



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 122 933**

⑫ Número de solicitud: 9700408

⑬ Int. Cl.⁶: C12Q 1/10

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **26.02.97**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.12.98**

Fecha de concesión: **02.06.99**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **01.07.99**

⑱ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.07.99

⑲ Titular/es:

Comunidad Foral de Navarra (Titular del 50 %)
Avda. Carlos III, 2
31002 Pamplona, Navarra, ES
Instituto Científico y Tecnológico de Navarra,
Begoña Sesma Bea,
Carlos Gamazo de la Rasilla,
Ramón Díaz García,
Miguel Álvarez Marques,
Ines Dorronsoro Ibero y
Cristina Solano Goñi

(Titulares del 50 % restante a partes iguales)

⑳ Inventor/es: **Sesma Bea, Begoña;**
Gamazo de la Rasilla, Carlos;
Díaz García, Ramón;
Álvarez Marques, Miguel;
Dorronsoro Ibero, Inés y
Solano Goñi, Cristina

㉑ Agente: **Buceta Facorro, Luis**

㉒ Título: **Procedimiento para la diferenciación in vitro de las cepas virulentas de salmonella enteritidis.**

㉓ Resumen:

Procedimiento para la diferenciación in vitro de las cepas virulentas de Salmonella enteritidis, que consiste en introducir las muestras a analizar en un medio ATM ("adherence test medium"), incluyéndose el conjunto en un tubo de ensayo, el cual somete a una agitación intensa hasta que las cepas analizadas forman filamentos, distinguiéndose las cepas de virulencia elevada por la formación de filamentos de considerable tamaño y las cepas de poca virulencia por la formación de filamentos de reducido tamaño.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 122 933 B1

DESCRIPCION

Procedimiento para la diferenciación in vitro de las cepas virulentas de salmonella enteritidis.

La presente invención hace referencia a un procedimiento destinado para diferenciar las cepas virulentas de Salmonella enteritidis, que son nocivas, respecto de otras de menor virulencia que no resultan nocivas.

Ensayos realizados para determinar el grado de virulencia de Salmonella enteritidis, han venido a demostrarla existencia de aislamientos de dicho microorganismo con un bajo grado de virulencia, presentando unas dosis infectivas mínimas tan elevadas que difícilmente pueden ser adquiridas por la ingestión de un alimento contaminado por las cepas correspondientes.

La infección por Salmonella enteritidis es una causa muy importante de toxi-infecciones por alimentos, constituyendo la causa principal de gastroenteritis en los humanos, de tal forma que habitualmente es adquirida por la ingestión de alimentos contaminados, siendo los productos procedentes de las aves de corral la fuente más importante de esta bacteria en los países desarrollados.

Durante su viaje por el organismo Salmonella debe tolerar varias agresiones, como el pH gástrico y los péptidos antimicrobianos segregados por los enterocitos, produciéndose durante dicho viaje una interacción íntima entre la bacteria y las células hospedadoras mediante una serie de señales bioquímicas. Luego, durante la invasión dentro de las células epiteliales y fagocíticas ocurren espectaculares sucesos que dan lugar a numerosos procesos de inducción, lo cual permite afirmar que la virulencia de Salmonella, así como en la mayoría de otros microorganismos, es una propiedad adquirida.

Consiguientemente, la osmolaridad, la tensión de oxígeno, el pH, la concentración de hierro libre y el magnesio, influyen significativamente en el fenotipo y la expresión de genes de invasión; basándose en lo cual es posible llevar a cabo un procedimiento para la diferenciación in vitro de la virulencia en base al estudio de la expresión de un fenotipo por las cepas virulentas, en unas condiciones determinadas.

En ese sentido, de acuerdo con la invención se propone un procedimiento que permite desarrollar la diferenciación in vitro de las cepas virulentas de la Salmonella enteritidis y las que por su grado de virulencia menor resultan inofensivas.

El procedimiento consiste en inocular la cepa bacteriana a analizar en un medio ATM ("adherence test medium"), conteniendo un compuesto como fuente de carbono, para lo cual resulta por

ejemplo idónea la glucosa, sin que ésta sea limitativa.

El ensayo se puede realizar tanto en medio líquido como en medio sólido. Cuando la determinación se realiza en medio líquido ATM, éste se incluye en tubo de ensayo sometándose a una agitación vigorosa, con lo cual la cepa inoculada forma filamentos visibles, habiéndose comprobado que las cepas cuyo grado de virulencia es elevado dan lugar a filamentos de un considerable tamaño, en tanto que las cepas poco virulentas apenas forman filamentos apreciables.

Cuando la determinación se realiza en medio sólido el medio ATM debe ser suplementado con agar y rojo congo (A TMA, "ATM agar"). En este caso, las colonias de las cepas más virulentas tras la incubación en ATMA presentan una coloración rojiza, en contraste con las colonias de las cepas de baja virulencia que presentan una coloración amarillenta.

De esta forma es posible determinar por lo tanto muy fácilmente las cepas que son virulentas y por lo tanto infecciosas, de las que no lo son, lo cual permite por ejemplo comprobar de una forma sencilla y rápida la salubridad o no de los alimentos.

La agitación en el proceso debe efectuarse de una forma brusca, es decir a base de sacudidas o vibración intensa, ya que una agitación uniforme, orbital o similar, no proporciona resultados efectivos en lo que se refiere a la formación de filamentos por las cepas analizadas, pudiendo motivar conclusiones erróneas.

El medio ATM para desarrollar el procedimiento, debe ser deficiente en nitrógeno (N), fósforo (P), azufre (S), magnesio (Mg) y hierro (Fe), ya que estos materiales ocasionan una inhibición del fenómeno de la producción de filamentos por las cepas analizadas.

Composición del medio y condiciones de incubación:

- Medio líquido ATM, que en su caso se compone de: 60mM NaCl, 30mM NaHCO₃, 20mM KCl, 111mM Glucosa (pH 8,2). Las bacterias deben ser incubadas a 37°C durante una hora mediante agitación vibratoria pulsante. El inóculo consistirá en bacterias en su fase exponencial o bien en su fase estacionaria, en cuyo caso el medio ATM deberá suplementarse con rojo congo (0,004 %)
- Medio sólido ATMA, compuesto de ATM suplementado con agar (1,5 %) y rojo congo (0,03 %)

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la diferenciación in vitro de las cepas virulentas de Salmonella enteritidis, **caracterizado** porque consiste en introducir las muestras a analizar en un medio ATM (“adherence test medium”), incluyéndose el conjunto en un tubo de ensayo, el cual se somete a una agitación intensa hasta que las cepas analizadas forman filamentos, de forma que las cepas de grado de virulencia elevado forman filamentos de considerable tamaño, mientras que las de poca virulencia apenas forman filamentos apreciables.

2. Procedimiento para la diferenciación in vitro de las cepas virulentas de Salmonella enteritidis, en todo de acuerdo con la primera reivindicación, **caracterizado** porque la agitación del

tubo de ensayo debe efectuarse con brusquedad, preferentemente a base de sacudidas.

3. Procedimiento para la diferenciación in vitro de las cepas virulentas de Salmonella enteritidis, en todo de acuerdo con la primera reivindicación, **caracterizado** porque el medio de cultivo ATM debe ser deficiente en algunos elementos, tales como N, P, S, Mg y Fe, que inhiben el fenómeno de formación de filamentos por las cepas de las muestras.

4. Procedimiento para la diferenciación in vitro de las cepas virulentas de Salmonella enteritidis, en todo de acuerdo con la primera reivindicación, **caracterizado** porque el medio de cultivo ATM puede ser suplementado con rojo congo para favorecer la autoagregación y pigmentación de las cepas virulentas en medios sólidos o líquidos.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 122 933
⑫ N.º solicitud: 9700408
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 26.02.97
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: C12Q 1/10

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	HURME R. et al. "Intermediate Filament-like Network Formed in vitro by a bacterial Coiled Coil Protein" The Journal of Biological Chemistry. 1994. Vol. 269, páginas 10675-10682.	1
A	STEIN M.A. et al. "Identification of a Salmonella virulence gene required for formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins with epithelial cells" Molecular Microbiology. 1996. Vol. 20 (1), páginas 151-164.	1

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe 17.11.98	Examinador A. Collados Martín Posadillo	Página 1/1
--	--	---------------