyphi*, *S. arizonae* por ejemplo) y otros géneros microbianos tales como las bacterias gram negativas (*Serratia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Hafnia*), todas procedentes de la colección de la solicitante, se pusieron en suspensión en agua fisiológica, y después se sembraron sobre los medios, según la técnica de los 4 cuadrantes. Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Las colonias formadas se examinaron visualmente después de 24 horas de incubación.

3. Resultados:

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 2 siguiente.

Medio	<i>Salmonella</i> detectadas / <i>Salmonella</i> ensayadas	Otras cepas Gram – diferentes de <i>Salmonella</i> con crecimiento / Otras cepas Gram – diferentes de <i>Salmonella</i> ensayadas
T	9/10	5/6
1	9/10	3/6
2	10/10	1/6

Tabla 2

Estos resultados muestran una excelente sensibilidad de todos los medios para la búsqueda de las cepas de

salmonella, con la detección de la totalidad de las 10 cepas de Salmonella para la fórmula 2.

Sin embargo, sólo los medios 1 y 2 permiten disminuir el crecimiento de otros géneros bacterianos distintos de *Salmonella*. La mejor selectividad se obtiene asociando el PABA con unas sales biliares tales como el desoxicolato de sodio.

5

REIVINDICACIONES

1. Medio de cultivo para la detección de al menos un microorganismo diana que comprende:
- 5 * al menos un sustrato, natural o sintético, de fermentación o de actividad enzimática, y
- * al menos un agente selectivo, que permite la inhibición de los microorganismos no-diana, constituido por el ácido para-aminobenzoico, uno de sus derivados o una de sus sales, a una concentración comprendida entre 0,05 y 1 g/l, preferiblemente entre 0,05 y 0,8 g/l.
- 10 2. Medio de cultivo según la reivindicación 1, en el que el microorganismo diana es una bacteria del género *Salmonella*.
3. Medio de cultivo según la reivindicación 1 ó 2, en el que los microorganismos no-diana se escogen del grupo que comprende en particular las enterobacterias.
- 15 4. Medio de cultivo según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el derivado del ácido para-aminobenzoico se escoge del grupo que comprende: el ácido 4-aminobenzoico, el ácido 4-(metilamino)benzoico, el ácido 4-amino-2-clorobenzoico, el ácido 4-amino-3-nitrobenzoico, el ácido 4-aminosalicílico.
- 20 5. Medio de cultivo según una de las reivindicaciones anteriores, que comprende además al menos un sustrato enzimático cromogénico o fluorogénico.
6. Medio de cultivo según una de las reivindicaciones anteriores, que comprende además unas sales biliares.
- 25 7. Medio de cultivo según una de las reivindicaciones anteriores, que comprende como sal biliar el desoxicolato de sodio.
8. Medio de cultivo según una de las reivindicaciones anteriores, al menos otro agente selectivo escogido del grupo que comprende: Novobiocina, Vancomicina, anfotericina, Cefsulodina.
- 30 9. Procedimiento de detección de un microorganismo diana, en una población mixta de células diana y no-diana, que comprende las etapas que consisten en:
- 35 * poner en contacto una muestra en la que se desea poner en evidencia dichos microorganismos diana con un medio de cultivo según una de las reivindicaciones 1 a 8,
- * incubar el conjunto a una temperatura que favorece la multiplicación de dichos microorganismos,
- 40 * observar los microorganismos sobre dicho medio de cultivo.
10. Utilización *in vitro* del ácido para-aminobenzoico, uno de sus derivados o una de sus sales, en un medio de cultivo como agente selectivo.
- 45 11. Utilización según la reivindicación anterior, en la que el ácido para-aminobenzoico, uno de sus derivados o una de sus sales, está presente en el medio de cultivo a una concentración comprendida entre 0,05 y 1 g/l, preferiblemente entre 0,05 y 0,8 g/l.