(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 773 073**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12Q 1/10 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.02.2008** **PCT/FR2008/050183**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2008** **WO08104679**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2008** **E 08762041 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019** **EP 2111460**

(54) Título: **Medio de detección y/o de identificación de bacterias**

(30) Prioridad:

08.02.2007 FR 0753149

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.07.2020

(73) Titular/es:

BIOMERIEUX (100.0%)
Chemin de l'Orme
69280 Marcy-L'Etoile, FR

(72) Inventor/es:

CASSE, MARINE;
ORENGA, SYLVAIN y
ROGER-DALBERT, CÉLINE

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 773 073 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 y/o de identificación de bacterias

El campo de la invención es el del análisis microbiológico por vía bioquímica, y en particular de la detección y de la identificación de bacterias.

Las bacterias patógenas, y especialmente los bacilos Gram negativos, tales como las enterobacterias, las *Vibrionaceae*, las *Pseudomonas*, son responsables cada año de numerosas enfermedades, epidemias, etc.

Las *Pseudomonas* son unas bacterias ubicuas que se encuentran en los suelos, en los vegetales y sobre todo en las aguas dulces y marinas. A baja temperatura pueden desarrollarse numerosas cepas, contaminando así los alimentos conservados en el refrigerador y son la causa de infecciones digestivas. Son también la causa de infecciones nosocomiales.

Las especies de enterobacterias más comúnmente aisladas en bacteriología clínica pertenecen a los géneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus, Providencia, Salmonella, Serratia*, *Shigella, Yersinia.*

La especie *E. coli* es la especie aerobia más representada en el tubo digestivo. Sin embargo, su presencia en el agua es un control de contaminación fecal, y algunas cepas son patógenas y responsables de supuraciones peritoneales, biliares, apendiculares o genitales.

Las bacterias del género *Salmonella* son unos parásitos intestinales de los animales vertebrados y de los pájaros y se transmiten al hombre a través de alimentos contaminados. Son entonces responsables de enfermedades gastro-enteritis y fiebres tifoidea y paratifoideas.

Finalmente, las *Citrobacter*, tal como *Citrobacter freundii*, son unos comensales del tubo digestivo humano y de los animales que se pueden aislar de las orinas, de las secreciones respiratorias, incluso de la sangre, y que son responsables de infecciones en los sujetos inmunodeprimidos.

Una detección precoz y específica de estas bacterias Gram negativas permite proponer una solución adecuada, en términos de tratamiento, de descontaminación, etc.

Existen actualmente numerosos medios que permiten la detección de bacterias Gram negativas. Esta detección puede basarse especialmente en la utilización de sustratos particulares, específicos de una actividad metabólica, tal como una actividad enzimática, de la bacteria que se desea detectar: mediante la elección de los sustratos, dependiendo de si hay reacción o no, es posible caracterizar la naturaleza de un microorganismo.

Se puede citar en particular el medio UriSelect 4 (Bio-Rad), que utiliza un sustrato de β-galactosidasa asociado a un sustrato de β-glucosidasa y a la detección de la triptofanasa para la detección de las cepas de la especie *E. coli* y la separación de las cepas de *Citrobacter* β-galactosidasa positivas/β-glucosidasa negativas.

Se puede citar también el medio UT1 (Oxoid) que utiliza un sustrato de β-galactosidasa asociado a un sustrato de β-glucosidasa y a la detección de la triptofanasa para la detección de las cepas de la especie *E. coli* y la separación de las cepas *Citrobacter* β-galactosidasa positivas/β-glucosidasa negativas.

El medio CPS ID 3 (bioMérieux) utiliza un sustrato de β-glucuronidasa asociado a un sustrato de β-glucosidasa y eventualmente a la detección de la triptofanasa para la detección de las cepas de la especie *Escherichia coli*. Ciragel *et al.*, 2006 evalúa los rendimientos de este medio cromogénico para el aislamiento y la identificación de los patógenos del tracto urinario European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2006 (25): 108-111).

El medio BBL CHROMagar Orientation (Becton-Dickinson) utiliza un sustrato de β-galactosidasa asociado a un sustrato de β-glucosidasa y a la detección de la triptofanasa para la detección de las cepas de la especie *E. coli* y la separación de las cepas de *Citrobacter* β-galactosidasa positivas/β-glucosidasa negativas.

Finalmente, el medio Urine Specific Agar (AES Laboratoire) utiliza un sustrato de β-glucuronidasa asociado a la detección de la triptofanasa para la detección de las cepas de la especie *E. coli* y su diferenciación de las cepas de *Citrobacter*.

Sin embargo, los medios cromogénicos que utilizan un sustrato de β-glucuronidasa para la detección de *E. coli* presentan una excelente especificidad, pero una sensibilidad imperfecta debido a la existencia de una baja proporción de cepas de *E. coli* (5-10%) que no expresa esta actividad. Además, algunas cepas de *Citrobacter* pueden también producir unas colonias β-glucuronidasa positivas, del mismo color que las de *E. coli*.

Para los medios cromogénicos que utilizan un sustrato de β-galactosidasa para la detección de *E. coli*, es necesario confirmar la identificación efectuando un ensayo suplementario para diferenciar *E. coli* de las otras enterobacterias que expresan una actividad β-galactosidasa, y que no expresan, o que expresan débilmente, una actividad β-glucosidasa, especialmente algunas cepas de *Citrobacter.*

En lo que se refiere a la detección de las salmonelas, se puede citar el medio SM ID que utiliza un glucuronato y un sustrato de β-galactosidasa. Sin embargo, es necesaria una confirmación bioquímica y/o serológica para la detección de las cepas del género *Salmonella* y su diferenciación de las cepas de otras enterobacterias, especialmente las del género *Citrobacter*.

Finalmente, se puede citar, en lo que se refiere a las *Pseudomonas*, el medio cetrimida que utiliza cetrimida, y la detección de la piocianina para detectar las cepas de la especie *Pseudomonas aeruginosa* y diferenciarlas de las otras bacterias Gram negativas. Una mejora de la especificidad de este medio sería, no obstante, una ventaja.

La invención se propone resolver los problemas del estado de la técnica presentando un nuevo medio particularmente adecuado para identificar las bacterias *Citrobacter* entre otras enterobacterias, de manera rápida, poco costosa y fácil de realizar.

De manera sorprendente, los inventores han mostrado que un medio que comprende una combinación particular de sustratos de actividad metabólica, y de inductores permitía una detección rápida y fácil de bacterias Gram negativas. Más precisamente, los inventores han mostrado en particular que la inducción de la β-glucosidasa por un hidrato de carbono, especialmente la celobiosa, permite reducir el número de cepas de *Citrobacter* que produce unas colonias del mismo color que las *E. coli*, permitiendo así una excelente separación de estas dos especies.

Antes de entrar más en detalle en la exposición de la invención, se dan las definiciones siguientes a fin de facilitar la comprensión de la invención.

Por medio de detección, se entiende un medio que comprende todos los elementos necesarios para la supervivencia y/o el crecimiento de microorganismos. Este medio de detección puede o bien servir únicamente de medio de detección, o bien de medio de cultivo y de detección. En el primer caso, el cultivo de los microorganismos se efectúa antes de la siembra y, en el segundo caso, el medio de detección constituye también el medio de cultivo. El medio de cultivo según la invención puede contener otros eventuales aditivos, como por ejemplo: peptonas o extractos de tejidos, uno o varios factores de crecimiento, hidratos de carbono, uno o varios agentes selectivos, tampones, uno o varios gelificantes. Este medio de cultivo puede presentarse en forma de líquido, de gel listo para el uso, es decir listo para la siembra en tubo, frasco, o sobre caja de Petri.

En el sentido de la presente invención, la detección se puede realizar en medio líquido, tira u otro soporte sólido.

Por grupo de bacterias Gram negativas, se entiende un grupo de bacterias que, durante la coloración mediante el método Gram, eliminan el cristal violeta y aparecen rosa.

Tal grupo de bacterias Gram negativas puede comprender especialmente, o estar constituido especialmente, de enterobacterias, de salmonelas (*Salmonella*), de *Pseudomonas aeruginasa*. Como bacterias Gram negativas, se puede citar especialmente la familia de las enterobacterias (*Enterobacteriaceae*), la familia de las *Vibrionaceae*, tal como la especie *Vibrio cholerae*, o también las *Pseudomonas*, en particular *Pseudominas aeruginasa*.

Por enterobacterias, se pueden citar en particular los géneros siguientes *Alishewanella*; *Alterococcus; Aquimonas; Aranicola; Arsenophonus; Azotivirga; Blochmannia (candidatus); Brenneria; Buchnera; Budvicia; Buttiauxella; Calymmatobacterium; Cedecea; Citrobacter; Dickeya; Edwardsiella; Enterobacter; Erwinia,* par exemple *Erwinia amylovora; Escherichia,* par exemple *Escherichia coli; Ewingella; Grimontella; Hafnia; Klebsiella,* par exemple *Klebsiella pneumoniae; Kluyvera; Leclercia; Leminorella; Levinea; Moellerella; Morganella; Obesumbacterium; Pantoea; Pectobacterium; Phlomobacter (candidatus); Photorhabdus; Plesiomonas,* par exemple *Plesiomonas shigelloides; Pragia; Proteus,* par exemple *Proteus vulgaris; Providencia; Rahnella; Raoultella; Saccharobacter; Salmonella; Samsonia; Serratia*, par exemple *Serratia marcescens; Shigella; Sodalis; Tatumella; Thorsellia, Trabulsiella; Wigglesworthia; Xenorhabdus; Yersinia,* par exemple *Yersinia pestis*; *Yokenella*.

Por grupo que comprende *Citrobacter*, se entiende un grupo que comprende unas bacterias que pertenecen al género *Citrobacter*. Este grupo puede comprender también otras especies. Así, un grupo que comprende *Citrobacter* preferido es un grupo que comprende, o que está constituido de, bacterias *Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella,* y *Serratia* (también denominado grupo KESC).

Por sustrato, se entiende cualquier molécula susceptible de generar directa o indirectamente una señal detectable debida a una actividad enzimática o metabólica del microorganismo.

El sustrato puede ser, en particular, un sustrato metabólico, tal como una fuente de carbono o de nitrógeno, acoplada a un indicador que produce una coloración en presencia de uno de los productos del metabolismo.

El sustrato puede ser también un sustrato enzimático, es decir un sustrato que puede hidrolizarse por una enzima en un producto que permite la detección, directa o indirecta de un microorganismo. Este sustrato puede comprender, especialmente, una primera parte específica de la actividad enzimática a revelar y una segunda parte que actúa como marcador, a continuación, parte de marcador. Esta parte de marcador puede ser cromogénica, fluorogénica, luminiscente, etc. Como sustrato cromogénico, bien adaptado a los soportes sólidos (filtro, gelosa, gel de electroforesis), se pueden citar especialmente los sustratos a base de indoxilo y sus derivados, y los sustratos a base de hidroxiquinolina o de esculetina y sus derivados, que permiten la detección de actividades osidasa y esterasa. Se pueden citar también los sustratos a base de nitrofenol y nitroanilina y derivados, que permiten detectar las actividades osidasas y esterasas en el caso de sustratos a base de nitrofenol, y unas actividades peptidasas en el caso de sustratos a base de la nitroanilina. Se puede citar finalmente los sustratos a base de naftol y naftilamina y sus derivados, que permiten detectar las actividades osidasas y esterasas por medio del naftol, y las actividades peptidasas por medio de la naftilamina. Este sustrato puede permitir, especialmente, pero de manera no limitativa, la detección de una actividad enzimática tal como la actividad de una osidasa, peptidasa, esterasa, etc. El sustrato enzimático puede también ser un sustrato natural cuyo producto de hidrólisis se detecta directa o indirectamente. Como sustrato natural, se puede citar especialmente el triptófano para detectar una actividad triptofanasa o desaminasa, un aminoácido cíclico (triptófano, prenilalanina, histidina, tirosina) para detectar una actividad desaminasa, el fosfatidil inositol para detectar una actividad fosfolipasa, etc.

Según la presente invención, el sustrato se selecciona preferiblemente entre los sustratos a base de indoxilo (3-Indoxilo, 5-Bromo-3-indoxilo, 4-Cloro-3-indoxilo, 5-yodo-3-indoxilo, 5-Bromo-4-cloro-3-indoxilo, 5-Bromo-6-cloro-3-indoxilo, 6-Bromo-3-indoxilo, 6-Cloro-3-indoxilo, 6-Fluoro-3-indoxilo, 5-Bromo-4-cloro-N-metil-3-indoxilo, N-Metil-3-indoxilo, etc.); de umbeliferona (4-Metilumbeliferona, Ciclohexenoesculetina, etc.); de Alizarina; de p-Naftolbenceína; de Nitrofenol (orto-Nitrofenol, para-Nitrofenol, etc.); de Naftol (alfa-Naftol, 2-Naftol, Naftol-ASBI, etc.); de Aminofenol (para-Aminofenol, Dicloro-aminofenol, etc.); de Hidroxiquinolina; de Catecol (Catecol, Dihidroxiflavona, Hidroxiflavona, etc.); de Resorufina; de Clorofenol Red; de Fluoresceína; de Aminocoumarino (7-Amino-4-metil-coumarino, etc.); de Naftilamida; de Acridina (Amino-fenil-acridina); de Amino-fenoxazina (Amino-benzofenoxazinona, Amino-pentil-resorufina, etc.).

Por actividad metabólica, se entiende un conjunto de reacciones químicas que se producen en una bacteria. Estas reacciones químicas pueden estar relacionadas con una o varias actividades enzimáticas, con la degradación, la síntesis, la modificación de una molécula.

Por actividad metabólica específica de un grupo de bacterias Gram negativas, se entiende una actividad metabólica producida preferiblemente por este grupo de bacterias Gram negativas.

Se puede citar especialmente para un grupo que comprende, o que está constituido de, *E. coli*, la beta-glucuronidasa, beta-galactosidasa, alfa-galactosidasa, acidificación de la lactosa, de triptofanasa, beta-ribosidasa, fosfatasa, L-Alanina-aminopeptidasa, L-Leucina-aminopeptidasa. Preferiblemente, la actividad metabólica es la beta-glucuronidasa o beta-galactosidasa.

Los sustratos utilizados para la detección de una actividad beta-glucuronidasa pueden ser en particular el 4-Metilumbeliferil-beta-glucurónido, el 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-beta-glucurónido, el 5-Bromo-6-cloro-3-indolil-beta-glucurónido, el 6-Cloro-3-indolil-beta-glucurónido, el Alizarin-beta-glucurónido, el Ciclohexenoesculetin-beta-glucurónido o sus sales a concentraciones comprendidas preferiblemente entre 10 y 1000 mg/l.

Los sustratos utilizados para la detección de una actividad beta-galactosidasa pueden ser en particular el 4-Metilumbelliféril-beta-galactosido, el 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-beta-galactosido, el 5-Bromo-6-cloro-3-indolil-beta-galactosido, el 6-Cloro-3-indolil-beta-galactosido, el Alizarin-beta-galactosido, el Ciclohexenoesculetin-beta-galactosido o sus sales a concentraciones comprendidas preferiblemente entre 10 y 1000 mg/l.

Se puede citar también para un grupo que comprende, o que está constituido de, *Salmonella,* la alfa galactosidasa, esterasa, acidificación del glucuronato, sorbitol, propanediol, melibiosa, manitol. Como sustrato de alfa-galactosidasa, se puede citar el 4-Metilumbeliferil-alfa-galactosido, el 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-alfa-galactosido, el 5-Bromo-6-cloro-3-indolil-alfa-galactosido, el 6-Cloro-3-indolil-alfa-galactosido, el Alizarin-alfa-galactosido, el Nitrofenil-alfa-galactosido a concentraciones comprendidas entre 10 y 1000 mg/l/.

Entre los sustratos de esterasa, se puede citar el 4-Metilumbeliferil-octanoato, el 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-octonoato, 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-nonaoato, el 5-Bromo-6-cloro-3-indoxil-octanoato, 5-Bromo-6-cloro-3-indoxil-hexanoato, el 6-Cloro-3-indoxil-octanoato, el Alizarin-octanoato, a concentraciones comprendidas entre 20 y 1000 mg/l/.

Se puede citar también para un grupo que comprende, o que está constituido de, *Pseudomonas aeruginosa,* la esterasa, la aminopeptidasa, la oxidasa.

Entre los sustratos de esterasa, se puede citar el 4-Metilumbeliferil-octanoato, el 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-octonaoato, 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-nonaoato, el 5-Bromo-6-cloro-3-indoxil-octanoato, 5-Bromo-6-cloro-3-indoxil-hexanoato, el 6-Cloro-3-indoxil-octanoato, el Alizarin-octanoato, a concentraciones comprendidas entre 20 y 1000 mg/l/.

Entre los sustratos de aminopeptidasa, se puede citar especialmente el beta-Alanil-amidofenol, el beta-Alanil-dicloro-amidofenol, beta-Alanil-para-nitroanilido, beta-Alanil-beta-naftilamida, la 7-N-(beta-Alanil)aminofenoxazin-1-pentil-3-ona, la 7-N-(L-Piroglutamil)aminofenoxazin-1-pentil-3-ona a concentraciones comprendidas entre 10 y 1000 mg/l.

Por inductor, se entiende un compuesto que induce a un aumento de la expresión de la actividad metabólica diana, siendo, por otro lado, cualquier condición experimental igual, la actividad metabólica es más fuerte cuando el inductor está a una concentración apropiada que cuando está ausente o a una concentración inadecuada.

Se puede citar especialmente:

- para la beta glucosidasa o la celobiosidasa, un hidrato de carbono constituido de un hidrato de carbono unido en la posición β a la glucosa o hidrato de carbono con una subunidad β-glucósido, en particular la celobiosa, la celulosa, el almidón, la celotriosa, la trehalosa.

Se puede citar también el Metil-β-glucósido, el Isopropil-β-tio-glucósido, el Indoxil-β-glucósido o el Metil-β-tio-glucósido.

- para la beta-glucuronidasa, el glucuronato, el Metil-beta-glucurónido u otros beta-glucurónidos.

- Para la beta-galactosidasa, la lactosa, el Isopropil-beta-tio-galactosido u otros beta-galactosido.

Sin ser limitativa, una concentración comprendida entre 100 ng/l y 10 g/l, preferiblemente comprendida entre 10 mg/l y 3 g/l es particularmente adecuada para la presente invención.

Por muestra biológica, se entiende una muestra clínica, procedente de una extracción de líquido biológico, o una muestra alimenticia, procedente de cualquier tipo de alimento o una muestra del entorno tal como una extracción de superficie, de agua, de aire, etc. Esta muestra puede así ser líquida o sólida y se puede citar, de manera no limitativa, una muestra clínica de sangre, de plasma, de orinas, de heces, de extracciones de la nariz, de gargantas, de pieles, de heridas, de líquido cefalorraquídeo, una muestra alimenticia de agua, de bebidas tales como la leche, un zumo de fruta; de yogur, de carne, de huevos, de verduras, de mahonesa, de queso, de pescado, etc., una muestra alimenticia procedente de una alimentación destinada a los animales, tal como especialmente una muestra procedente de harinas animales.

La invención se refiere a un medio de detección y de discriminación de bacterias *Citrobacter* entre otras enterobacterias, que comprende

◦ un sustrato de una actividad metabólica específica de un grupo de enterobacterias

◦ un sustrato de beta glucosidasa o de celobiosidasa

◦ un inductor de la beta glucosidasa o celobiosidasa, siendo dicho inductor un hidrato de carbono constituido de un hidrato de carbono unido en la posición β a la glucosa o hidrato de carbono con una subunidad β-glucósido, en este caso la celobiosa.

Los sustratos utilizados para la detección de una actividad beta-glucosidasa pueden ser especialmente el 4-Metilumbeliferil-beta-Glucósido, el 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-beta-Glucósido, el 5-Bromo-6-cloro-3-indolil-beta-Glucósido, el 6-Cloro-3-indolil-beta-Glucósido, el Alizarin-beta-Glucósido, el Ciclohexenoesculetin-beta-Glucósido, el Nitrofenil-beta-glucósido, el Dicloroaminofenil-glucósido o sus sales a concentraciones comprendidas preferiblemente entre 10 y 1000 mg/l.

A título de sustratos de celobiosidasa, se puede citar especialmente la 4-Metilumbeliferil-beta-celobiosida, la 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-beta-celobiosida, la 5-Bromo-6-cloro-3-indolil-beta-celobiosida, la 6-Cloro-3-indolil-beta-celobiosida, la Nitrofenil-beta-celobiosida.

Según un modo preferido de realización de la invención, dicho inductor de la beta glucosidasa o celobiosidasa está a una concentración de entre 10 mg/l y 3 g/l.

Según un modo preferido, las enterobacterias son unas *E. coli.* Así, dicho grupo de enterobacterias puede comprender o estar constituido de *E. coli.* En este modo de realización, dicho sustrato de la actividad metabólica es específico de *E. coli* y se selecciona preferiblemente entre un sustrato de beta-glucuronidasa, beta-galactosidasa, alfa-galactosidasa, de acidificación de lactosa, de triptofanasa, beta-ribosidasa. fosfatasa, L-Alanina-aminopeptidasa, L-Leucina-aminopeptidasa. Preferiblemente dicho sustrato es un sustrato de beta-glucuronidasa o beta-galactosidasa.

Según otro modo preferido, las enterobacterias son unas *Salmonella.* Así, dicho grupo de enterobacterias puede comprender, o estar constituido de, *Salmonella.* En este modo de realización, dicho sustrato de la actividad metabólica es específico de *Salmonella* y se selecciona preferiblemente entre un sustrato de alfa galactosidasa, esterasa, acidificación del glucuronato, sorbitol, propanediol, melibiosa, manitol.

Según otro modo preferido de realización de la invención, dicho grupo de bacterias Gram negativas comprende, o está constituido de, *Pseudomonas aeruginosa.* Preferiblemente, dicho sustrato de la actividad metabólica es específico de *Pseudomonas aeruginosa* y se selecciona entre un sustrato de esterasa, aminopeptidasa, oxidasa.

Según un modo preferido de realización de la invención, el medio de detección comprende además un inductor de dicha actividad metabólica específica del grupo de bacterias Gram negativas, comprendiendo dicho grupo de bacterias Gram negativas preferiblemente unas enterobacterias.

Según un modo particular de realización de la invención, el inductor para la beta-glucuronidasa se selecciona preferiblemente entre el glucuronato, el Metil-beta-glucurónido u otros beta-glucurónidos.

Según otro modo particular de realización de la invención, el inductor para la beta-galactosidasa se selecciona preferiblemente entre la lactosa, el Isopropil-beta-tio-galactosido u otros beta-galactosido.

Según un modo preferido de realización de la invención, el medio de detección comprende, además, un segundo inductor de la β-glucosidasa o de la celobiosidasa, tal como el Metil-β-glucósido, el Isopropil-β-tio-glucósido, el Indoxil-β-glucósido o el Metil-β-tio-glucósido. Preferiblemente, dicho inductor es el Metil-beta-glucósido.

Preferiblemente, dicho segundo inductor está a una concentración comprendida entre 100 ng/l y 10 g/l, preferiblemente entre 10 mg/l y 3 g/l, y aún más preferiblemente entre 50 y 200 mg/l.

La invención se refiere también a la utilización de un medio tal como se ha definido anteriormente para discriminar un grupo de bacterias que comprende *Citrobacter* de otro grupo de bacterias Gram negativas. Según un modo preferido de realización de la invención, el medio se utiliza para discriminar un grupo que comprende, o que está constituido de, *Citrobacter* de un grupo que comprende, o que está constituido de, *E. coli.*

Según otro modo de realización de la invención, el medio se utiliza para discriminar un grupo que comprende, o que está constituido de, *Citrobacter* de un grupo que comprende, o que está constituido de, *Salmonella.*

Según otro modo de realización de la invención, el medio se utiliza para discriminar un grupo que comprende, o que está constituido de, *Citrobacter* de un grupo que comprende, o que está constituido de, *P. aeruginosa.*

La invención se refiere también a un medio de cultivo que comprende

◦ un sustrato de una actividad metabólica específica de un grupo de enterobacterias

◦ un sustrato de beta glucosidasa

◦ un inductor de la beta glucosidasa o celobiosidasa, siendo dicho inductor un hidrato de carbono constituido de un hidrato de carbono unido en la posición β a la glucosa o hidrato de carbono con una subunidad β-glucósido, en este caso la celobiosa.

Este medio es particularmente adecuado para discriminar un grupo que comprende, o que está constituido de, bacterias *Citrobacter* y de otro grupo de bacterias Gram negativas. Como tal, la invención se refiere también a la utilización de un medio tal como se ha definido anteriormente para discriminar un grupo de bacterias que comprende *Citrobacter* de otro grupo de enterobacterias.

Preferiblemente, la invención se refiere a la utilización de un medio tal como se ha definido anteriormente para discriminar

- un grupo que comprende, o que está constituido de, *Citrobacter* de un grupo que comprende, o que está constituido de, *E. coli.*

- un grupo que comprende, o que está constituido de, *Citrobacter* de un grupo que comprende, o que está constituido de, *Salmonella.*

- un grupo que comprende, o que está constituido de, *Citrobacter* de un grupo que comprende, o que está constituido de, *P. aeruginosa.*

La invención se refiere también a la utilización de un medio que comprende

◦ un sustrato de una actividad metabólica específica de un grupo de enterobacterias

◦ un sustrato de beta glucosidasa

◦ un inductor de la beta glucosidasa o celobiosidasa, siendo dicho inductor un hidrato de carbono constituido de un hidrato de carbono unido en la posición β a la glucosa o hidrato de carbono con una subunidad β-glucósido, en este caso la celobiosa, para discriminar un grupo de bacterias que comprende *Citrobacter* de otro grupo de enterobacterias, preferiblemente para discriminar

- un grupo que comprende, o que está constituido de, *Citrobacter* de un grupo que comprende, o que está constituido de, *E. coli.*

- un grupo que comprende, o que está constituido de, *Citrobacter* de un grupo que comprende, o que está constituido de, *Salmonella.*

- un grupo que comprende, o que está constituido de, *Citrobacter* de un grupo que comprende, o que está constituido de, *P. aeruginosa.*

La invención se refiere también a un procedimiento para discriminar un grupo de bacterias que comprende las bacterias *Citrobacter* de otro grupo de enterobacterias, en una muestra biológica según la cual

- se siembra la muestra biológica sobre un medio de detección tal como se ha definido anteriormente para obtener unas colonias de bacterias o sobre un medio que comprende un sustrato de una actividad metabólica específica de un grupo de enterobacterias, un sustrato de beta glucosidasa, un inductor de la beta glucosidasa o celobiosidasa, siendo dicho inductor un hidrato de carbono constituido de un hidrato de carbono unido en la posición β a la glucosa o hidrato de carbono con una subunidad β-glucósido, en este caso la celobiosa, para obtener unas colonias de bacterias

- se identifican las colonias que reaccionan con dicho sustrato de beta-glucosidasa como pertenecientes a un grupo que comprende, o que está constituido de, *Citrobacter* y reaccionando las colonias sólo con dicho sustrato específico de un grupo de enterobacterias como bacterias pertenecientes a dicho otro grupo de enterobacterias.

Preferiblemente, el procedimiento se utiliza para discriminar

- un grupo que comprende, o que está constituido de, *Citrobacter* de un grupo que comprende, o que está constituido de, *E. coli.*

- un grupo que comprende, o que está constituido de, *Citrobacter* de un grupo que comprende, o que está constituido de, *Salmonella.*

- un grupo que comprende, o que está constituido de, *Citrobacter* de un grupo que comprende, o que está constituido de, *P. aeruginosa.*

La siembra de los microorganismos se puede realizar mediante todas las técnicas de siembra conocidas por el experto en la materia. Se puede realizar una etapa de incubación a una temperatura mediante la cual la actividad enzimática que se desea detectar es óptima, que el experto en la materia puede seleccionar fácilmente según la actividad enzimática a detectar.

La identificación puede efectuarse mediante un examen visual, por colorimetría o fluorimetría.

Ejemplos

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

Ejemplo 1: Aportación de la Celobiosa para la discriminación entre *Escherichia coli* y *Citrobacter*

Se añaden diferentes concentraciones de Celobiosa (0-100-350-1000 mg/l) al medio CPS ID 3 (bioMérieux). Estos medios comprenden 6-Cloro-3-indolil-beta-glucurónido a 250 mg/l y 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-beta-glucósido a 50 mg/l. Estos medios se distribuyen a razón de 20 ml por caja de Petri. Se sembraron unos microorganismos procedentes de la colección de la solicitante sobre estos medios por aislamiento semicuantitativo de 10 µl de una suspensión al 0,5 McFarland diluida al 20ᵉ. Las cajas se incubaron a 37°C durante 48 horas. Las colonias formadas se examinaron visualmente después de 24 y 48 horas de incubación. Se anotó la coloración de estas colonias. Los resultados se presentan en la tabla 1 siguiente:

Tabla 1: Impacto de la concentración en Celobiosa en el medio CPS ID 3 sobre la coloración de las colonias

		Concentración en Celobiosa			
Cepas		0	100	350	1000
Escherichia coli	24 h	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa
407	48 h	Roja	Roja	Roja	Roja
Escherichia coli	24 h	Rosa	Rosa	Rosa	Rosa
003	48 h	Roja	Roja	Roja	Roja
Klebsiella pneumoniae	24 h	Turquesa	Turquesa	Turquesa	Turquesa
111	48 h	Turquesa	Turquesa	Turquesa	Turquesa
Serratia marcescens	24 h	Turquesa	Turquesa	Turquesa	Turquesa
112	48 h	Turquesa	Turquesa	Turquesa	Turquesa
Citrobacter freundii	24 h	Rosa	Violeta	Violeta	Violeta
022	48 h	Malva	Violeta	Violeta	Violeta
Citrobacter freundii	24 h	Incolora	Verde	Verde	Incolora
031	48 h	Verde	Verde	Verde	Verde
Citrobacter freundii	24 h	Incolora	Verde	Verde	Verde
104	48 h	Verde	Verde	Verde	Verde
Enterococcus faecalis	24 h	Turquesa	Turquesa	Turquesa	Turquesa
117	48 h	Turquesa	Turquesa	Turquesa	Turquesa

En la tabla 1 anterior, parece que, en presencia de Celobiosa, las cepas de *Citrobacter* expresan una actividad beta-glucosidasa, lo que se traduce por una coloración de verde a violeta de las colonias, dependiendo de si la cepa expresa o no paralelamente una actividad beta-glucuronidasa. Así, en ausencia de Celobiosa, la cepa *C. freundii* 022 (colonias rosas a las 24H) puede confundirse con las cepas de *Escherichia coli*, que no es ya el caso en presencia de Celobiosa.

Ejemplo 2: Impacto de la concentración de Celobiosa sobre la discriminación entre *Citrobacter* y otras enterobacterias

Se añaden diferentes concentraciones de Celobiosa (0-0,1-1-5-10 g/l) al medio Trypcase Soja (bioMérieux) adicionado de 5-Bromo-6-cloro-3-indolil-beta-galactosido a 50 mg/l y de 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-beta-glucósido a 50 mg/l. Estos medios se distribuyen a razón de 20 ml por caja de Petri. Se sembraron unos microorganismos procedentes de la colección de la solicitante sobre estos medios por aislamiento semicuantitativo de 10 µl de una suspensión al 0,5 McFarland diluida al 20e. Se incubaron las cajas a 37°C durante 48 horas. Las colonias formadas se examinaron visualmente después de 24 y 48 horas de incubación. Se anotó la coloración de estas colonias. Los resultados se presentan en la tabla 2 siguiente:

Tabla 2: Impacto de la concentración en Celobiosa en el medio Trypcase soja adicionado de 5-Bromo-6-cloro-3-indolil-beta-galactosido y de 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-beta-glucósido sobre la coloración de las colonias

		Concentración en Celobiosa				
XCepas		0	0,1	1	5	10
Escherichia coli	24 h	Malva	Malva	Malva	Malva	Malva
018	48 h	Malva	Malva	Malva	Malva	Malva
Escherichia coli	24 h	Malva	Malva	Malva	Malva	Malva
003	48 h	Malva	Malva	Malva	Malva	Malva
Klebsiella pneumoniae	24 h	Verde	Verde	Verde	Turquesa	Turquesa
111	48 h	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul
Serratia marcescens	24 h	Verde	Verde	Verde	Verde	Turquesa
112	48 h	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul
Citrobacter freundii	24 h	Malva	Violeta	Violeta	Rosa	Malva
022	48 h	Malva	Azul	Azul	Azul	Malva
Citrobacter freundii	24 h	Malva	Violeta	Malva	Malva	Malva
031	48 h	Malva	Verde	Verde	Verde	Malva
Citrobacter freundii	24 h	Malva	Violeta	Violeta	Malva	Malva
104	48 h	Malva	Verde	Verde	Verde	Malva
Enterococcus faecalis	24 h	Turquesa	Turquesa	Turquesa	Turquesa	Turquesa
117	48 h	Turquesa	Turquesa	Turquesa	Turquesa	Turquesa

En la tabla 2 anterior, parece que, en presencia de Celobiosa, las cepas de *Citrobacter* expresan una actividad beta-glucosidasa, lo que se traduce por una coloración de verde a violeta de las colonias, dependiendo de si la cepa expresa o no paralelamente una actividad beta-galactosidasa. Así, en ausencia de Celobiosa, las cepas *C. freundii* (colonias malvas a las 24H) pueden confundirse con las cepas de *E. coli,* que no es ya el caso en presencia de Celobiosa. Sin embargo, la diferenciación es menos marcada para unas concentraciones de Celobiosa superiores a 5 g/l.

REIVINDICACIONES

1. Medio de detección y de discriminación de bacterias *Citrobacter* entre otras enterobacterias, que comprende:

◦ un sustrato de una actividad metabólica específica de un grupo de enterobacterias

◦ un sustrato cromogénico de beta-glucosidasa o de celobiosidasa;

◦ un inductor de beta-glucosidasa o celobiosidasa, siendo dicho inductor un hidrato de carbono constituido de un hidrato de carbono unido en la posición β a la glucosa o hidrato de carbono con una subunidad β-glucósido, en este caso la celobiosa.

2. Medio según la reivindicación 1, según el cual dicho inductor de la beta-glucosidasa o celobiosidasa está a una concentración comprendida entre 10 mg/l y 3 g/l.

3. Medio según la reivindicación 1 o 2, según el cual dichas otras enterobacterias son unas *E. coli.*

4. Medio según la reivindicación 3, según el cual dicho sustrato de la actividad metabólica es específico de *E. coli* y se selecciona entre un sustrato de beta-glucuronidasa, beta-galactosidasa, alfa-galactosidasa, de acidificación de la lactosa, de triptofanasa. beta-ribosidasa, fosfatasa, L-Alanina-aminopeptidasa, L-Leucina-aminopeptidasa, preferiblemente un sustrato de beta-glucuronidasa o beta-galactosidasa.

5. Medio según la reivindicación 1 o 2, según el cual otras enterobacterias son unas *Salmonella.*

6. Medio según la reivindicación 5, según el cual dicho sustrato de la actividad metabólica es específico de *Salmonella* y se selecciona entre un sustrato de alfa galactosidasa, esterasa, acidificación del glucuronato, sorbitol, propanodiol, melibiosa, manitol.

7. Medio según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, según el cual el medio de detección comprende, además, un segundo inductor de la β-glucosidasa o de la celobiosidasa, tal como el Metil-β-glucósido, el Isopropil-β-tio-glucósido, l'Indoxil-β-glucósido o el Metil-β-tio-glucósido.

8. Utilización de un medio tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para discriminar un grupo de bacterias que comprende unos *Citrobacter* de otro grupo de enterobacterias.

9. Utilización de un medio que comprende

◦ un sustrato de una actividad metabólica específica de un grupo de enterobacterias

◦ un sustrato cromogénico de beta-glucosidasa

◦ un inductor de la beta-glucosidasa o celobiosidasa, siendo dicho inductor un hidrato de carbono constituido de un hidrato de carbono unido en la posición β a la glucosa o hidrato de carbono con una subunidad β-glucósido, en este caso la celobiosa

◦ para discriminar un grupo de bacterias que comprende *Citrobacter* de otro grupo de enterobacterias.

10. Procedimiento para discriminar un grupo de bacterias que comprende *Citrobacter* de otro grupo de enterobacterias, en una muestra biológica según el cual

1. se inocula la muestra biológica sobre un medio de detección tal como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o sobre un medio que comprende

• un sustrato de una actividad metabólica específica de un grupo de enterobacterias

• un sustrato cromogénico de beta-glucosidasa

• un inductor de la beta-glucosidasa o celobiosidasa, siendo dicho inductor un hidrato de carbono constituido de un hidrato de carbono unido en la posición β a la glucosa o hidrato de carbono con una subunidad β-glucósido, en este caso la celobiosa

para obtener unas colonias de bacterias

2. se identifican las colonias que reaccionan con dicho sustrato de beta-glucosidasa como pertenecientes a un grupo que comprende, o que está constituido de, *Citrobacter* y las colonias que reaccionan sólo con dicho

sustrato específico de un grupo de enterobacterias como bacterias pertenecientes a dicho otro grupo de enterobacterias.