(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 647 451**

(51) Int. CI.:

C12Q 1/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.05.2006 PCT/FR2006/050446**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.01.2007 WO07000530**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2006 E 06794431 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 1888767**

(54) Título: **Medio de reacción para las bacterias Vibrio**

(30) Prioridad:

18.05.2005 FR 0551283

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.12.2017

(73) Titular/es:

BIOMERIEUX (100.0%)
CHEMIN DE L'ORME
69280 MARCY-L'ETOILE, FR

(72) Inventor/es:

MONGET, DANIEL y
ROBICHON, DENIS

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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 reacción para las bacterias Vibrio

La presente invención se refiere a un medio de cultivo para la detección de bacterias Vibrio. La invención se refiere también a la utilización de este medio, así como a un método para identificar unas bacterias Vibrio.

El cólera es una enfermedad diarreica muy contagiosa, que se debe a un bacilo Gram negativo, *Vibrio cholarea*. Asimismo, el *Vibrio parahaemolyticus* es responsable de gastroenteritis agudas. Las cepas bacterianas responsables de estas patologías se transmiten por vía oral a partir de agua o de alimentos contaminados. Debido al carácter epidérmico de estas enfermedades, es frecuentemente necesario detectar estar bacterias en pacientes contaminados, o en entornos tales como los alimentos y el agua.

El medio de referencia actualmente utilizado para la detección de las *Vibrio* es el medio TCBS (Thiosulfate Citrate Bile salt Saccharose). La gelosa TCBS es un medio selectivo, recomendado para la búsqueda y el aislamiento de las *Vibrio* patógenas (norma NF ISO 8914 y recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud). La fuerte concentración de bilis y de citrato, asociada a un pH elevado (pH = 8,6) permite la eliminación de numerosas bacterias. La principal fuente de carbono es la sacarosa. La utilización de la sacarosa se traduce por una disminución del pH, y por el cambio del indicador de pH del verde a amarillo. Las colonias sacarosa positivas, tales como varias especies de *Vibrio,* en particular *V. cholerae*, aparecen por lo tanto amarillas. Las colonias sacarosa negativas, como *V. parahaemolyticus*, aparecen verdes. Sin embargo, este medio no es muy sensible, ni muy específico y se detectan numerosos falsos positivos (es decir que se detectan unas bacterias consideradas como siendo unas *Vibrio*, pero que no los son).

Existe también el medio CHROMagar Vibrio. Este medio selectivo cromogénico permite la diferenciación de *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. cholerae* con respecto a las otras especies de Vibrio. *V. parahaemolyticusl aparece en forma de colonias malvas, V. vulnificus* y *V. choleare* producen unas colonias azules mientras que otras especies, tales como *V. alginolyticus*, forman unas colonias incoloras. Este medio se presenta en forma de polvo. El principio de este medio se basa en la detección simultánea de las actividades β-glucosidasa, específica de *V. parahaemolyticus*, y β-galactosidasa, específica de *V. cholerae* y *V. vulnificus*, en presencia de una fuerte concentración en sacarosa. Sin embargo, este medio presenta, además de algunas especies identificadas como falsos positivos, una sensibilidad de detección de los *V. cholerae* media.

El documento WO 02/00922 divulga un medio de cultivo destinado a poner en evidencia las bacterias del género *Vibrio*, caracterizado por que comprende al menos un agente cromógeno seleccionado entre los sustratos de la β-glucosidasa y los sustratos de la β-galactosidasa. Se reivindica también su utilización para la discriminación de las bacterias *V. cholerae* y *V-parahaemolyticus*. Dicho método se basa en el hecho de que *V. cholerae* presenta una actividad β-galactosidasa sin presentar actividad β-glucosidasa. Así, la adición de un agente cromógeno sustrato para la β-galactosidasa en un medio de cultivo de los *Vibrio* permite distinguir *V. cholerae* de los otros vibriones por coloración de las colonias formadas.

(Miyamoto T. *et al*., Appl. Environm. Microbiol., 1990, 56(5): 1480-1484) describe un ensayo fluorogénico de detección de *V. parahaemolyticus* cuya mejora consiste en la adición en el medio de arabinosa y de glucuronato, lo que permite el enriquecimiento específico de *V. parahaemolyticus* en comparación con las otras bacterias del género *Vibrio*.

La invención se propone resolver las lagunas del estado de la técnica presentando un medio de cultivo sensible y específico, para aislar e identificar unos *Vibrio* del grupo *cholerae* (*choleraevulnificus* y *mimicus*) y *Vibrio parahaemolyticus*.

A este respecto, la invención se refiere a un medio de reacción para las bacterias del grupo *cholerae* (*choleraelvulnificus* y *mimicus)* y *Vibrio parahaemolyticus* que comprende

* un sustrato que permite la detección de una actividad enzimática β-galactosidasa

* un azúcar que es la L-arabinosa y un azúcar que es el glucuronato

* un indicador coloreado seleccionado entre el rojo neutro y el azul de bromotimol.

En el sentido de la presente invención, se entiende por medio de reacción, un medio que comprende todos los elementos necesarios para la supervivencia y/o el crecimiento de microorganismos.

Este medio de reacción puede servir únicamente de medio de revelación, o bien de medio de cultivo y de revelación. En el primer caso, el cultivo de los microorganismos se efectúa antes de la inoculación y, en el segundo caso, el medio de reacción constituye también el medio de cultivo.

El medio de reacción puede ser sólido, semi-sólido o líquido. Por medio sólido, se entiende por ejemplo un medio gelificado. Preferiblemente, este medio está constituido por un medio gelificado. El agar es el agente gelificante tradicional en microbiología para el cultivo de los microorganismos, pero es posible utilizar gelatina o agarosa. Un cierto número de preparaciones están disponibles en el mercado, como por ejemplo el agar Columbia, la gelosa tripcasa-soja, la gelosa Mac Conkey, la gelosa Sabouraud, o más generalmente las descritas en el Handbook of Microbiological Media (CRC Press).

El medio de cultivo según la invención puede contener otros eventuales aditivos, como por ejemplo: peptonas, uno o varios factores de crecimiento, hidratos de carbono, uno o varios agentes selectivos, soluciones tampones, uno o varios gelificantes, etc. Este medio de cultivo puede presentarse en forma de líquido, de gel listo para el uso, es decir listo para la inoculación en tubo, frasco o sobre placa de Petri. Cuando la presentación es en frasco, se realiza preferiblemente una regeneración (paso a 100ºC) previa del medio antes de verter en placa de Petri. Preferiblemente, el medio según la invención es un medio selectivo, es decir un medio que comprende unos inhibidores de crecimiento de las bacterias y levaduras que no se desea detectar.

En el sentido de la presente invención, el sustrato se selecciona entre cualquier sustrato que se puede hidrolizar en un producto que permite la detección, directa o indirecta de una actividad enzimática β-galactosidasa. Preferiblemente, este sustrato comprende

⇒ una primera parte específica de la actividad enzimática a revelar. Esta primera parte es susceptible de interactuar con dicha enzima, que es específica del microorganismo buscado,

⇒ una segunda parte que sirve de marcador, denominada a continuación parte marcador, que puede ser fluorescente o cromógena.

Como sustrato fluorescente, se pueden citar, en particular, los sustratos a base de umbeliferona o de aminocumarina, a base de resorufina o también a base de fluoresceína.

Los sustratos enzimáticos de la invención son utilizables en una amplia gama de pH, en particular entre pH 5,5 y 10.

La concentración de sustrato enzimático de la invención en el medio de reacción está comprendida entre 0,01 y 2 g/l y, ventajosamente, es de 0,075 g/l. En efecto, a esta concentración de sustrato, se obtiene un mejor contraste de coloración.

Según un modo preferido de realización de la invención, dicho sustrato es un sustrato cromógeno X-β-galactosidasa, con X representando la parte marcador. Preferiblemente, el sustrato utilizado es el 5-bromo-4-coro-3-indoxil-beta D-galactopiranósido. Preferiblemente este sustrato está presente en el medio a una concentración comprendida entre 0,01 y 2 g/l, preferiblemente entre 0,05 y 1,15 g/l.

Según otro modo de realización de la invención, el sustrato se puede seleccionar entre los sustratos de β-galactosidasa como RedA-β-galactosidasa, Magenta-β-galactosidasa, GreenA-β-galactosidasa, Rose-β-galactosidasa y Alizarina-β-galactosidasa, que son sensibles para la detección de *V. cholerae*.

La L-arabinosa está presente en el medio a una concentración comprendida entre 1 y 30 g/l, preferiblemente entre 5 y 15 g/l. Preferiblemente, la concentración es de alrededor de 8 g/l.

Según un modo preferido de realización de la invención, el indicador coloreado es el rojo neutro. Preferiblemente, este indicador coloreado está presente en el medio a una concentración comprendida entre 0,0001 y 0,05 g/l, preferiblemente entre 0,002 y 0,010 g/l, preferiblemente entre 0,003 y 0,007 g/l. El indicador coloreado puede también ser el azul de bromotimol. Según un modo preferido de realización de la invención, la concentración es de aproximadamente 0,010 g/l.

A fin de mejorar la especificidad de detección de los *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio cholerae* con respecto a las otras especies bacterianas susceptibles de estar presentes en el medio, un segundo azúcar, que es el glucuronato, está presente en el medio a una concentración de entre 1 y 30 g/l, preferiblemente de entre 5 y 15 g/l. Preferentemente, la concentración es de aproximadamente 8 g/l.

La invención se refiere también a la utilización *in vitro* del medio tal como se define a continuación para aislar e identificar unos *Vibrio* grupo *cholerae* (*choleraelvulnificus* y *mimicus)* y *Vibrio parahaemolyticus*.

Durante la utilización de este medio, los *Vibrio cholerae* se detectan por una actividad β-galactosidasa específica que permite obtener unas colonias de azules a verdes. Los *Vibrio parahaemolyticus* se ponen en evidencia por la utilización específica de L-arabinosa que permite la obtención de colonias rosas (coloración muy intensa) que resulta de una acidificación en el medio que hace cambiar el indicador coloreado (rojo neutro) del incoloro a rosa vivo. En

presencia de sales biliares, la coloración permanece concentrada a nivel de la colonia, lo que facilita la lectura de los medios. Las otras especies de *Vibrio* aparecen de violetas o incoloras.

La invención se refiere finalmente a un método de identificación *in vitro* de bacterias *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* según la cual se detecta la actividad beta-galactosidasa para identificar *Vibrio cholerae* y la acidificación de un azúcar para detectar *Vibrio parahaemolyticus*.

Según un modo preferido de realización de la invención, se detecta la actividad beta-galactosidasa para identificar *Vibrio cholerae* por la utilización de un sustrato cromogénico específico de la actividad beta-galactosidasa. Este sustrato es tal como se ha definido anteriormente, y es preferiblemente el X-β-galactósido.

Según un modo preferido de realización de la invención, se detecta la acidificación de un azúcar mediante la utilización de un indicador coloreado, preferiblemente el rojo neutro, que cambia de color durante la variación de pH inducido por la acidificación del azúcar.

Los ejemplos siguientes se dan a título ilustrativo y no tienen ningún carácter limitativo. Permitirán comprender mejor la invención.

1. Elección de las cepas y de las muestras alimenticias

a- Evaluación del medio a partir de cepas puras:

El medio según la invención se ha ensayado sobre 69 cepas, entre ellas 22 cepas de *Vibrio* (8 *V.cholerae, 2 V.mimicus,* 2 *V. vulnificus,* 4 *V. parahaemolyticus, 2 V. alginolyticus, 2 V. fluvialis, 1V. hollisae y 1V. metschnikovii) ;* 8 cepas de *Staphylococcus ;* 6 cepas de *Pseudomonas ;* 6 cepas de *Candida ;* 4 cepas de *Enterococcus ;* 3 cepas de *Enterobacter ;* 2 cepas de *Escherichia coli ;* 2 cepas de *Klebsiella ;* 2 cepas de *Proteus ;* 2 cepas de *Salmonella ;* 2 cepas de *Shigella;* 2 cepas de *Yersinia;* 2 cepas de *Aeromonas;* 2 cepas de *Moraxella; 2* cepas de *Plesiomonas;* 1 cepa de *Listeria;* 1 cepa de *Acinetobacter*.

b- Evaluación del medio a partir de alimentos contaminados artificialmente:

Las 4 matrices alimenticias siguientes: Ostras, camarones, filete de lobo de mar congelado y trucha de mar entera se han contaminado por *V. cholerae*. Las otras 5 matrices, filete de maruca, gambas congeladas, mejillones, terrina de pescado y surimi se han contaminado por *V. parahaemolyticus*.

El protocolo utilizado es el descrito por las normas NF ISO 8914 y NF EN ISO 6887-3 que recomiendan un pre-enriquecimiento de 7 a 8 horas a 37ºC en agua peptonada salada (EPS). Las contaminaciones artificiales se realizan a partir de una suspensión bacteriana a 0,5 McFarland diluida a 10^{-5}. Un volumen de 1 ml o 0,1 ml de esta dilución se utiliza para contaminar respectivamente los pescados/otros crustáceos y los moluscos. Esta contaminación tiene lugar después de la trituración de las matrices alimenticias en EPS y almacenamiento durante 24h a 2-8ºC, pero antes de la incubación de 7-8h a 37ºC. Una muestra de 10 µl de cada pre-enriquecimiento se extiende después sobre el medio según la invención que se incuba durante 48h a 37ºC. En paralelo, se realiza un ensayo control en las mismas condiciones que anteriormente, pero sin contaminación artificial. Esto permite verificar, por un lado, la flora natural de cada matriz y, por otro lado, asegurarse de que no existe incompatibilidad entre el medio según la invención y la detección de las colonias de *Vibrio*.

2. Preparación del medio según la invención

El medio según la invención es un medio selectivo que comprende, como medio base, el medio Trypcase-Soja (bioMérieux réf. 43011), y que comprende los elementos siguientes (g/l)

IPTG (IsoPropyl ThioGalactopyranoside)	0,05
Sales biliares	0,6
Rojo neutro	0,005
L-arabinosa	10
5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-beta-D-galactopiranósido)	0,1

Se añade también un segundo azúcar (glucuronato; 10 g/l) para mejorar la especificidad de detección de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio cholerae*.

3. Inoculación de los medios a partir de cepas puras

Las cepas de bacterias y levaduras, todas procedentes de la colección de la solicitante, puestas en suspensión en agua fisiológica, se han inoculado para dar unas colonias aisladas sobre el medio. Las cajas se incubaron a 37ºC durante 48 horas. Las colonias formadas se examinaron visualmente después de 24 y más de 40 horas de

incubación. La intensidad de coloración de estas colonias se evaluó y cada cepa se clasificó después positiva o negativa (expresando o no expresando el fenotipo buscado) sabiendo que una cepa se considera como positiva para unos valores de intensidad de coloración > a 0,5.

Según el principio del medio, las cepas de *Vibrio cholerae*, que expresan una actividad β-galactosidasa (utilización de X-β-galactosidasa) deben producir unas colonias azules-verdes mientras que las de *V- parahaemolyticus*, que utilizan L-arabinosa con acidificación del medio y cambio del indicador coloreado, deben dar unas colonias de color rosa vivo. Los otros géneros o especies pueden dar unas colonias violetas (utilización de la arabinosa asociada a una actividad β-falactosidasa) o incolora (arabinosa (-) y β-galactosidasa (-)).

4. Lectura de los medios:

Escala de lectura de las intensidades de coloración:

Es una escala arbitraria común al conjunto de las muestras biológicas y de los medios ensayados. Esta escala es válida para este experimento así como para todos los experimentos siguientes. Se pueden definir de la siguiente manera:

* 0 corresponde a una ausencia de actividad

* 0,1 corresponde a la presencia de una traza de coloración

* 0,5 corresponde a la presencia de una coloración muy pálida

* 1 corresponde a la presencia de una coloración clara de baja intensidad

* 2 corresponde a la presencia de una coloración pura de intensidad media

* 3 corresponde a la presencia de una coloración intensa

* 4 corresponde a la presencia de una coloración muy intensa

a) sobre cepas puras

Los resultados se expresan en % de buen diagnóstico con respecto a todos los ensayos en términos de sensibilidad y especificidad después de 24 horas de incubación y se dan en la tabla siguiente, correspondiendo el % de sensibilidad al número de verdaderos positivos detectados en el medio por el número total de verdaderos positivos a detectar, y correspondiendo el % de especificidad al número de verdaderos negativos detectados sobre el medio por el número total de verdaderos negativos a detectar.

Sensibilidad		Especificidad	
V. cholerae	*V.parahaemolyticus*	*V. cholerae*	*V. parahaemolyticus*
100%	100%	100%	95,5

Estos resultados muestran, por un lado, que el conjunto de las cepas de *Vibrio cholerae* dan, o bien unas colonias de color esperado (sensibilidad al 100%) y que, por otro lado, ninguna de las 57 cepas no *V. cholerae* desarrolla el color característico de *V. cholerae* (especificidad del 100%). Las 4 cepas de *V. parahaemolyticus* dan también unas colonias que tienen el color esperado (sensibilidad del 100%). Entre las 65 cepas no *V. parahaemolyticus*, sólo 3 de ellas han sido clasificadas como falsos positivos (2/2 *Vibrio fluvialis* y 1/2 *Enterobacter aerogenes)* y generan unas colonias rosas características de *V. parahaemolyticus* (especificidad del 95,5%).

b) sobre matrices alimenticias

Los resultados presentados en la tabla siguiente son los observados después de 24h de incubación a 37ºC. Cada medio obtenido a partir de una matriz contaminada artificialmente se compara con el medio control (obtenido a partir de una matriz alimenticia no contaminada artificialmente) a fin de detectar, entre la flora asociada, la especie bacteriana teóricamente utilizada para contaminar el alimento. Cada colonia así detectada se aísla entonces y después se identifica con la ayuda de los ensayos clásicos. Si se confirma la identificación, la colonia se considera un verdadero +, en el caso contrario es un falso +. Por otro lado, además de las colonias de color esperado, se realiza una identificación sobre las otras colonias no esperadas pero que presentan una coloración característica. Si la identificación confirma una especie que pertenece a otra especie diferente de la esperada, pero que pertenece al grupo *Vibrio cholerae (vulnificus, mimicus)* o *parahaemolyticus*, se trata entonces de verdadero +, naturalmente presente en el alimento, por el contrario, si la identificación no confirma la *Vibrio cholerae (vulnificus, mimicus)* o *parahaemolyticus*, la especie se considera como falso +.

Sensibilidad (número de verdaderos+ obtenidos sobre el número de verdaderos+ esperados)		Especificidad (número de falsos+ obtenidos)	Legibilidad
V. cholerae	*V. parahaemolyticus*		
4/4	5/5	4 a 5 falsos+	+++

Todas las cepas utilizadas para contaminar las matrices alimenticias se han encontrado después del enriquecimiento y aislamiento sobre el medio según la invención. La legibilidad del medio es muy satisfactoria en la medida en la que es fácil detectar las colonias positivas, azul-verdes o rosas, en medio de la flora anexa, incluso si esta última está presente en abundancia.

5. Ventajas del medio Vibrio ID:

El medio Vibrio ID posee excelentes rendimientos en términos de sensibilidad y especificidad. La legibilidad, es decir la capacidad para detectar unas colonias positivas o separar unas colonias negativas, es también muy buena. La sensibilidad es muy buena en el caso de muestras débilmente contaminadas.

REIVINDICACIONES

1. Medio de reacción para las bacterias *Vibrio* grupo *Cholerae* (*cholerae*/*vulnificus* y *mimicus*) y *Vibrio parahaemolyticus* que comprende

* un sustrato que permite la detección de una actividad enzimática β-galactosidasa

* un azúcar que es la L-arabinosa

* un azúcar que es el glucuronato

* un indicador coloreado seleccionado entre el rojo neutro y el azul de bromotimol.

2. Medio de reacción según la reivindicación 1, según el cual dicho sustrato es un sustrato cromógeno X-β-galactosidasa.

3. Medio de reacción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, según el cual el indicador coloreado es el rojo neutro.

4. Método de identificación *in vitro* de bacterias *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* según el cual se detecta la actividad beta-galactosidasa para identificar *Vibrio cholerae* y la acidificación de la L-arabinosa para detectar *Vibrio parahemolyticus*, que comprende la utilización de un medio de reacción que comprende

* un sustrato que permite la detección de una actividad enzimática β-galactosidasa

* un azúcar que es la L-arabinosa

* un azúcar que es el glucuronato

* un indicador coloreado seleccionado entre el rojo neutro y el azul de bromotimol.

5. Utilización *in vitro* de un medio según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para aislar e identificar unos *Vibrio* grupo *cholerae* (*cholerae*/*vulnificus* y *mimicus)* y *Vibrio parahaemolyticus*