

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 777 612**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.06.2016 PCT/RU2016/000383**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2016 WO16209117**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2016 E 16814798 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 3315597**

54 Título: **Medio nutritivo para cultivar bacterias**

30 Prioridad:

23.06.2015 RU 2015124601

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

05.08.2020

73 Titular/es:

TETS, VIKTOR VENIAMINOVICH (50.0%)

ul. Lensoveta, 27-95

St. Petersburg, 196066, RU y

TETS, GEORGY VIKTOROVICH (50.0%)

72 Inventor/es:

TETS, VIKTOR VENIAMINOVICH y

TETS, GEORGY VIKTOROVICH

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 777 612 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 nutritivo para cultivar bacterias

Campo técnico

5 La invención se refiere a la microbiología, y más particularmente a medios nutritivos que se dividen en entornos de uso general adecuados para el aislamiento de muchas especies de microorganismos, y en especial, diseñados para un cultivo selectivo de ciertos tipos de bacterias, un estudio de sus propiedades y almacenamiento, empleados para el cultivo de bacterias para el estudio posterior de las mismas.

Técnica anterior

10 Para el crecimiento y el proceso de multiplicación, las bacterias deben recibir todas las sustancias que son necesarias para la biosíntesis de componentes celulares y la producción de energía [Balows A., Hausler W.J. Jr., Herrmann K.L., Isenberg H. D., Shadow H.J. Manual of Clinical Microbiology, 5ª ed. ASM, 1991, 1226-1288].

15 Los medios nutritivos se dividen en medios de uso general, adecuados para la generación de muchas especies de microorganismos, y medios especiales, diseñados para el cultivo selectivo de ciertos tipos de bacterias, el estudio de sus propiedades y el almacenamiento. Entre los medios especiales se encuentran el electivo (selectivo), el diagnóstico diferencial (indicador) y el de enlatado [Balows A., Hausler W.J. Jr., Herrmann K.L., Isenberg H. D., Shadow H.J. Manual of Clinical Microbiology, 5ª ed. ASM, 1991, 1226-1288].

Existe un medio de uso general, el denominado medio Columbia, que contiene un producto de la digestión pancreática de caseína, un producto de la digestión de carne con pepsina, un producto de la digestión pancreática de corazón, extracto de levadura, almidón y agua.

20 Este medio ha sido elegido por nosotros como prototipo de la invención reivindicada [Ellner, PD, CJ Stoessel, E. Drakeford y F. Vasi. 1966. A new culture medium for medical bacteriology. A.m. J. Clin. Pathol. 45:502-504].

25 El inconveniente del prototipo es el hecho de que su uso no tiene en cuenta las dos cualidades del medio, cuya necesidad se plantea después del descubrimiento de la bacteria denominada "aún no cultivada" [Oliver, JD. "Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria". FEMS Microbiol Rev 2010, 34: 415-25] - el crecimiento simultáneo en un solo matraz (tubo) de una mezcla de bacterias de diversidad máxima y una tasa de crecimiento suficiente de las bacterias individuales y sus poblaciones mezcladas.

Compendio de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar un medio nutritivo que permite un crecimiento simultáneo del mayor número posible de bacterias presentes en el material de siembra.

30 De acuerdo con la invención, el medio nutritivo que incluye un producto de la digestión pancreática de caseína, un producto de la digestión de carne con pepsina, un producto de la digestión pancreática de corazón, extracto de levadura, almidón y agua, contiene adicionalmente ácido violúrico e infusión de carne de vaca, con la siguiente proporción de los componentes (% en peso):

- producto de la digestión pancreática de caseína - 0,3-1,0;
- 35 - producto de la digestión de carne con pepsina - 0,1-1,5;
- producto de la digestión pancreática de corazón - 0,1-0,9;
- extracto de levadura - 0,1-2,0;
- almidón - 0,3-0,8;
- ácido violúrico - 0,001-0,05;
- 40 - infusión de carne de vaca - 2,0-15;
- agua - el resto.

El medio nutritivo puede contener adicionalmente de 0,3 a 2,5% en peso de agar-agar y/o eritrocitos completos o hemolizados de sangre de oveja - 1-20% en peso, y/o eritrocitos completos o hemolizados de sangre humana - 1-20% en peso, y/o suero de sangre de caballo - 1-15% en peso.

45 La solicitante no tiene conocimiento de ninguna fuente de información que pueda contener información sobre soluciones técnicas idénticas, lo que hace posible llegar a la conclusión de que la invención reivindicada cumple con el criterio de "Novedad" ("N").

Debido a la implementación de la solución técnica reivindicada, se logra un resultado técnico que es asegurar un crecimiento simultáneo suficiente del mayor número posible de bacterias presentes en el material que se está

sembrando.

La solicitante no ha encontrado ninguna fuente de información que contenga datos sobre la influencia de las características de la invención sobre el resultado técnico producido por la invención.

5 En opinión de la solicitante, las propiedades novedosas del objeto mencionadas anteriormente, permiten concluir que la invención se ajusta al requisito de "Etapa inventiva" (IS, por sus siglas en inglés).

Breve descripción de los dibujos

A continuación, la invención se explica con una descripción detallada de ejemplos de su implementación sin hacer referencia a los dibujos.

Realización preferida

10 Preparación del medio nutritivo

El medio se preparó del modo siguiente: se prepararon las siguientes porciones pesadas de los componentes del medio, en % en peso: producto de la digestión pancreática de caseína, 0,3-1,0; producto de la digestión de carne con pepsina, 0,1-1,5; producto de la digestión pancreática de corazón, 0,1-0,9; extracto de levadura, 0,1-2,0; almidón, 0,3-0,8; ácido violúrico, 0,001-0,05; infusión de carne de vaca, 2,0-15. Los componentes se mezclaron, se
15 añadió agua destilada hasta un volumen total de 1000 ml, se ajustó a un pH de $7,3 \pm 0,2$ (una solución de ácido clorhídrico 0,1 N, o una solución de hidróxido de sodio 0,1 N) y se hirvió, después se filtró en caliente a través de un papel, gasa de algodón u otro tipo de filtro, o una cinta que retenía las impurezas mecánicas, o se dejó reposar.

20 Para preparar el medio de agar, se añadió 0,3-2,5% en peso de agar-agar a la mezcla original antes de añadir agua, después de lo cual la preparación se llevó a cabo de la misma manera que para el medio líquido. Los medios de agar fundidos y sedimentados se filtraron a través de un filtro de gasa de algodón.

El medio se esterilizó mediante temperatura elevada en autoclaves a presión o con vapor en suspensión. Típicamente, el medio se esterilizó en un autoclave a 0,5-1,0 bar (120,6°) durante 15-30 minutos. Después de enfriar a + 450°C, se añadieron eritrocitos completos o hemolizados de sangre de carnero o de sangre humana 1-20% en peso, o suero de sangre de caballo (1-15% en peso), al medio de acuerdo con el ejemplo.

25 Evaluación de la diversidad microbiana

Se colocó una mezcla artificial de bacterias con características morfológicas distinguibles mediante microscopía óptica en el medio: representantes gram-positivos de los géneros Staphylococcus, Streptococcus, Micrococcus, diversas Corynebacterium, Bacillus formadores de esporas, Paenibacillus, Oceanobacillus, diversos Actinomyces, Lactobacillus, Neisseria gram-negativa, Escherichia, Brucella, Pseudomonas, Acinetobacter, Proteus, Bordetella. A
30 partir de las colonias de microorganismos se prepararon frotis y luego se tiñeron con Gram, seguido por el uso de microscopía óptica.

Los resultados de la comparación con el prototipo del medio nutritivo reivindicado y el medio complementado con agar-agar según la cantidad de diferentes bacterias cultivadas, se proporcionan en la Tabla 1.

35 El análisis de los resultados mostrados en la Tabla 1 mostraba que el medio nutritivo indicado con la adición de agar-agar y sin adición, permite el cultivo de una cantidad máxima de microorganismos que es superior a la del prototipo, tanto con la adición de eritrocitos de sangre de carnero o de sangre o suero humano como sin adición.

Los resultados de la comparación con el prototipo según la cantidad de diferentes bacterias cultivadas, se proporcionan en la Tabla 2.

40 El análisis de los resultados mostrados en la Tabla 2, mostraba que el medio nutritivo líquido indicado permite el cultivo de una cantidad máxima de microorganismos que es superior a la del prototipo, tanto con la adición de eritrocitos de sangre de carnero o de sangre humana o suero, como sin adición.

Tasa de crecimiento bacteriano

45 Además, se realizó una comparación con el prototipo compuesto por los componentes como en el Ejemplo 12 del medio nutritivo reivindicado, con respecto al tiempo de crecimiento de las colonias de microorganismos que crecían en un medio nutritivo líquido, con la composición de los componentes de acuerdo con los Ejemplos 14, 15, 18, 19, 22, 23. En el medio, se sembraron 10 cepas de diversas bacterias (la mezcla incluía varias cepas de estafilococos, escherichia coli, micrococos, corynebacterium, salmonella, pseudomonas, proteus, bacilos). Los resultados de la comparación con el prototipo según el tiempo de crecimiento de las colonias de microorganismos en crecimiento, se proporcionan en la Tabla 3.

50 Un análisis de los resultados mostrados en la Tabla 3, mostraba que el medio nutritivo indicado permite obtener una variedad máxima de microorganismos en el material en estudio, después de 8 horas de crecimiento, mientras que en

el medio prototipo, la aparición de una cantidad máxima de morfotipos se registraba solo después de 12 horas de crecimiento.

Eficacia del uso de un medio nutritivo para extraer bacterias a partir de un material patológico

- 5 El material sometido a ensayo se sembró sobre un medio nutritivo compuesto por los componentes como en los Ejemplos 2-11, 13-23. A modo de comparación, se usó como prototipo un medio seleccionado compuesto por los componentes como en el Ejemplo 12. Las muestras se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Análisis metagenómico

Extracción de ADN

- 10 La extracción del ADN a partir del material patológico y las bacterias que crecían en el medio, se llevó a cabo utilizando un mini kit para ADN de QIAamp (QIAGEN) de acuerdo con el protocolo disponible.

La amplificación se realizó usando los cebadores eubacterianos 27F-534R que flanqueaban la región hipervariable del gen de ARNr 16S.

27F: 5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3'

534R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'.

- 15 La pareja de cebadores oligonucleotídicos utilizados en el trabajo es específica de las secciones conservadas del gen de ARNr 16S y se utiliza en estudios metagenómicos para detectar la diversidad bacteriana de varias comunidades [Dong, Qunfeng et al. "The microbial communities in male first catch urine are highly similar to those in paired urethral swab specimens". PLoS One 6.5 (2011): e19709. Petrosino, Joseph F., et al. "Metagenomic pyrosequencing and microbial identification." Clinical chemistry 55.5 (2009): 856-866].

- 20 La secuenciación metagenómica del fragmento del gen de ARNr 16S se realizó en un pirosecuenciador de titanio Roche/454 Genome Sequencer FLX. La longitud máxima de las secuencias obtenidas era de 507 nucleótidos, las secuencias quiméricas y las secuencias de menos de 300 nucleótidos no se incluyeron en el análisis.

Análisis de la diversidad y la composición taxonómica

- 25 Cada secuencia obtenida durante la pirosecuenciación se identificó mediante una comparación con las secuencias de las bases de datos GenBank y EzTaxon, utilizando los algoritmos de búsqueda BLASTN y la comparación por parejas. Para determinar la diversidad de las especies, la composición taxonómica y para comparar las comunidades, se utilizó el proceso de pirosecuenciación (<http://pyro.cme.msu.edu>). Las secuencias resultantes se alinearon y el análisis de las agrupaciones se realizó utilizando el programa "Complete Linkage Clustering", que forma parte del proceso de pirosecuenciación. La agrupación se realizó a diferentes niveles caracterizados por diferentes distancias entre las agrupaciones (de 0 a 0,25 en incrementos de 0,01). El aislamiento de los filotipos (OTU) se realizó con una distancia entre agrupaciones de 0,03; la evaluación de la complejidad taxonómica de las comunidades se llevó a cabo a nivel de diferencias correspondientes a los siguientes taxones: especie - 0,03, género - 0,05, familia - 0,1, utilizando el programa Rarefaction (proceso de pirosecuenciación). Para caracterizar la composición taxonómica de las comunidades, se realizó un análisis de las agrupaciones. A continuación, se realizó lo mismo para cada agrupación, por medio del programa Dereplicate Request para la secuencia de nucleótidos correspondiente al centro de la agrupación que tenía la suma de mínimos cuadrados de distancias con las otras secuencias en la agrupación. Las secuencias de agrupaciones representativas se clasificaron taxonómicamente. La clasificación de las especies en todas las etapas del trabajo se realizó basándose en el enfoque genotípico de acuerdo con el código internacional de la nomenclatura de bacterias (ICNB). Si la secuencia representativa tenía una homología de más del 97% con la secuencia del microorganismo validado, la agrupación se asignaba a la especie correspondiente.
- 30
- 35
- 40

Bacterias en orina

- 45 Como resultado de la pirosecuenciación, se encontró una diversidad de bacterias significativa de especies en la muestra de orina, en donde se detectaron 1 orden, 1 familia y 4 especies de enterobacterias. En el material patológico, se encontraron microorganismos de cuatro géneros del orden de las enterobacterias. Las especies de microorganismos que aparecen en la orina aislada sobre un medio nutritivo compuesto por los componentes de acuerdo con los Ejemplos 2-11, 13-23, se muestran en la Tabla 4.

Sobre el medio seleccionado como prototipo compuesto por los componentes de acuerdo con los Ejemplos 1 y 12, se obtuvo el crecimiento de bacterias de una sola especie identificada como *Escherichia coli*.

- 50 Mientras que en el medio nutritivo indicado compuesto por los componentes en todos los ejemplos como resultado de los estudios, se obtuvo casi un 100% de coincidencia de las especies de microorganismos que crecían sobre el medio indicado, en comparación con las especies en la orina procedentes del análisis metagenómico, lo que indica una eficacia elevada del medio nutritivo reivindicado para asegurar el crecimiento de toda la diversidad de bacterias

que se presentan en el material patológico del tipo que se está estudiando.

Bacterias en una secreción de una herida traumática

5 Como resultado de la pirosecuenciación, se encontró una diversidad de bacterias significativa de especies en la secreción traumática, que incluye bacterias que pertenecen a 1 orden, 1 familia y 8 especies. En el material patológico, el número de secuencias estaba dominado por bacterias del orden de las enterobacterias. En la Tabla 5 se muestran las especies de microorganismos que se presentan en la secreción traumática aislada sobre un medio nutritivo compuesto por los componentes de acuerdo con los Ejemplos 2-11, 13-23.

Sobre el medio seleccionado como prototipo compuesto por los componentes según los Ejemplos 1 y 12, se obtuvo el crecimiento de bacterias de una sola especie identificada como *Klebsiella oxytoca*.

10 Mientras que sobre el medio nutritivo indicado compuesto por los componentes en todos los ejemplos como resultado de los estudios, se obtuvo casi un 100% de coincidencia de las especies de microorganismos que crecían sobre el medio indicado, en comparación con las especies en la secreción traumática procedentes del análisis metagenómico, lo que indica una eficacia elevada del medio nutritivo reivindicado para asegurar el crecimiento de toda la diversidad de bacterias que se presentan en el material patológico del tipo que se está estudiando.

15 La detección de una gran cantidad de bacterias de diferentes especies del mismo género durante un análisis metagenómico, indica la presencia de bacterias con un genoma no explorado, es decir, relacionadas con el grupo de bacterias desconocidas, todavía no cultivadas.

Bacterias en el esputo

20 Como resultado de la pirosecuenciación, se detectó una diversidad de bacterias significativa de especies en el esputo, que incluía los siguientes microorganismos: 7 órdenes, 8 familias, 15 especies. En el material patológico, el número de secuencias estaba dominado por bacterias de los 2 órdenes: Pseudomonadales y Burkholderiales. En el esputo, la representación de Pseudomonadales y Burkholderiales era de un 88,3% y 8,5%. Aisladas sobre un medio nutritivo compuesto por los componentes de acuerdo con los Ejemplos 2-11, 13-23, las especies de microorganismos que se encuentran en el esputo se muestran en la Tabla 6.

25 Sobre el medio seleccionado como prototipo compuesto por los componentes según los Ejemplos 1 y 12, se obtuvo el crecimiento de bacterias de una sola especie identificada como *Staphylococcus epidermidis*.

30 Mientras que sobre el medio nutritivo indicado compuesto por los componentes en todos los ejemplos como resultado de los estudios, se obtuvo casi un 100% de coincidencia de las especies de microorganismos que crecían sobre el medio indicado, en comparación con las especies en el esputo procedentes del análisis metagenómico, lo que indica una eficacia elevada del medio nutritivo reivindicado para asegurar el crecimiento de toda la diversidad de bacterias que se presentan en el material patológico del tipo que se está estudiando.

Aplicabilidad industrial

35 La invención se puede implementar utilizando materiales y equipos conocidos, lo que da como resultado, de acuerdo con la opinión de la solicitante, que la invención cumple con el requisito de patentabilidad de "Aplicabilidad industrial" ("IA", por sus siglas en inglés).

Tabla 1

Número de bacterias diferentes que crecen sobre un medio nutritivo reivindicado complementado con agar-agar

Nº de Ejemplo	Medio nutritivo % en masa	Número de bacterias diferentes en la mezcla artificial	Número de bacterias diferentes que crecen sobre el medio nutritivo
1	2	3	4
1	Prototipo: - producto de la digestión pancreática de caseína - 0,5 - producto de la digestión de carne con pepsina - 1 - producto de la digestión pancreática de corazón - 0,5 - extracto de levadura - 0,15 - almidón - 0,5 - agua - 97,35	25	10

ES 2 777 612 T3

Nº de Ejemplo	Medio nutritivo % en masa	Número de bacterias diferentes en la mezcla artificial	Número de bacterias diferentes que crecen sobre el medio nutritivo
2	Medio reivindicado según la reivindicación 1: - producto de la digestión pancreática de caseína - 0,3 - producto de la digestión de carne con pepsina - 0,1 - producto de la digestión pancreática de corazón - 0,1 - extracto de levadura - 0,1 - almidón - 0,3 - ácido violúrico - 0,001 - solución de carne de vaca - 2,0 - agua - 97,099	25	14
3	Medio reivindicado según la reivindicación 2: - producto de la digestión pancreática de caseína - 1,0 - producto de la digestión de carne con pepsina - 1,5 - producto de la digestión pancreática de corazón - 0,9 - extracto de levadura - 2,0 - almidón - 0,8 - ácido violúrico - 0,05 - solución de carne de vaca - 15,0 - agar-agar - 0,3 - agua - 78,45	25	17
4	Medio reivindicado según la reivindicación 3: - producto de la digestión pancreática de caseína - 0,5 - producto de la digestión de carne con pepsina - 0,5 - producto de la digestión pancreática de corazón - 0,5 - extracto de levadura - 0,5 - almidón - 0,5 - ácido violúrico - 0,01 - solución de carne de vaca - 8,0 - agar-agar - 0,8 - suero de caballo - 5,0 - agua - 83,69	25	21
5	Medio reivindicado según la reivindicación 3: - producto de la digestión pancreática de caseína - 0,8 - producto de la digestión de carne con pepsina - 1,2 - producto de la digestión pancreática de corazón - 0,8 - extracto de levadura - 1,5 - almidón - 0,8 - ácido violúrico - 0,04 - solución de carne de vaca - 12,0 - agar-agar - 2,2 - suero de caballo - 15,0 - agua - 65,66	25	22
6	Medio reivindicado según la reivindicación 4: - producto de la digestión pancreática de caseína - 0,9 - producto de la digestión de carne con pepsina - 1,0 - producto de la digestión pancreática de corazón - 0,7 - extracto de levadura - 1,0 - almidón - 0,6 - ácido violúrico - 0,04 - solución de carne de vaca - 10,0 - agar-agar - 1,2 - eritrocitos de cordero no hemolizados - 1,0 - agua - 83,56	25	21

ES 2 777 612 T3

Nº de Ejemplo	Medio nutritivo % en masa	Número de bacterias diferentes en la mezcla artificial	Número de bacterias diferentes que crecen sobre el medio nutritivo
7	Medio reivindicado según la reivindicación 5: - producto de la digestión pancreática de caseína - 0,6 - producto de la digestión de carne con pepsina - 0,8 - producto de la digestión pancreática de corazón - 0,4 - extracto de levadura - 0,7 - almidón - 0,4 - ácido violúrico - 0,03 - solución de carne de vaca - 7,0 - agar-agar - 0,9 - eritrocitos de cordero hemolizados - 5,0 - agua - 84,17	25	21
8	Medio reivindicado según la reivindicación 5: - producto de la digestión pancreática de caseína - 0,6 - producto de la digestión de carne con pepsina - 0,8 - producto de la digestión pancreática de corazón - 0,4 - extracto de levadura - 0,7 - almidón - 0,4 - ácido violúrico - 0,03 - solución de carne de vaca - 7,0 - agar-agar - 0,9 - eritrocitos de cordero hemolizados - 20,0 - agua - 69,17	25	22
9	Medio reivindicado según la reivindicación 6: - producto de la digestión pancreática de caseína - 0,9 - producto de la digestión de carne con pepsina - 1,0 - producto de la digestión pancreática de corazón - 0,7 - extracto de levadura - 1,0 - almidón - 0,6 - ácido violúrico - 0,04 - solución de carne de vaca - 10,0 - agar-agar - 1,2 - eritrocitos humanos no hemolizados - 1,0 - agua - 83,56	25	20
10	Medio reivindicado según la reivindicación 7: - producto de la digestión pancreática de caseína - 0,6 - producto de la digestión de carne con pepsina - 0,8 - producto de la digestión pancreática de corazón - 0,4 - extracto de levadura - 0,7 - almidón - 0,4 - ácido violúrico - 0,03 - solución de carne de vaca - 7,0 - agar-agar - 0,9 - eritrocitos humanos hemolizados - 5,0 - agua - 84,17	25	21
11	Medio reivindicado según la reivindicación 7: - producto de la digestión pancreática de caseína - 0,6 - producto de la digestión de carne con pepsina - 0,8 - producto de la digestión pancreática de corazón - 0,4 - extracto de levadura - 0,7 - almidón - 0,4 - ácido violúrico - 0,03 - solución de carne de vaca - 7,0 - agar-agar - 0,9 - eritrocitos humanos hemolizados - 20,0 - agua - 69,17	25	22

Tabla 2

Número de bacterias diferentes que crecen sobre un medio nutritivo líquido

Nº de Ejemplo	Medio nutritivo % en masa	Número de bacterias diferentes en la mezcla artificial.	Número de bacterias diferentes que crecen sobre el medio nutritivo
1	2	3	4
12	Prototipo: - producto de la digestión pancreática de caseína - 1,0 - producto de la digestión de carne con pepsina - 1,4 - producto de la digestión pancreática de corazón - 0,9 - extracto de levadura - 1,5 - almidón - 0,8 - agua - 94,4	12	7
13	Medio reivindicado según la reivindicación 1: - producto de la digestión pancreática de caseína - 1,0 - producto de la digestión de carne con pepsina - 1,5 - producto de la digestión pancreática de corazón - 0,9 - extracto de levadura - 2,0 - almidón - 0,8 - ácido violúrico - 0,05 - solución de carne de vaca - 15,0 - agua - 78,75	12	9
14	Medio reivindicado según la reivindicación 3: - producto de la digestión pancreática de caseína - 0,5 - producto de la digestión de carne con pepsina - 0,5 - producto de la digestión pancreática de corazón - 0,5 - extracto de levadura - 0,5 - almidón - 0,5 - ácido violúrico - 0,01 - solución de carne de vaca - 8,0 - suero de caballo - 1,0 - agua - 88,49	12	10
15	Medio reivindicado según la reivindicación 3: - producto de la digestión pancreática de caseína - 0,5 - producto de la digestión de carne con pepsina - 0,5 - producto de la digestión pancreática de corazón - 0,5 - extracto de levadura - 0,5 - almidón - 0,5 - ácido violúrico - 0,01 - solución de carne de vaca - 8,0 - suero de caballo - 5,0 - agua - 84,49	12	10
16	Medio reivindicado según la reivindicación 4: - producto de la digestión pancreática de caseína - 0,9 - producto de la digestión de carne con pepsina - 1,0 - producto de la digestión pancreática de corazón - 0,7 - extracto de levadura - 1,0 - almidón - 0,6 - ácido violúrico - 0,04 - solución de carne de vaca 10,0 - eritrocitos de cordero no hemolizados - 5,0 - agua - 80,76	12	10

ES 2 777 612 T3

Nº de Ejemplo	Medio nutritivo % en masa	Número de bacterias diferentes en la mezcla artificial.	Número de bacterias diferentes que crecen sobre el medio nutritivo
17	Medio reivindicado según la reivindicación 4: - producto de la digestión pancreática de caseína - 0,4 - producto de la digestión de carne con pepsina - 0,8 - producto de la digestión pancreática de corazón - 0,2 - extracto de levadura - 0,8 - almidón - 0,4 - ácido violúrico - 0,04 - solución de carne de vaca - 5,0 - eritrocitos de cordero no hemolizados - 20,0 - agua - 72,36	12	10
18	Medio reivindicado según la reivindicación 5: - producto de la digestión pancreática de caseína - 0,9 - producto de la digestión de carne con pepsina - 1,2 - producto de la digestión pancreática de corazón - 0,7 - extracto de levadura - 1,7 - almidón - 0,7 - ácido violúrico - 0,04 - solución de carne de vaca - 12,0 - eritrocitos de cordero hemolizados - 1,0 - agua - 81,76	12	10
19	Medio reivindicado según la reivindicación 5: - producto de la digestión pancreática de caseína - 0,6 - producto de la digestión de carne de pepsina - 0,8 - producto de la digestión pancreática de corazón - 0,4 - extracto de levadura - 0,7 - almidón - 0,4 - ácido violúrico 0,03 - solución de carne de vaca - 7,0 - eritrocitos de cordero hemolizados - 10,0 - agua - 80,07	12	10
20	Medio reivindicado según la reivindicación 6: - producto de la digestión pancreática de caseína - 0,9 - producto de la digestión de carne con pepsina - 1,0 - producto de la digestión pancreática de corazón - 0,7 - extracto de levadura - 1,0 - almidón - 0,6 - ácido violúrico - 0,04 - solución de carne de vaca - 10,0 - eritrocitos humanos no hemolizados - 5,0 - agua - 80,76	12	10
21	Medio reivindicado según la reivindicación 6: - producto de la digestión pancreática de caseína - 0,4 - producto de la digestión de carne con pepsina - 0,8 - producto de la digestión pancreática de corazón - 0,2 - extracto de levadura - 0,8 - almidón - 0,4 - ácido violúrico - 0,04 - solución de carne de vaca - 5,0 - eritrocitos humanos no hemolizados - 20,0 - agua - 72,36	12	10

Nº de Ejemplo	Medio nutritivo % en masa	Número de bacterias diferentes en la mezcla artificial.	Número de bacterias diferentes que crecen sobre el medio nutritivo
22	Medio reivindicado según la reivindicación 7: - producto de la digestión pancreática de caseína - 0,9 - producto de la digestión de carne con pepsina 1,2 - producto de la digestión pancreática de corazón - 0,7 - extracto de levadura - 1,7 - almidón - 0,7 - ácido violúrico - 0,04 - solución de carne de vaca - 12,0 - eritrocitos humanos hemolizados - 1,0 - agua - 81,76	12	10
23	Medio reivindicado según la reivindicación 7: - producto de la digestión pancreática de caseína - 0,6 - producto de la digestión de carne con pepsina - 0,8 - producto de la digestión pancreática de corazón - 0,4 - extracto de levadura - 0,7 - almidón - 0,4 - ácido violúrico - 0,03 - solución de carne de vaca - 7,0 - eritrocitos humanos hemolizados - 10,0 - agua - 80,07	12	10

Tabla 3

Número de diferentes morfotipos de colonias de microorganismos en crecimiento en diferentes puntos temporales

Medio nutritivo Nº de ejemplo	Número de morfotipos identificados de colonias de microorganismos en crecimiento						
	Tiempo de crecimiento (horas)						
	2	4	6	8	12	18	24
1	2	3	4	5	6	7	8
Prototipo: Ejemplo 12	0	2	4	6	7	7	7
Medio reivindicado según la reivindicación 3: Ejemplo 14	0	4	8	10	10	10	10
Medio reivindicado según con la reivindicación 5 o 7: Ejemplo 18 o 22	0	4	8	10	10	10	10
Medio reivindicado según la reivindicación 3: Ejemplo 15	0	6	8	10	10	10	10
Medio reivindicado según la reivindicación 5 o 7: Ejemplo 19 o 23	0	6	8	10	10	10	10

5 Tabla 4

Bacterias aisladas que se pueden encontrar en la orina

Clasificación	Material patológico, orina	Medio nutritivo reivindicado	Prototipo
Orden	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriales</i>
Familia	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>

ES 2 777 612 T3

Clasificación	Material patológico, orina	Medio nutritivo reivindicado	Prototipo
Especie	<i>Escherichia coli</i> <i>Shigella spp</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter hormaechei</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Shigella spp</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter hormaechei</i>	<i>Escherichia coli</i>

Tabla 5

Bacterias aisladas que se pueden encontrar en el exudado de una herida (líquido de una herida)

Clasificación	Material patológico, exudado de una herida (líquido de una herida)	Medio nutritivo reivindicado	Prototipo
Orden	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriales</i>
Familia	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
Especie	<i>Enterobacter aerogens</i> <i>Enterobacter asburiae</i> <i>Enterobacter cancerogenus</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter hormaechei</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Enterobacter aerogens</i> <i>Enterobacter asburiae</i> <i>Enterobacter cancerogenus</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter hormaechei</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>

5 Tabla 6

Bacterias aisladas que se puede encontrar en una mucosidad

Clasificación	Material patológico, mucosidad	Medio nutritivo reivindicado	Prototipo
1	2	3	4
Orden	<i>Bacillales</i> <i>Pseudomonales</i> <i>Clostridiales</i> <i>Actinomycetales</i> <i>Lactobacillales</i> <i>Burkholderiales</i> <i>Sphingomonadales</i>	<i>Bacillales</i> <i>Pseudomonales</i> <i>Clostridiales</i> <i>Actinomycetales</i> <i>Lactobacillales</i> <i>Burkholderiales</i> <i>Sphingomonadales</i>	<i>Bacillales</i>
Familia	<i>Staphylococcaceae</i> <i>Corynebacteriuaceae</i> <i>Streptococcaceae</i> <i>Pseudomonadaceae</i> <i>Alcaligenaceae</i> <i>Carnobacteriaceae</i> <i>Sphingomonadaceae</i> <i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Staphylococcaceae</i> <i>Corynebacteriuaceae</i> <i>Streptococcaceae</i> <i>Pseudomonadaceae</i> <i>Alcaligenaceae</i> <i>Carnobacteriaceae</i> <i>Sphingomonadaceae</i> <i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Staphylococcaceae</i>

ES 2 777 612 T3

Clasificación	Material patológico, mucosidad	Medio nutritivo reivindicado	Prototipo
1	2	3	4
Especie	<i>Staphylococcus epidermididis</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Pseudomonas sp</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Achromobacter insolitus</i> <i>Achromobacter xylooxidans</i> <i>Achromobacter sp</i> <i>Granulicatella adiacens</i> <i>Sphingomonas sp</i> <i>Streptococcus sp</i> <i>Hebaspirillum sp</i> <i>Corynebacterium striatum</i> <i>Granulicatella adiacens</i> <i>Achromobacter denitrificans</i>	<i>Staphylococcus epidermididis</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Pseudomonas sp</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Achromobacter insolitus</i> <i>Achromobacter xylooxidans</i> <i>Achromobacter sp</i> <i>Granulicatella adiacens</i> <i>Sphingomonas sp</i> <i>Streptococcus sp</i> <i>Hebaspirillum sp</i> <i>Corynebacterium striatum</i> <i>Granulicatella adiacens</i> <i>Achromobacter denitrificans</i>	<i>Staphylococcus epidermididis</i>

REIVINDICACIONES

- 5 1. El medio nutritivo para el cultivo de bacterias, que incluye un producto de la digestión pancreática de caseína, un producto de la digestión de carne con pepsina, un producto de la digestión pancreática de corazón, extracto de levadura, almidón y agua, caracterizado porque contiene adicionalmente ácido violúrico e infusión de carne de vaca, con la siguiente proporción de los componentes (% en peso):
- producto de la digestión pancreática de caseína: 0,3-1,0;
 - producto de la digestión de carne con pepsina: 0,1-1,5;
 - producto de la digestión pancreática de corazón: 0,1-0,9;
 - extracto de levadura: 0,1-2,0;
 - 10 - almidón: 0,3-0,8;
 - infusión de carne de vaca: 2,0-15;
 - ácido violúrico: 0,001-0,05;
 - agua: el resto.
- 15 2. El medio nutritivo según la reivindicación 1, caracterizado porque contiene adicionalmente agar-agar (0,3-2,5% en peso).
3. El medio nutritivo según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque contiene adicionalmente suero de sangre de caballo: 1-15% en peso.
4. El medio nutritivo según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque contiene adicionalmente eritrocitos de sangre de carnero: 1-20% en peso.
- 20 5. El medio nutritivo según la reivindicación 4, caracterizado porque contiene adicionalmente eritrocitos hemolizados de sangre de carnero: 1-20% en peso.
6. El medio nutritivo según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque contiene adicionalmente eritrocitos de sangre humana: 1-20% en peso.
- 25 7. El medio nutritivo según la reivindicación 6, caracterizado porque contiene adicionalmente eritrocitos hemolizados de sangre humana: 1-20% en peso.