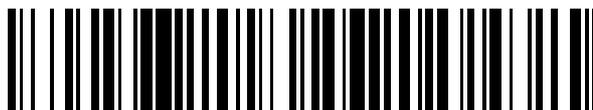


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 132**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/10 (2006.01)

C12Q 1/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.12.2013 PCT/FR2013/053259**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14102503**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.12.2013 E 13824628 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2938741**

54 Título: **Medio de detección de microorganismos que comprende al menos un alquil(tio)glucósido**

30 Prioridad:

28.12.2012 FR 1262965

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

03.05.2018

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)
69280 Marcy l'Étoile, FR**

72 Inventor/es:

**CELLIER, MARIE;
ORENGA, SYLVAIN y
PERRY, JOHN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 666 132 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 detección de microorganismos que comprende al menos un alquil(tio)glucósido

Campo técnico

5 La presente invención se refiere al análisis microbiológico por vía bioquímica, y más concretamente por vía enzimática. De manera más específica, la presente invención se refiere a la detección de microorganismos (por ejemplo de cepas bacterianas) por siembra de medios de reacción, especialmente con fines de caracterización (identificación de dichos microorganismos, determinación de las propiedades de resistencia potencial de estos últimos en al menos un agente antimicrobiano, etc.) y/o recuento de dichos microorganismos. Estos medios de reacción comprenden sustratos cromógenos y/o fluorógenos susceptibles de reaccionar con las enzimas microbianas específicas de los microorganismos buscados.

Estado de la técnica

15 En el ámbito de la presente invención, uno se interesa más especialmente en la detección de microorganismos patógenos o indicadores de calidad (especialmente para su caracterización y/o recuento), ya sea en el medio médico o en el medio industrial, y más especialmente de microorganismos con actividad enzimática de tipo esterasa (que comprende especialmente las actividades carboxilesterasa, lipasa y fosfolipasa), osidasa, peptidasa, sulfatasa o fosfatasa, por ejemplo las bacterias o levaduras de los géneros *Salmonella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Candida*, y, más específicamente, a la detección de bacterias del género *Salmonella* basándose en la identificación/detección de una actividad enzimática esterasa.

20 Las cepas de *Escherichia coli* se ponen a menudo de manifiesto por la revelación de una actividad enzimática de tipo osidasa tal como la actividad β -glucuronidasa o β -galactosidasa.

De la misma manera, el género *Listeria* se detecta mediante la identificación de la actividad β -glucosidasa.

Una actividad aminopeptidasa también puede usarse para revelar un grupo, un género o una especie de microorganismo. Por ejemplo, la actividad L-alanina-aminopeptidasa permite diferenciar las bacterias Gram-negativas de bacterias Gram-positivas.

25 El género *Salmonella*, responsable en personas de diversas infecciones graves (fiebre tifoidea, intoxicación alimentaria), posee esterases no específicas capaces de hidrolizar sustratos sintéticos cromógenos, por ejemplo indigógenos.

30 La detección y la caracterización de las salmonelas - y más generalmente de bacterias con actividad esterasa - se realizan habitualmente en caldo de cultivo o en medios de agar-agar que permiten la detección y caracterización de las colonias sospechosas de bacterias con actividad esterasa, incluidas las salmonelas. La siembra de dichos medios tiene lugar al poner en contacto la muestra biológica con el medio.

35 Las bacterias con actividades esterases, osidasas peptidasas, sulfatasas o fosfatadas poseen en su patrimonio enzimático esterases, osidasas, peptidasas, sulfatasas o fosfatadas que escinden enlaces diana sustratos enzimáticos sintéticos presentes en el medio y liberando de este modo el resto cromóforo o fluoróforo activado de dichos sustratos. Esto da como resultado una coloración o una fluorescencia que revela hidrólisis y, por lo tanto, la presencia de bacterias o colonias de bacterias diana.

40 Para poder realizar pruebas de rutina de gran envergadura, es necesario que los medios de detección y/o caracterización y/o áreas de recuento sean estables y permitan simplificar al máximo los procedimientos de detección y/o de caracterización y/o de recuento correspondientes, limitando las manipulaciones. Además, es importante que los procedimientos proporcionan muy buena sensibilidad (intensidad de color o fluorescencia) así como una especificidad de detección de primer orden (para limitar o evitar la detección de "falsos positivos"). La velocidad de desarrollo de colonias sospechosas es también un parámetro fundamental de estos tipos de medios y procedimientos de detección de bacterias que presentan las actividades enzimáticas mencionadas anteriormente.

45 Sin embargo, se sabe que los sustratos sintéticos de enzimas tales como las esterases, osidasas, peptidasas, sulfatasas o fosfatadas plantean problemas de compatibilidad con los medios de cultivo para microorganismos, y en particular para las bacterias que tienen estas actividades. Además, dichos sustratos no son estables en el tiempo, lo que indica una disminución la sensibilidad frente a la actividad enzimática correspondiente con el aumento del tiempo de almacenamiento.

50 En este contexto, se sabe a través del artículo científico titulado "*Synthèse de substrats indigogéniques. Mise en évidence de l'activité estérasique des salmonelles*" A. Agban *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.* (1990) 25, 697-699, medios de cultivo de agar-agar que comprende sustratos indigógenos, a saber, especialmente, el pelargonato (C9) de 5-bromo-indoxilo y una sal biliar, a saber, desoxicolato de sodio. Dichos medios de cultivo adolecen de los mismos inconvenientes que los mencionados más adelante en referencia al documento FR-A-2697028.

La solicitud de patente FR-A-2697028 da a conocer un medio de cultivo para la puesta de manifiesto de salmonelas que comprende un sustrato de esterasa cromógeno constituido por un éster del ácido caprílico con un resto indol (5-bromo-4-cloro-3-indolil-caprilato), así como un detergente seleccionado de entre las sales biliares (desoxicolato de sodio). Este cromógeno y esta sal biliar están contenidos en un medio nutriente que permite el crecimiento de salmonelas. Según la enseñanza de la solicitud de patente FR-A-2697028, se añade la sal de bilis directamente al medio selectivo en el que ya está incluido el sustrato de esterasa. Sin embargo, este medio de cultivo no ofrece todas las garantías deseables en términos de estabilidad del sustrato de esterasa. Además, resulta que este último no es completamente miscible con el medio de cultivo. Esto obviamente afecta la calidad de los resultados obtenidos en términos de sensibilidad (intensidad de la coloración obtenida), velocidad y estabilidad. También debe observarse que el medio de cultivo según el documento FR-A-2697028 está en forma de polvo. Esto obliga al usuario a realizar una operación de redisolución previa del medio líquido o gelificado. Esta restricción resulta de la falta de estabilidad de los sustratos de esterasa usados.

Otro inconveniente del empleo de sales biliares - tales como desoxicolato de sodio - es que éstas son materias primas de origen animal, lo que favorece cierta variabilidad en la calidad.

Además, los resultados obtenidos con el medio de cultivo según el documento FR-A-2697028 son perfectibles en términos de actividad biológica.

La patente EP-B-1334206 en nombre del solicitante, describe un medio de detección/identificación de microorganismos (y principalmente bacterias y/o levaduras) con actividad enzimática seleccionado entre las actividades esterases y/o osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas. Este medio, en forma líquida o gelatinosa, listo para usar y estable al almacenamiento, comprende especialmente:

- al menos un sustrato de esterases, de osidasas y/o de peptidasas y/o de sulfatasas y/o de fosfatasas, cromógeno o fluorógeno, y
- al menos un éster de sorbitán de ácido(s) graso(s) (ESAG), o al menos un ácido graso (AG) o una mezcla de ESAG/AG, como agente estabilizante emulsionante (en un determinado porcentaje en peso),
- y opcionalmente al menos un disolvente (S).

Siempre según la patente EP-B-1334206, el ESAG se selecciona preferiblemente del grupo que comprende:

- monolaurato de sorbitán polioxietileno que comprende 20 motivos de óxido de etileno (O.E), -TWEEN® 20-;
- monopalmitato de sorbitán polioxietileno (20 O.E), -TWEEN® 40-;
- monoestearato de sorbitán polioxietileno (20 O.E), -TWEEN® 60-;
- triestearato de sorbitán polioxietileno (20 O.E), -TWEEN® 65-;
- monooleato de sorbitán polioxietileno (20 O.E), -TWEEN® 80-;
- sesquioleato de sorbitán polioxietileno (20 O.E), -TWEEN® 83-;
- trioleato de sorbitán polioxietileno (20 O.E), -TWEEN® 85-;

y sus mezclas.

Los ésteres de sorbitán y ácidos grasos (ESAG) son tensioactivos conocidos, ampliamente utilizados en preparaciones alimentarias y farmacéuticas. A título ilustrativo, se puede citar el artículo de DICKINSON *et al.* "J. Colloid Interface Sci. 15 de abril 1999; 212 (2): 466-473" en relación con la estabilización de emulsiones que contienen caseinato de sodio y un monolaurato de sorbitán polioxietileno que comprende 20 motivos de óxido de etileno (TWEEN® 20). Las emulsiones consideradas son emulsiones de aceite en agua (30% en volumen de n-tetradecano a pH 6,8).

Aunque la sensibilidad de detección del medio de reacción según la patente EP-B-1334206 sea relativamente satisfactoria, existe la necesidad de desarrollar un medio de detección de microorganismos basado en la identificación de una actividad enzimática microbiana seleccionada entre las actividades esterases y/o osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas de microorganismos y que ofrece rendimientos superiores a los obtenidos aplicando los medios de la técnica anterior, y principalmente el objeto de la patente EP B-1334206. Por rendimientos superiores se entiende, especialmente, una sensibilidad de detección aumentada, es decir, las intensidades de coloración y/o de fluorescencia más altas posibles para las colonias de los microorganismos diana. Esto demuestra ser especialmente deseable en lo que se refiere a la detección de salmonelas mediante la identificación de una actividad de esterasa. Además, y aparte del criterio de sensibilidad requerido, también es importante que el medio de detección de microorganismos antes mencionado sea fiable, específico y reproducible.

La solicitud de patente EP-A1-2107119 da a conocer una composición para la permeabilización celular, útil para inducir la penetración de marcadores fluorógenos en el interior de una célula diana conservando la viabilidad de esta última, comprendiendo esta composición:

- una concentración final (peso volumen) de al menos 0,01% de N-octil-β-D-glucopiranosido (NOG);
- 5 - una concentración final (peso volumen) de al menos 0,1% de polifosfatos de sodio (HMP); y
- una concentración final (moles/litro) de al menos 1 mmol/l de cloruro de rubidio (RbCl) y/o cloruro de litio (LiCl).

Además, la composición según este documento puede comprender al menos un marcador fluorógeno, que puede estar comprendido directamente en el seno de dicha composición o almacenado por separado o aplicado directamente, en la etapa de detección de células permeabilizadas por la susodicha composición.

- 10 Un objetivo de la presente invención es desarrollar un medio de detección de microorganismos (especialmente con el fin de su caracterización y/o recuento) basado en la identificación de una actividad enzimática microbiana seleccionada entre las actividades de esterases y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas de microorganismos que conlleva al menos un sustrato enzimático seleccionado a partir de sustratos de esterases y/o sustratos de osidasas y/o sustratos de peptidasas y/o sustratos de sulfatasas y/o sustratos de fosfatasas,
- 15 cromógeno y/o fluorógeno y que sea estable a la conservación (intensidad de la coloración o fluorescencia del revelado mantenido a un nivel máximo durante al menos varias semanas). Otro objetivo de la invención es obtener un medio de detección de microorganismos en base a la detección de una actividad enzimática microbiana seleccionada entre la actividades esterases y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas de microorganismos, que no se presenta en forma de un polvo seco para regenerarse con un líquido para redissolver un
- 20 medio líquido o gelificado, pero que existe directamente en formas listas para usar.

Otro objetivo de la invención tiene por objeto reducir las cantidades de sustrato(s) enzimático(s) cromógeno(s) y/o fluorógeno(s) utilizados, que es/son conocido(s) por los expertos en la técnica por ser particularmente costoso(s).

- 25 Otro objetivo más de la invención consiste en desarrollar un procedimiento de obtención el medio de detección mencionado anteriormente que sea sencillo de realizar y que permita en particular caracterizar los microorganismos buscados (en particular mediante su identificación y/o la determinación de sus propiedades de resistencia potencial a al menos un agente antimicrobiano) y/o efectuar su recuento sin excesiva dificultad.

Otros objetivos aparecerán al leer la presente solicitud.

Presentación de la invención

- 30 La presente invención tiene como objetivo satisfacer la necesidad mencionada anteriormente y alcanzar todos o parte de los objetivos mencionados anteriormente.

Por consiguiente, un primer objeto de la presente invención se refiere a un medio de detección de microorganismos, basándose dicha detección en la identificación de una actividad enzimática microbiana seleccionada a partir de actividades esterases y/u osidasas y/o peptidasas y/o o sulfatasas y/o fosfatasas de microorganismos, preferentemente dicha actividad enzimática microbiana es una actividad esterasa, comprendiendo dicho medio:

- 35 - al menos un sustrato cromógeno y/o fluorógeno específico de la actividad enzimática buscada, preferentemente específico de una actividad esterasa,
- al menos un compuesto de tipo alquilglucósido o alquil(tio)glucósido en el que el resto alquilo es un radical alifático lineal,
- al menos un disolvente (S);

- 40 en el que

Según una realización preferida, cuando el medio de detección de microorganismos según la invención comprende n-octil-β-D-glucopiranosido como alquilglucósido, dicho medio no comprende ningún compuesto(s) comprendido(s) en el grupo constituido por polifosfatos de sodio (HMP), cloruro de rubidio (RbCl) y cloruro de litio (LiCl).

- 45 Otro objeto de la presente invención se refiere a un medio de detección de microorganismos, estando basada dicha detección en la detección de una actividad enzimática microbiana seleccionada entre las actividades de esterases y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas de microorganismos, siendo preferentemente dicha actividad enzimática microbiana una actividad esterasa, consistiendo dicho medio esencialmente en:

- al menos un sustrato cromógeno y/o fluorógeno específico de la actividad enzimática buscada, preferentemente específico de una actividad esterasa,
- 50 - al menos un alquil(tio)glucósido,

- al menos un disolvente (S), y opcionalmente un medio de cultivo adaptado para permitir el crecimiento de los microorganismos buscados (microorganismos diana).

La invención también se refiere a un medio de detección de microorganismos, basándose dicha detección en la detección de una actividad enzimática microbiana seleccionada entre las actividades esterases y/o osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas de microorganismos, siendo preferentemente dicha actividad enzimática microbiana una actividad esterasa, consistiendo dicho medio en:

- 5 - al menos un sustrato cromógeno y/o fluorógeno específico de la actividad enzimática buscada, preferentemente específico de una actividad esterasa,
- al menos un alquil(tio)glucósido,
- 10 - al menos un disolvente (S),
- un medio de cultivo adaptado para permitir el crecimiento de microorganismos buscados (microorganismo diana).

En la práctica, el experto en la técnica seleccionará el medio de cultivo en función de los microorganismos diana (y en especial en función de las bacterias diana), según criterios perfectamente conocidos y dentro del alcance de este experto en la técnica. Este medio de cultivo no comprende compuesto(s) comprendido(s) en el grupo que constituido por polifosfatos de sodio (HMP), cloruro de rubidio (RbCl) y cloruro de litio (LiCl).

- 15 El término alquil(tio)glucósido debe entenderse en el sentido de la presente invención, como que puede diseñarse un compuesto de tipo alquilglucósido (es decir, en el que el resto alquilo está conectado al resto glucídico mediante un enlace éter -O-) o de tipo alquiltiogluco(sido) (es decir, en el que el resto alquilo está conectado al resto glucídico mediante un enlace tioéter -S-), razón por lo que la raíz "tio" aparece entre paréntesis en este término.

- 20 Dicho resto alquilo es generalmente alifático, lineal o ramificado, saturado o insaturado. Por resto alquilo "alifático" se entiende, en el sentido de la presente invención, un resto alquilo lineal o ramificado abierto o lineal (acíclico). Según una realización preferida, el resto alquilo del compuesto de alquil(tio)glucósido es un radical alifático lineal (no ramificado), preferiblemente saturado.

- 25 El resto glucídico, por su parte, puede ser un resto de osa (monosacárido) o de óxido (sacárido). El terminología alquil(tio)glucósido abarca por lo tanto, en el sentido de la presente invención, a la vez los alquil(tio)glucósidos y alquil(tio)poliglucósidos que pueden utilizarse solos u opcionalmente en combinación con otros tensioactivos, tales como uno o varios tensioactivos aniónicos.

Estos alquil(tio)glucósidos son tensioactivos no iónicos utilizados habitualmente en una amplia gama de aplicaciones industriales y especialmente en detergencia o en cosmética.

- 30 Sin estar ligado a la teoría sigue, el o los alquil(tio)glucósido(s) de alquilo utilizado(s) para los fines de la presente invención parece(n) actuar como agente(s) estabilizante(s)-emulsionante(s). Pueden estar asociados, según una realización concreta, a al menos un agente sinérgico conjunto, preferentemente, a al menos un tensioactivo aniónico, preferentemente el 7-etil-2-metil-4-undecilbisulfato o al menos a una de sus sales y más especialmente a sus sales de sodio (TERGITOL-4®).

- 35 Los diversos procedimientos para obtener alquil(tio)glucósidos según la presente invención son bien conocidos por un experto en la técnica. Por lo tanto, este último puede, opcionalmente, adquirirlos en el comercio o sintetizarlos utilizando sus conocimientos generales o basándose en las publicaciones existentes sobre este tema.

Preferiblemente, se usa como alquil(tio)glucósido, al menos un alquilglucósido.

El "medio de detección" según la invención se debe entender que puede consistir en:

- 40 - un medio que permite detectar/determinar la presencia o ausencia de microorganismos, en particular microorganismos buscados (microorganismos diana), y/o
- un medio que permite caracterizar dichos microorganismos, a saber, en particular, identificarlos y/o determinar sus propiedades de resistencia potencial a al menos un agente antimicrobiano (agente antibiótico en el caso de las bacterias), y/o
- 45 - un medio que permita efectuar el recuento de dichos microorganismos; consistiendo este recuento en contabilizar el número de colonias de microorganismos que han crecido en el medio de reacción según la invención, empleando técnicas de microbiología bien conocidas por los expertos en la técnica.

La invención también se refiere por tanto a un medio de caracterización (por ejemplo de identificación) y/o de recuento de microorganismos, basándose dicha caracterización y/o dicho recuento en poner de manifiesto una actividad enzimática microbiana seleccionada entre las actividades esterases y/u osidasas y/o peptidasas y/o

- 50

sulfatasas y/o fosfatasas de microorganismos, siendo preferentemente dicha actividad enzimática microbiana una actividad esterasa, comprendiendo dicho medio:

- al menos un sustrato cromógeno y/o fluorógeno específico de la actividad enzimática buscada, preferentemente específico de una actividad esterasa,

5 - al menos un alquil(tio)glucósido, preferentemente al menos un alquilglucósido, y

- al menos un disolvente (S).

Según una realización preferida, la actividad enzimática puesta de manifiesto (buscada) es una actividad esterasa de tipo hidrolasa de éster carboxílico ("carboxylic-ester hydrolase" en lengua inglesa) tal como una actividad carboxilesterasa, lipasa o fosfolipasa.

10 Los microorganismos detectados utilizando el medio de cultivo según la invención son preferentemente bacterias y/o levaduras, preferiblemente bacterias.

Según una realización especialmente preferida, el medio de reacción según la invención se utiliza para detectar microorganismos (tales como bacterias y/o levaduras) con actividad esterasa y, preferentemente, bacterias con actividad esterasa tales como las salmonelas (por ejemplo, para su caracterización y/o recuento). Como saben los expertos en la técnica, la actividad enzimática esterasa está muy extendida en el campo de la microbiología. En efecto, se sabe que muchas bacterias poseen una actividad esterasa y, por lo tanto, son capaces de escindir los sustratos sintéticos (cromógenos y/o fluorógenos) específicos de dicha actividad enzimática. Además de las salmonelas mencionadas anteriormente, se pueden citar también las bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Listeria*, etc...

20 La detección de los microorganismos anteriores consiste en detectar (visualizar) su presencia en/sobre un medio de cultivo, mediante una detección visual u óptica de coloración o coloraciones y/o fluorescencia(s) aparecido(s) en el medio líquido, o en las colonias formadas por estos microorganismos en un medio de agar-agar. En el caso de la detección óptica, esta última se puede realizarse mediante lectura óptica de todo o parte de dicho medio, con la ayuda de dispositivos tales como una cámara. La detección de la coloración o coloraciones y/o fluorescencia(s) por lectura óptica permite una automatización parcial o total del procedimiento de detección correspondiente.

25 Los sustratos enzimáticos fluorógenos pueden ser de diferente naturaleza. En primer lugar, los sustratos a base de umbeliferona o aminocumarina y sus derivados sustituidos en la posición 3, 4 o 6, permiten la liberación de un compuesto fluorescente de color que varía de azul a verde bajo una lámpara ultravioleta (UV). ($\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$).

30 A continuación, existen sustratos a base de resorufina (y sus derivados) que producen la liberación de un compuesto fluorescente rosa bajo luz natural ($\lambda_{ex} = 530 \text{ nm}$).

También se pueden citar los sustratos a base de fluoresceína (y sus derivados) que, después de la degradación, liberan un compuesto fluorescente amarillo a la luz natural ($\lambda_{ex} = 485 \text{ nm}$). Estos sustratos enzimáticos fluorógenos generalmente están poco adaptados a su utilización en medios de agar-agar, y se utilizan preferentemente en medio líquido.

35 Los sustratos enzimáticos cromógenos utilizables en el sentido de la presente invención pueden ser de diferente naturaleza.

En primer lugar, conviene mencionar los sustratos a base de indoxilo y sus derivados, que, en presencia de oxígeno, producen un precipitado que va del azul al rosa, así como derivados de ALDOL™ (BIOSYNTH AG) - mencionados en la solicitud internacional WO 2010/128120 - que producen un precipitado coloreado que varía del amarillo al rojo, incluso en ausencia de oxígeno. Estos sustratos a base de indoxilo y sus derivados son especialmente preferidos en el sentido de la presente invención debido a su aplicación relativamente fácil y a su buena sensibilidad de detección. Sus aplicaciones se refieren esencialmente a actividades enzimáticas de tipo osidasa, esterasa y fosfatasa. Muy adaptados para su utilización sobre soporte sólido o semisólido (filtro, agar-agar, gel de electroforesis, etc.), son menos adecuados a una utilización en un medio líquido (formación de un precipitado).

45 En segundo lugar, existen sustratos enzimáticos a base de hidroxiquinolona, dihidroxiflavona, dihidroxiantraquinona, catecol o de esculetina y sus derivados que en presencia de sales de hierro, producen un precipitado coloreado. Una vez más, sus aplicaciones se refieren esencialmente a actividades enzimáticas de tipo osidasa y esterasa.

En tercer lugar, se pueden mencionar los sustratos enzimáticos a base de nitrofenol y nitroanilina y sus derivados, que dan como resultado la formación de un compuesto de color amarillo. Permiten detectar actividades osidasas y esteratasas en el caso de sustratos a base de nitrofenol y actividades peptidasas en el caso de sustratos a base de nitroanilina. Sin embargo, en el caso de la detección de actividades peptidasas, la nitroanilina liberada es tóxica para las bacterias que se desea identificar o caracterizar, lo cual puede ser perjudicial para los análisis en curso o posteriores. Por otra parte, generalmente están poco adaptados para su utilización en un soporte sólido y mejor adaptados a una utilización en un medio líquido.

En cuarto lugar, hay sustratos enzimáticos a base de naftol y naftilamina y sus derivados. En este caso, la reacción enzima-sustrato se lleva a cabo en dos etapas, naftol o naftilamina liberado mediante la actividad enzimática sufre un "azo-acoplamiento" en presencia de una sal de diazonio que se añade en el momento de la revelación, lo que conduce a la formación de un compuesto insoluble coloreado. Permiten detectar las actividades osidasas y estererasas por el intermediario del naftol y las actividades de peptidasa por el intermediario de la naftilamina. La reacción de "azo-acoplamiento" se lleva a cabo en un medio a menudo químicamente agresivo, tóxico para las bacterias y que hace a la muestra inutilizable para su posterior análisis, además las naftilaminas son cancerígenas.

En el sentido de la presente invención, los microorganismos que han crecido sobre o en el medio de detección según la invención se detectan y/o recuentan - visualmente o por medio de un dispositivo óptico electrónico de tipo cámara o aparato fotográfico - por aparición de reacciones coloreadas y/o fluorescentes (según que se utilice un sustrato cromógeno o fluorógeno) o que presenta las dos características a la vez, produciéndose dichas reacciones coloreadas y/o fluorescentes por la actividad enzimática microbiana específica.

Con respecto más específicamente a los sustratos enzimáticos de estererasas, estos últimos comprenden, según una realización preferida, 2 a 16 átomos de carbono, definiendo la longitud de la cadena la aplicación prevista. Por lo tanto, para detectar un máximo de gérmenes "sustrato universal", es adecuada la utilización de sustratos C2 o C4. Para aplicaciones más específicas, como especialmente la detección de *Salmonella*, los sustratos en C7-C10 son particularmente adecuados. Entre los cromógenos capaces de estar unidos a una cadena de carbono C2-C12, se puede mencionar, por ejemplo, sustratos a base de indoxilo tales como 5-bromo-4-cloro-3-indoxilo, 5-bromo 6-cloro-3-indoxilo, 6-cloro-3-indoxilo, 5-bromo-3-indoxilo, 5-yodo-3-indoxilo, 6-bromo-3-indoxilo, 5,6-dibromo-3-indoxilo, los sustratos a base de dihidroxiantraquinona tal como alizarina; sustratos a base de ALDOL™ (desarrollados por la compañía Biosynth AG, Rietlisstrasse 4, 9422 Staad, Suiza, mencionados en particular en la solicitud de patente internacional WO 2010/128120); siendo los fluoróforos, por ejemplo, de la 4-metilumbeliferona y otros derivados de 7-hidroxycumarina.

Dichos sustratos enzimáticos de estererasas pueden ser, por ejemplo, sustratos de ésteres cromógenos derivados de indoxilo y, en particular, el caprilato de 5-bromo-4-cloro-3-indoxilo, caprilato de 5-bromo-6-cloro-3-indoxilo, nonanoato de 5-bromo-3-indoxilo, nonanoato de 6-cloro-3-indoxilo o decanoato de 5-bromo-3-indoxilo. A este respecto, conviene también mencionar los sustratos de estererasas cromógenos derivados de la antraquinona, tal como el octanoato de 2-alizarina.

En cualquier caso, estos sustratos sintéticos cromógenos y/o fluorógenos son bien conocidos por los expertos en la técnica, que sabrán seleccionar el o los sustrato(s) enzimático(s) a utilizar en función de la actividad o actividades enzimáticas(s) buscada(s).

Según una realización particularmente preferida de la presente invención, el alquil(tio)glucósido responde la fórmula general (I):



en la que :

- R representa un radical alifático, lineal o ramificado, saturado o insaturado, preferentemente lineal, preferiblemente lineal y saturado, que tiene de 2 a 12 átomos de carbono, preferentemente de 6 a 12 átomos de carbono, y preferiblemente de 8 a 12 de carbono,

- X es -O- o -S-, preferentemente -O-,

- G representa un resto glucídico,

- n es un número entero comprendido entre 1 y 10, preferiblemente comprendido entre 1 y 3, preferiblemente n es el número entero 1 o 2.

Dicha definición del o de los alquil(tio)glucósido(s) según la invención permite obtener el nivel deseado de sensibilidad de detección, es decir, permite obtener muy buenas intensidades de coloración y/o fluorescencia a partir de sustratos enzimáticos cromógenos y/o fluorógenos utilizados. Sin estar ligado por la teoría, es probable que este o estos alquil(tio)glucósido(s) - en especial los de fórmula general (I) - mejoran la detección de expresiones enzimáticas específicas, a saber, las actividades estererasas y/o osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas microbianas.

El medio de detección según la presente invención puede comprender un alquil(tio)glucósido o una variedad de alquil(tio)glucósidos (es decir, al menos dos alquil(tio)glucósidos), que responden, preferentemente, a la fórmula general (I) mencionada anteriormente. Cuando el medio de detección comprende al menos dos alquil(tio)glucósidos, estos últimos pueden ser idénticos o diferentes, todos los cuales responden preferentemente a la fórmula general (I).

Los alquil(tio)glucósidos preferidos, en el sentido de la presente invención son los alquilglucósidos siguientes: el n-octil-β-D-glucopiranosido y el n-dodecil-β-D-maltósido (siendo este último especialmente preferido).

El medio de detección de microorganismos según la presente invención se puede obtener mezclando al menos un sustrato cromógeno y/o fluorógeno específico de la actividad enzimática buscada (preferentemente específico de una actividad de esterasa) y al menos un alquil(tio)glucósido tal como se definió anteriormente en el disolvente (S).

5 De manera muy interesante y especialmente con respecto a los problemas mencionados en el preámbulo de la presente solicitud, el medio de detección de microorganismos según la invención está en forma lista para el empleo (líquido o gel de agar-agar) y estable al almacenamiento, lo que significa que la intensidad de la coloración y/o de la fluorescencia se mantiene estable durante al menos varias semanas, preferiblemente durante al menos tres semanas.

10 Preferentemente, la concentración del o de los alquil(tio)glucósido(s) en el medio está comprendida entre 0,5 g/l y 8 g/l, preferentemente entre 0,5 g/l y 6 g/l, en función del alquil(tio)glucósido o de los alquiltio)glucósido(s) utilizado(s).

El disolvente (S) es un auxiliar de disolución del sustrato enzimático cromógeno y/o fluorógeno de interés, en particular en lo que se refiere a un sustrato enzimático cromógeno. También completa la acción del o de los alquil(tio)glucósido(s) que actúa como agente(s) estabilizante(s)-emulsionante(s).

Según una realización preferente de la presente invención, el disolvente (S) se selecciona del grupo que comprende:

- 15
- alcoholes, preferentemente metanol, etanol, metoxietanol,
 - disolventes apróticos polares, preferentemente dimetilformamida (DMF), sulfóxido de dimetilo (DMSO),
 - disolventes acuosos, preferentemente agua o agua tamponada,
 - y sus mezclas;

preferentemente dicho disolvente (S) es sulfóxido de dimetilo (DMSO).

20 En la práctica, los disolventes utilizados preferentemente son el metanol o un disolvente aprótico polar, preferentemente DMF y DMSO (preferentemente DMSO). En especial, cuando se utilizan sustratos de esterasa, estos últimos se disuelven en un disolvente orgánico del tipo DMSO, al que se añaden el o los alquil(tio)glucósido(s) de interés.

25 Tratándose del sustrato cromógeno y/o fluorógeno, este último comprende una parte específica diana de la enzima a poner de manifiesto, preferiblemente una parte específica diana de una actividad esterasa, y un resto marcador cromóforo y/o fluoróforo, dicho resto marcador que emite luz y/o fluorescencia cuando ya no está asociado a dicha parte diana, es decir después de la escisión por dicha enzima.

30 Según una realización preferida, el sustrato enzimático es un sustrato cromógeno o fluorógeno, constituido por una parte diana de la enzima a detectar y una parte cromófora o fluorófora, seleccionándose la parte diana, preferentemente, del grupo que comprende especialmente:

- glucósidos, constituidos por unidades mono-, di- y/o polisacáridos, unidos en α o en β a la función hidroxilo de la parte fluorófora o cromófora;
- α -aminoácidos o péptidos;
- ácidos orgánicos, tales como $-O-CO(CH_2)_n-CH_3$, estando n comprendido entre 0 y 20;
- 35 - ácidos inorgánicos, tales como sulfato, fosfato, piro-sulfato, pirofosfato o fosfodiéster;
- quinonas/antraquinonas y derivados, especialmente dihidroxiantraquinona (alizarina);
- amino- o hidroxi-cumarinas y derivados;
- fluoresceínas y derivados;
- indoxilos o ALDOL™ y derivados;
- 40 - aminofenoles y derivados;
- nitrofenoles y derivados;
- amino- o hidroxi-fenilos y derivados;
- fenoxazinonas y derivados;
- catecoles y derivados;
- 45 - quinazolinonas y derivados (entre ellas ELF®97);

- dihidroxiflavona y derivados;
- 3-hidroxiflavona (3-HF) y derivados;
- esculetina y derivados.

5 Preferiblemente, el sustrato enzimático es un sustrato a base de indoxilo o uno de sus derivados. En este caso, la invención también se refiere a un medio de detección adaptado para su utilización en condiciones anaeróbicas y/o microaerófilas (concentración de oxígeno molecular en el medio de reacción inferiores a la concentración atmosférica), comprendiendo dicho medio un agente que favorece la polimerización oxidativa del derivado indoxilo, tal como un complejo de citrato de hierro amoniacal.

10 Como "agentes que favorecen la polimerización oxidativa del derivado de indoxilo" se puede citar también: permanganato, ferricianato/ferricianuro de potasio.

El agente que favorece la polimerización oxidativa del derivado de indoxilo (por ejemplo, un complejo metálico de tipo citrato de hierro de amoniacal) se utiliza preferentemente a una concentración comprendida entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 2 mg/ml (preferentemente del orden de 0,6 mg/ml).

15 La concentración a la que el sustrato enzimático debe utilizarse en el medio de reacción según la invención es fácilmente determinable por un experto en la materia en base a sus conocimientos generales y, dado el caso, a pruebas de rutina. Esta concentración debe ser suficiente para alcanzar el nivel de sensibilidad de detección requerido, pero no debe ser demasiado grande para no correr el riesgo de inhibir el crecimiento de microorganismos.

A modo de ejemplo, la concentración en sustrato cromógeno y/o fluorógeno está comprendida entre 1 mg/l y 10 g/l, preferentemente entre 5 mg/l y 6 g/l, preferentemente entre 25 mg/l y 2 g/l.

20 Preferentemente, el medio de reacción según la invención comprende un medio de cultivo adecuado y conocido por los expertos en la técnica, tal como un medio descrito en el "Handbook of culture media" (CRC Press), siendo seleccionado dicho medio de cultivo entre:

- 25 - los medios selectivos de tipo MacConkey, Hektoen, medios cromógenos selectivos destinados a detectar selectivamente las salmonelas de tipo chromID® Salmonella, Columbia ANC, PALCAM, Sabouraud gentamicina-cloranfenicol, preferentemente el medio MacConkey o un medio cromógeno selectivo destinado a detectar selectivamente las salmonelas tipo chromID® Salmonella,
- los medios no selectivos de tipo Columbia +/- sangre, Trypticase Soja (GTS), Agar-agar nutritivo, Sabouraud, preferentemente el medio Columbia.

30 En la práctica, la técnica experto en la técnica seleccionará el medio de cultivo en función de los microorganismos diana (y en especial en función de bacterias diana), según criterios perfectamente conocidos y al alcance de este experto en la técnica.

35 Sin que esto sea restrictivo de ninguna manera, resulta que el medio según la invención es particularmente adecuado para la detección (especialmente para la caracterización y/o recuento) de microorganismos de interés médico o industrial, y especialmente entre bacterias gram-negativas, más particularmente las del género *Salmonella* y *Pseudomonas*.

Como se indica a lo largo de la presente solicitud, unos de los objetivos principales es desarrollar un medio que permita detectar microorganismos (y en especial bacterias) que poseen una actividad esterasa (en especial para la caracterización y/o recuento), tales como bacterias de los géneros *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, etc.

40 En lo que se refiere a la detección de salmonelas, se seleccionará por ejemplo, como medio de cultivo, el medio de MacConkey, el medio Hektoen medio o el medio chromID® Salmonella.

Además, el medio según la invención puede contener otros aditivos opcionales tales como, por ejemplo: uno o varios otros sustrato(s) enzimático(s), por ejemplo de cromógeno(s) y/o fluoróforo(s), peptonas, uno o varios factor(es) de crecimiento, hidratos de carbono, uno o varios agente(s) selectivo(s), tampones, uno o varios gelificante(s), etc.

45 El medio de reacción según la presente invención está en una forma lista para su empleo, preferentemente en forma líquida o en forma de gel. Por forma lista para su empleo, se entiende una forma lista para ser sembrada en un tubo, frasco o en placas de Petri.

Una de las ventajas del medio de reacción según la invención es que se puede conservar durante varias semanas a 4°C en forma líquida o de gel.

50 Otro objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de un medio según la invención, método procedimiento que comprende las etapas siguientes:

a) preparar al menos una disolución madre de al menos un sustrato cromógeno y/o fluorógeno tal como se definió anteriormente y al menos un alquil(tio)glucósido en el disolvente (S),

b) añadir opcionalmente al menos un aditivo en dicho medio, y

c) homogeneizar el conjunto.

5 En cuanto a la etapa a) mencionada anteriormente, conviene señalar que dicho sustrato y dicho al menos un alquil(tio)glucósido pueden añadirse durante una misma etapa en el disolvente (S) o, como alternativa, se introduce en un primer momento, dicho sustrato en el disolvente (S) y luego se recoge al menos dicho alquil(tio)glucósido con la solución obtenida anteriormente (que comprende dicho sustrato disuelto por dicho disolvente (S)).

10 Preferentemente, la preparación de la solución madre se efectúa por separado incorporando sucesivamente el sustrato enzimático, el disolvente (S) y al menos un alquil(tio)glucósido tal como se definió anteriormente, opcionalmente coaditivado. Los productos y las cantidades utilizadas son tales como se definieron anteriormente. Después de la homogeneización, la solución madre se agrega al medio de cultivo gelificado en sobrefusión y regenerado previamente en agua. También puede tratarse de un medio líquido no gelificado, como un caldo nutritivo.

15 Después de la mezcla del medio de cultivo y la solución madre, se obtiene el medio de detección líquido o gelificado listo para sembrarse.

20 La presente invención tiene por objeto también la utilización de un medio según la invención para la detección (especialmente para la caracterización y/o recuento) de microorganismos con actividad esterasa y/u osidasa y/o peptidasa y/o sulfatasa y y/o fosfatasa, preferentemente para la detección de microorganismos con actividad esterasa tales como las bacterias del género *Salmonella*.

El medio de detección según la invención se puede utilizar para:

- detectar/determinar la presencia o ausencia de microorganismos, en particular de los microorganismos buscados (microorganismos objetivo), y/o
- 25 - caracterizar dichos microorganismos, es decir especialmente identificarlos y/o determinar sus propiedades de resistencia potencial a al menos un agente antimicrobiano (agente antibiótico en el caso de bacterias), y/o
- llevar a cabo el recuento de dichos microorganismos.

Otro objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento de detección de microorganismos con actividad esterasa y/u osidasa y/o peptidasa y/o sulfatasa y/o fosfatasa en una muestra, preferentemente de microorganismos con actividad de esterasa, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

- 30 i) sembrar el medio según la invención (como se ha definido anteriormente) con una muestra a analizar,
- ii) incubar el medio sembrado en condiciones apropiadas (por ejemplo a 37°C en condiciones aeróbicas),
- iii) detectar e interpretar las coloraciones y/o fluorescencias en las colonias formadas por los microorganismos, revelando dichas coloraciones y/o fluorescencias la reacción de al menos un sustrato cromógeno y/o fluorógeno con actividad de la enzima microbiana que le es específico, siendo preferentemente dicha actividad enzimática una actividad esterasa.

35 Dicho procedimiento puede aplicarse, por ejemplo, para detectar la presencia o ausencia de dichos microorganismos dentro de dicha muestra y/o para caracterizarlos (por ejemplo, para identificarlos) y/o contarlos.

40 Se describe asimismo la utilización de al menos un alquil(tio)glucósido para mejorar la detección de una actividad enzimática seleccionada entre las actividades esterases y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasa de microorganismos, preferentemente dicha actividad enzimática es una actividad esterasa.

La muestra a analizar puede ser de diversos orígenes, por ejemplo, de origen alimentario, ambiental, veterinario o clínico.

45 Entre las muestras de origen alimentario, puede mencionarse, de forma no exhaustiva, una muestra de productos lácteos (yogures, quesos...), carne, pescado, huevos, fruta, verdura, agua, bebidas (leche, zumo de frutas, refrescos, etc.). Por supuesto, estas muestras de origen alimentario también pueden provenir de salsas o platos más elaborados o materias primas no (o parcialmente) procesadas. Una muestra alimentaria puede finalmente proceder de un alimento destinado a animales, como tortas, harina de animales.

A modo de ejemplos de muestras de origen ambiental, conviene asimismo mencionar muestras de superficie, agua, aire, etc.

Las muestras biológicas de origen clínico pueden corresponder a muestras de fluidos biológicos (sangre completa, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, etc.), heces, muestras nasales, de garganta, de piel, de heridas, de órganos, de tejidos o de células aisladas. Esta lista obviamente no es exhaustiva.

5 En general, el término "muestra" se refiere a una parte o a una cantidad (más especialmente una pequeña parte o una pequeña cantidad) tomada de una o más entidades para su análisis. Esta muestra posiblemente puede haberse sometido a un tratamiento previo, que implica, por ejemplo, etapas de mezclado, dilución o incluso de molienda, en especial si la entidad de partida está en estado sólido.

10 La muestra biológica analizada es, en general, susceptible - o sospechosa - de contener al menos un microorganismo diana. En la mayoría de los casos, este último es un microorganismo patógeno (tal como *Salmonella*) que conviene detectarse con fines sanitarios.

El término "microorganismo" tiene el mismo significado que el generalmente aceptado en microbiología y comprende bacterias Gram positivas y Gram negativas, levaduras, mohos y más generalmente, organismos unicelulares, invisibles a simple vista, lo que pueden manipularse y multiplicarse en el laboratorio.

15 El o los alquil(tio)glucósido(s) utilizado(s) para los fines de la presente invención es/son como se ha(n) definido anteriormente. Se utiliza un alquil(tio)glucósido o una variedad de alquilo(tio)glucósidos (es decir, al menos dos alquil(tio)glucósidos), que corresponden, preferentemente, a la fórmula general (I) mencionada anteriormente. Cuando se usan al menos dos alquil(tio)glucósidos, estos últimos pueden ser idénticos o diferentes, correspondiendo todos preferentemente a la fórmula general (I).

Descripción detallada

20 Ejemplo 1: Medio de detección de salmonelas - mejora de la sensibilidad de detección

1.1 Preparación de los medios - disolución de sustratos enzimáticos

25 Se produce una solución madre del sustrato enzimático caprilato de 5-bromo-6-cloro-3-indoxilo (magenta-C8) en un disolvente tipo DMSO. Un volumen de esta solución madre que permite obtener una concentración final en sustrato de 360 mg/l se agrega a continuación en matraces que contienen respectivamente Tween 20 (concentración final de 6 g/l), n-octil-D-glucopiranosido (OG) en concentraciones finales de 0,7, 2 y 6 g/l, y n-dodecil-D-maltósido (DM) a las mismas concentraciones. Las diversas soluciones se agitan y los volúmenes se introducen en medios de agar-agar en superenfriamiento (medios ChromID® *Salmonella*). El protocolo se presenta en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Medio de referencia	T	1	2	3	4	5	6
Concentración final en sustrato en el medio (g/l)	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
Concentración final en Tween 20 en el medio (g/l)	6	0	0	0	0	0	0
Concentración final en OG en el medio (g/l)	0	0,7	2	6	0	0	0
Concentración final en DM en el medio (g/l)	0	0	0	0	0,7	2	6

30 La concentración final en Tween 20 de 6 g/l se eligió como óptima en este contexto de disolución/actividad microbiológica.

1.2 Preparación de los medios

35 Los microorganismos del género *Salmonella*, de la colección del Solicitante, se sembraron en cada uno de los medios mencionados anteriormente utilizando la técnica de 3 cuadrantes a partir de suspensiones bacterianas calibradas de 0,5 McF. Las cepas se seleccionaron por su débil expresión a media de la actividad esterasa, dando intensidades de color violeta, bajo a media en el medio de chromID® *Salmonella* comercializado por bioMérieux (con las referencias 43621 y 43629).

40 Las placas se incubaron 24 horas a 37°C. Después, las colonias formadas se examinaron visualmente después de 24 horas de incubación. Se anotaron las intensidades de coloración. Los resultados se muestran en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2

	T	1	2	3	4	5	6
<i>S. enteridis</i> 0107018	2	1,5	3	4	4	4	3
<i>S. agona</i> 0008024	2	1,5	3	4	4	4	3
<i>S. dublin</i> 0008035	0	1	2	2	1	1	0,1
<i>S. infantis</i> 0904097	2	1,5	3	4	4	4	3
<i>S. Tennessee</i> 0904084	1,5	1,5	3	4	4	4	3
<i>S. typhimurium</i> 0011049	2	1,5	3	4	4	4	3
<i>S. typhimurium</i> 0107036	2	1,5	2,5	4	4	4	3
<i>S. Tennessee</i> 0111019	2	2	3	4	4	3	2,5
<i>S. enteridis</i> 0107020	2	2	3	4	4	4	3
<i>S. infantis</i> 0008041	2	1,5	2,5	4	4	4	3
<i>S. panamá</i> 0008050	2	1,5	3	4	4	4	3
<i>S. enteridis</i> 0107017	1,5	1,5	2,5	3	4	4	3
<i>S. panamá</i> 9009020	2,5	1,5	3,5	4	4	4	2,5

Intensidades de coloración: escala de 0 a 4, respectivamente, ausencia de coloración a coloración muy intensa;

0 = sin coloración

0,1 = rastro de coloración

0,5 = coloración muy pálida

1 = coloración pura de baja intensidad

2 = coloración nítida de intensidad media

3 = coloración intensa

4 = coloración muy intensa

Nota: Las n,5 (p. ej. 1,5, 2,5, 3,5) corresponden a intensidades de coloración intermedias

1.3 Conclusión

5 Los medios 2 (OG 2 g/l), 3 (OG 6 g/l), 4 (DM 0,7 g/l), 5 (DM 2 g/l) y 6 (DM 6 g/l) permiten obtener intensidades de coloración más altas que el medio de referencia T (Tween 20,6 g/l) para todas las cepas. Los medios 1 (OG 0,7 g/l), 2 (OG 2 g/l), 3 (OG 6 g/l), 4 (DM 0,7 g/l) y 5 (DM 2 g/l) permiten detectar todas las salmonelas probadas, incluida *S. dublin*. Los medios que ofrecen los mejores rendimientos son los medios 2 (OG 2 g/l), 3 (OG 6 g/l), 4 (DM 0,7 g/l) y 5 (DM 2 g/l).

10 OG y DM permiten por lo tanto mejorar la sensibilidad de detección de la actividad esterasa en *Salmonella*, presumiblemente mediante una mejora de esta expresión enzimática. Además, estos alquil glucósidos también permiten detectar todas las cepas de salmonella analizadas, incluida *S. dublin*.

Ejemplo 2: Detección de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* a través de la expresión de una actividad esterasa en C9

2.1 Preparación de medios - disolución de sustratos enzimáticos

5 Dos soluciones madre a 25 g/l de ALDOL™ 470-nonanoato (ALDOL 470-C9, desarrollada por la sociedad Biosynth AG Rietlisstrasse 4, 9422 Staad, Suiza) y en ALDOL™ 495-nonanoato (ALDOL 495-C9, también desarrollado por la sociedad Biosynth AG, Rietlisstrasse 4, 9422 Staad, Suiza) se realizan en un disolvente orgánico tipo DMSO. A continuación, un volumen correspondiente a una concentración final en sustratos enzimáticos de 200 mg/l se añade a frascos que contienen, respectivamente: Tween 20 (concentración final en el medio de 6 g/l), y DM (concentraciones finales de 0,7, 2 y 6 g/l). Los diferentes matraces se agitan intensamente y luego se agrega todo el contenido en los medios de agar-agar en superenfriamiento: base GTS (agar-agar Trypticase Soja).

La composición de los diversos medios se presenta en la tabla 3 a continuación:

Tabla 3

Medio	1	2	3	4	5	6	7	8
ALDOL 470-C9 g/l	0,2	0,2	0,2	0,2	0	0	0	0
ALDOL 495-C9 g/l	0	0	0	0	0,2	0,2	0,2	0,2
Tween 20 g/l	6	0	0	0	6	0	0	0
DM g/l	0	0,7	2	6	0	0,7	2	6

10

2.2 Actividad biológica

15 Las bacterias resultantes de la colección del solicitante se sembraron en cada uno de los medios mencionados anteriormente usando la técnica de 3 cuadrantes a partir de suspensiones bacterianas calibradas de 0,5 McF. Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C y las colonias formadas se analizaron visualmente. De este modo, se anotaron coloraciones e intensidades de color. Los resultados se detallan en la tabla 4 a continuación.

Tabla 4

	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>P. aeruginosa</i> 0001001	0	1,5	1,5	2	0	0,5	1,5	1,5
<i>P. aeruginosa</i> 0002019	0,5	0,5	0,5	1,5	0	0	0	0,5
<i>P. aeruginosa</i> 0110078	0,5	1	1,5	1,5	0,5	1	1	1,5
<i>A. baumannii</i> 0509060	0	1,5	1,5	2	0	1	2	2
<i>A. baumannii</i> 0202018	0	0,5	0,5	0,5	0	0	0	0,5
<i>A. baumannii</i> 0409007	0,5	2	2	2	0	1,5	2	2,5
<i>A. baumannii</i> 9811074	0	1	1,5	1,5	0	1	2	2,5
<i>A. baumannii</i> 9809057	0	0,5	0,5	0,5	0	0,5	1	1

Intensidades de coloración: escala de 0 a 4, respectivamente, ausencia de coloración A coloración muy intensa;

0 = sin coloración

0,1 = rastro de coloración

0,5 = coloración muy pálida

1 = coloración pura de baja intensidad

2 = coloración nítida de intensidad media

3 = coloración intensa

4 = coloración muy intensa

Nota: Las n,5 (por ejemplo 1,5, 2,5, 3,5) corresponden a intensidades de coloración intermedias

2.3 Conclusión

5 *P. aeruginosa* y *A. baumannii* son bacterias que se sabe que son positivas a la esterasa. Los medios de referencia 1 y 5 no permiten informar acerca de esta característica. En efecto, las intensidades de coloración son bajas (0,5) o nulas para la mayoría de las cepas analizadas - con estos 2 sustratos enzimáticos a base de en ALDOL™ (y que contienen Tween 20 como tensioactivo).

El reemplazo de Tween 20 a 6 g/l por la DM a la misma concentración permite, inesperadamente mejorar la expresión de la actividad esterasa. En efecto, esta sustitución permite detectar todas las cepas probadas, con intensidades de coloración correctas, cualquiera que sea el sustrato enzimático probado. Se nota un impacto muy fuerte de DM en la expresión de la actividad esterasa cuando el sustrato es a base de ALDOL™.

10 La sustitución de Tween 20 por n-dodecil-β-D-maltósido (DM) mejora la detección de la actividad esterasa de los microorganismos, posiblemente debido a una mejor actividad biológica de los sustratos de esterasa, resultando una coloración más intensa de las colonias del microorganismo diana.

El alquilglucósido según la invención ofrece una sensibilidad de detección mejorada e incluso permite detectar determinadas cepas incoloras en presencia de Tween.

15 Además, siendo superiores las intensidades de coloración o fluorescencia (gracias a dichos alquilglucósidos), la concentración en sustrato enzimático puede así reducirse, lo que representa una ventaja de orden económico.

Ejemplo 3: Medio de detección de salmonelas mediante la utilización de un sustrato de esterasa (lipasa) con 16 átomos de carbono - mejora de la sensibilidad de detección

3.1 Preparación de medios - disolución del sustrato enzimático

20 Se lleva a cabo una solución madre del sustrato enzimático palmitato de 5-bromo-4-cloro-3-indoxilo (X-C16) en un disolvente tipo DMSO. Se agrega a continuación un volumen de esta solución madre que permite obtener una concentración final de sustrato de 100 mg/l en frascos que contienen respectivamente Tween 20 (concentraciones finales de 0,1%, 0,2% y 0,6% en volumen) de n-octil-β-D-glucopiranosido (OG) a concentraciones finales de 2 g/l, una mezcla OG (2 g/l) y Tween 20 (volumen 0,1%), y n-octil β -D-tioglucopiranosido (OTG) a la concentración final en el medio de 2 g/l. Las diversas soluciones se agitan y los volúmenes se introducen en medios de agar-agar en sobreenfriamiento (medios ChromID® *Salmonella*). Un resumen de la composición de los diversos medios se da en la tabla 5 a continuación.

Tabla 5

Medio de referencia	1	2	3	4	5
Concentración final en X-C16 en el medio (g/l)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Concentración final en Tween 20 en el medio (% vol.)	0,1	0,2	0	0,1	0
Concentración final en OG en el medio (g/l)	0	2	2	2	0
Concentración final en OTG en el medio (g/l)	0	0	0	0	2

30 3.2 Siembra de los medios

Los microorganismos del género *Salmonella*, de la colección del Solicitante se han sembrado en cada uno de los medios mencionados anteriormente utilizando la técnica de 3 cuadrantes a partir de suspensiones bacterianas calibradas de 0,5 McF. Las cepas se han seleccionado por su diferente nivel de expresión de la actividad esterasa. Una cepa correspondiente a la cepa de la colección ATCC 25922 de *E. coli* sirve de referencia negativa para la expresión de dicha actividad enzimática.

35 Los placas se incubaron 24 horas a 37°C. Las colonias formadas se examinaron luego visualmente después de 24 horas de incubación. Se anotaron las intensidades de coloración. Los resultados se muestran en la tabla 6 a continuación.

Tabla 6

	1	2	3	4	5
<i>S. infantis</i> 0904097	1	1,5	2,5	2,5	2,5
<i>S. enteritidis</i> 0107017	1	1	2,5	2,5	2
<i>S. typhimurium</i> 0011049	1	1	2,5	2	2
<i>S. panamá</i> 0008050	1,5	1,5	2,5	2	2
<i>S. panamá</i> 9009020	1	1,5	2,5	2	2,5
<i>S. typhimurium</i> 0107036	1,5	1,5	2,5	2,5	2
<i>S. enteritidis</i> 0107020	1	1	2,5	2	2
<i>S. enteritidis</i> 0107018	1	1,5	2,5	2	2
<i>S. Tennessee</i> 0904084	1	1,5	2,5	2	2
<i>S. infantis</i> 0008041	1,5	1,5	2,5	2,5	2,5
<i>S. dublin</i> 0008035	0	0	2	1,5	0,1
<i>S. agona</i> 0008024	1	1	2,5	2	2
<i>S. dublin</i> 0204046	0	0	2,5	1,5	0
<i>S. Tennessee</i> 0111019	1	1,5	2,5	2	2
<i>E. coli</i> 1105059	0	0	0	0	0

Intensidades de coloración: escala de 0 a 4, respectivamente, ausencia de coloración a coloración muy intensa;

0 = sin color

0,1 = rastro de color

0,5 = coloración muy pálida

1 = coloración pura de baja intensidad

2 = coloración nítida de intensidad media

3 = coloración intensa

4 = coloración muy intensa

Nota: las intensidades indicadas n,5 (por ejemplo, 1,5 y 2,5) representan intensidades intermedias.

3.3 Conclusión

5 Los medios 3, 4 y 5 permiten obtener intensidades de color mayores que en el medio de referencia (medio 1), que no comprendiendo ni OG ni OTG.

Se observa además que los medios que contienen OG, solo o mezclado con Tween 20 (en particular cuando OG se utiliza solo como en el medio 3), permiten obtener los mejores rendimientos: sensibilidad de detección de 100% en estos medios con intensidades de coloración elevadas para todas las cepas, incluida *S. dublin*.

10 La cepa de *E. coli*, esterasa negativa, no parece ser positiva, lo que indica que se conserva la especificidad de detección.

REIVINDICACIONES

5 1. Medio de detección de microorganismos, estando basada dicha detección en la identificación de una actividad enzimática microbiana seleccionada de actividades de esterases y/u osidasas y/o peptidasas y/o sulfatasas y/o fosfatasas de microorganismos, siendo preferentemente dicha actividad enzimática microbiana una actividad esterasa, comprendiendo dicho medio:

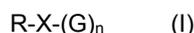
- al menos un sustrato cromógeno y/o fluorógeno específico de la actividad enzimática buscada, preferentemente específica de una actividad esterasa,

- al menos un compuesto de tipo alquilglucósido o alquiltiogluco(sido), en el que la parte alquilo es un radical alifático lineal, preferentemente saturado,

10 - al menos un disolvente (S);

en el que, cuando dicho medio comprende n-octil-β-D-glucopiranosido, dicho medio no comprende compuesto(s) incluidos en el grupo constituido por polifosfatos de sodio (HMP), cloruro de rubidio (RbCl) y cloruro de litio (LiCl).

15 2. El medio según la reivindicación 1, en el que al menos dicho compuesto de tipo alquilglucósido o alquiltiogluco(sido) corresponde a la fórmula general (I):



en la que:

20 - R representa un radical alifático, lineal, saturado o insaturado, preferentemente lineal y saturado, que comprende de 2 a 12 átomos de carbono, preferentemente de 6 a 12 átomos de carbono, y preferentemente de 8 a 12 átomos de carbono,

- X es -O- o -S-, preferentemente -O-,

- G representa un resto de carbohidrato,

- n es un número entero entre 1 y 10, preferentemente entre 1 y 3, preferentemente n es el número entero 1 o 2.

25 3. Medio según la reivindicación 1 o 2, en el que al menos dicho compuesto de tipo alquilglucósido o alquiltiogluco(sido) es un alquilglucósido seleccionado entre n-octil-β-D-glucopiranosido y n-dodecil-β-D-maltosido, preferentemente dicho alquilglucósido consiste en n-dodecil-β-D-maltósido.

30 4. Medio según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la concentración de al menos dicho compuesto del tipo alquilglucósido o alquiltiogluco(sido) en el medio está comprendida entre 0,5 g/l y 8 g/l, preferentemente entre 0,5 g/l y 6 g/l.

5. Medio según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el disolvente (S) se selecciona del grupo que comprende:

- alcoholes, preferentemente metanol, etanol, metoxietanol,

- disolventes apróticos polares, preferentemente dimetilformamida (DMF), sulfóxido de dimetilo (DMSO),

35 - disolventes acuosos, preferentemente agua o agua tamponada,

- y sus mezclas;

preferentemente dicho disolvente (S) es sulfóxido de dimetilo (DMSO).

40 6. Medio según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el sustrato cromógeno y/o fluorógeno comprende una parte diana específica de la enzima a identificar, preferentemente una parte diana específica de una actividad esterasa, y un resto marcador cromóforo y/o fluoróforo, emitiendo dicho resto marcador una luz y/o una fluorescencia cuando ya no está asociado a dicha parte diana, es decir después de la escisión por dicha enzima.

7. Medio según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el sustrato enzimático es un sustrato a base de indoxilo o de uno de sus derivados.

45 8. Medio según la reivindicación 7, adaptado para su uso en condiciones anaeróbicas y/o microaerófilas, comprendiendo dicho medio un agente que favorece la polimerización oxidativa del derivado indoxilo, tal como un complejo de citrato de hierro amoniacal.

ES 2 666 132 T3

9. Medio según una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la concentración de sustrato cromógeno y/o fluorógeno está comprendida entre 1 mg/l y 10 g/l, preferentemente entre 5 mg/l y 6 g/l, preferentemente entre 25 mg/l y 2 g/l.

10. Medio según una de las reivindicaciones 1 a 9, comprendiendo dicho medio un medio de cultivo adecuado, seleccionándose dicho medio de cultivo entre:

5 - medios selectivos de MacConkey, Hektoen, medios cromógenos selectivos destinados a detectar selectivamente salmonellas de tipo chromID® Salmonella, Columbia ANC, PALCAM, Sabouraud gentamicina-cloranfenicol, preferentemente el medio MacConkey o un medio cromógeno selectivo destinado a detectar selectivamente salmonellas de tipo chromID® Salmonella,

10 - medios no selectivos de Columbia +/- sangre, Trypticase Soja (GTS), agar-agar nutritivo, Sabouraud, preferentemente el medio Columbia.

11. Procedimiento de obtención de un medio según una de las reivindicaciones 1 a 10, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

15 a) preparar al menos una solución madre de al menos un sustrato cromógeno y/o fluorógeno tal como se define en una de las reivindicaciones 1 a 10 y al menos dicho compuesto de tipo alquilglucósido o alquiltiogluósido en el disolvente (S),

b) añadir opcionalmente al menos un aditivo en dicho medio, y

c) homogeneizar el conjunto.

20 12. Utilización de un medio según una de las reivindicaciones 1 a 10 para la detección de microorganismos con actividad esterasa y/u osidasa y/o peptidasa y/o sulfatasa y/o fosfatasa, preferentemente para la detección de microorganismos con actividad esterasa, tales como bacterias o levaduras con actividad esterasa.

13. Utilización según la reivindicación 12, siendo dichos microorganismos bacterias Gram-negativas, preferentemente bacterias del género *Salmonella*.

25 14. Procedimiento de detección de microorganismos con actividad esterasa y/u osidasa y/o peptidasa y/o sulfatasa y/o fosfatasa en una muestra, preferentemente de microorganismos con actividad esterasa, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:

i) sembrar el medio según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 con una muestra a analizar,

ii) incubar el medio sembrado en condiciones apropiadas,

30 iii) detectar e interpretar las coloraciones y/o fluorescencias en las colonias formadas por los microorganismos, revelando dichas coloraciones y/o fluorescencias la reacción de al menos un sustrato cromógeno y/o fluorógeno con actividad enzimática microbiana que le es específica, siendo preferentemente dicha actividad enzimática una actividad esterasa.