



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①① Número de publicación: **2 164 535**

②① Número de solicitud: 009901454

⑤① Int. Cl.⁷: C12Q 1/04

①②

PATENTE DE INVENCION

B1

②② Fecha de presentación: **30.06.1999**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2002**

Fecha de concesión: **12.03.2003**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
26.02.2003

④⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.04.2003**

④⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.04.2003

⑦③ Titular/es:
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
Patio de Escuelas Menores, 1
37007 Salamanca, ES

⑦② Inventor/es: **Velázquez Pérez, Encarnación;**
Martínez Molina, Eustaquio;
Mateos González, Pedro F. y
Chordi Corbo, Andrés

⑦④ Agente: **Dávila Baz, Angel**

⑤④ Título: **Kit y procedimiento para la identificación de cocos y bacilos Gram positivos y/o negativos que producen alteraciones de alimentos, bebidas, cosméticos o medicamentos.**

⑤⑦ Resumen:

Kit y procedimiento para la identificación de cocos y bacilos Gram positivos y/o negativos que producen alteraciones de alimentos, bebidas, cosméticos o medicamentos.

Kit y procedimiento para la identificación de bacilos Gram positivos esporulados de la familia bacillaceae, aerobios facultativos presentes en muestras clínicas o veterinarias, de alimentos tanto de origen vegetal como animal, de agua, suelo atmósferas y, en general, de cualquier tipo de muestras. Comprende las etapas de (a) aislar las bacterias en un medio sólido en placas adecuado para su crecimiento a la temperatura y pH adecuados para cada cepa a aislar; (b) incubar el medio resultante; (c) realizar una tinción de Gram y una tinción de esporas y (d) sembrar, a partir de este medio, una colonia o suspensión de bacilos Gram positivos esporulados en los medios de cultivo adecuados para la realización de las pruebas deseadas; y (e) identificar la cepa aislada comparando los resultados de dichas pruebas con los de una base de datos patrones.

La invención abarca el kit para la realización del procedimiento.

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

DESCRIPCION

Kit y procedimiento para la identificación de cocos y bacilos Gram positivos y/o negativos que producen alteraciones de alimentos, bebidas, cosméticos o medicamentos.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la identificación de cocos y bacilos Gram positivos y/o negativos que producen alteraciones de alimentos, bebidas o medicamentos presentes en cualquier tipo de muestras ya sean de procedencia humana, animal, vegetal, industrial o medioambiental, así como un conjunto o kit de medios de cultivo sólidos y/o líquidos y los reactivos necesarios para ser utilizados en dicho procedimiento.

10

El procedimiento y el kit junto a sus reactivos según la invención son susceptibles de ser aplicados en la identificación de cocos y bacilos Gram positivos y/o negativos que producen alteraciones de alimentos, bebidas o medicamentos en todas y cada una de las industrias, centros de estudio y enseñanza, diagnóstico, análisis o investigación que trabajan o pueden aislar este tipo de bacterias.

15

Actualmente la identificación de estas bacterias está basada fundamentalmente en la utilización de atributos fisiológicos y bioquímicos recogidos en el Manual de Berge y de Bacteriología Sistemática.

20

Actualmente no existen kits diseñados para la identificación de estos microorganismos a pesar de que estas especies tienen gran importancia en la alteración de alimentos y bebidas. Los sistemas comerciales diseñados para otros grupos de bacterias no incluyen las pruebas necesarias para identificar estas bacterias y además en sus bases de datos no las incluyen por lo que el usuario carece de una referencia para comparar los resultados obtenidos cuando el objeto de la identificación es una de estas bacterias.

25

De acuerdo con esta invención se proporciona ahora un procedimiento y un conjunto o kit de medios diseñados específicamente para la identificación de estas bacterias. Igualmente, y según la presente invención, se proporcionan no sólo pruebas fisiológicas y bioquímicas adecuadas a la identificación del grupo de bacterias que nos ocupa, sino también bases de datos con los que se pueden comparar los resultados obtenidos por el usuario.

30

La ventaja de hacer estas pruebas por medio de agruparlas en un kit es que posibilita la comparación del resultado de las pruebas con una base de datos proporcionada, dando una identificación inmediata y segura de la especie de cocos y bacilos Gram positivos y/o negativos analizados.

35

Estudios anteriores, intentaban la identificación, a partir del caldo original, lo que causaba muchas interferencias, dificultando la identificación.

40

De acuerdo con la invención, se proporciona ahora un procedimiento para identificar cocos y bacilos Gram positivos y/o negativos que producen alteraciones de alimentos, bebidas o medicamentos presentes en muestras clínicas o veterinarias, de alimentos tanto de origen animal como vegetal, de agua, suelo, atmósferas y, en general, de cualquier tipo de muestras, caracterizado porque comprende las etapas de: (a) aislar las bacterias en un medio sólido, en placas, adecuado para su crecimiento, a la temperatura y pH adecuados para cada cepa a aislar; (b) incubar el medio resultante; (c) realizar una tinción de Gram y una tinción de esporas; (d) sembrar a partir de este medio una colonia o suspensión de bacterias en los medios de cultivo adecuados para la realización de las pruebas deseadas; y (e) identificar la bacteria aislada comparando los resultados de dichas pruebas con los de una base de datos patrones.

45

50

Según el procedimiento de la invención, la siembra se realiza en un conjunto de medios de cultivo sólidos, semisólidos y/o líquidos junto con reactivos específicos para la identificación de dichas bacterias a través de la realización de las siguientes pruebas:

- catalasa

55

- hidrólisis de esculina

- hidrólisis de hipurato

- crecimiento en 6,5 % de NaCl

60

- crecimiento en bilis al 40 %

- crecimiento a 45 Y 50i C

ES 2 164 535 B1

- producción de ácidos a partir de azúcares: sacarosa, maltosa, fructosa, L-arabinosa, manitol, lactosa, salicina, trealosa, melibiosa, xilosa, amigdalina, melecitosa, rafinosa, manosa, galactosa, acetato y DL-lactato.

5

- producción de gas a partir de glucosa

Concretamente, tales pruebas se realizan usando los siguientes medios y reactivos específicos

10 1. Un medio en el que se pone de manifiesto la producción de catalasa junto a un reactivo específico para detectarla, que comprenden:

1.a. El medio

15

- Fuente de nitrógeno asimilable orgánica o inorgánica	0,1-1 %
- Sales minerales	<0,1 %
- Glucosa	0,1-1 %
- Peptona o mezcla de aminoácidos	0,1-1 %
- Extracto de levadura	0,1-0,5 %

20

1.b. El reactivo

- Agua oxigenada o peróxido de hidrógeno	10-40 %
--	---------

25

2. Hidrólisis de esculina: un medio en el que se pone de manifiesto la hidrólisis de esculina, que comprende:

- Infusión cerebro-corazón	20-40 %
- glucosa	0,2-0,4 %
- Esculina	0,09-0,15 %
- Citrato férrico	0,04-0,06 %

30

3. Hidrólisis de hipurato: un medio en el que se pone de manifiesto la hidrólisis de hipurato, que comprende:

35

3.a. El medio

- Infusión de corazón	30-50 %
- Triptosa	0,8-1,2 %
- NaCl	0,04-0,06 %
- hipurato sódico	0,09-1,2 %

40

3.b. El reactivo

- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1-1,2 %
- HCl	2 %

45

4. Crecimiento al 6,5 % de NaCl: Un medio en el que se pone de manifiesto el crecimiento en altas concentraciones de NaCl, que comprende:

50

- Extracto de carne	0,2-0,3 %
- Peptona	0,4-0,5 %
- Glucosa	0,4-1 %
- NaCl	6,5 %

55

5. Crecimiento en bilis al 40 %: Un medio en el que se pone de manifiesto el crecimiento en bilis al 40 %, que comprende:

60

- Peptona	0,4-0,6 %
- Extracto de levadura	0,3-0,5 %
- Extracto de carne	0,03-0,04 %
- Bilis de buey	40 %

ES 2 164 535 B1

6. Crecimiento a 45 ó 50°C: Un medio en el que se pone de manifiesto el crecimiento en diferentes temperaturas de incubación, que comprende:

5	- Extracto de carne	0,2-0,3 %
	- Peptona	0,4-0,5 %
	- NaCl	0,1-0,2 %

7. Producción de ácido a partir de las siguientes fuentes de carbono: sacarosa, maltosa, fructosa, L-arabinosa, manitol, lactosa, salicina, trealosa, melibiosa, xilosa, amigdalina, melecitosa, rafinosa, manosa, galactosa, acetato y DL-lactato: Medios en los que se pone de manifiesto la producción de ácido a partir de azúcares, que comprende:

15	- Fuente de nitrógeno asimilable orgánica o inorgánica	0,1-1 %
	- Sales minerales	< 0,1 %
	- fuente de carbono	0,5-1 %
	- Un indicador de pH con zona de viraje entre 6 y 8	0,001 %

8. Producción de gas a partir de glucosa: un medio en el que se pone de manifiesto la producción de gas a partir del metabolismo de la glucosa, que comprende:

20	- Fuente de nitrógeno asimilable orgánica o inorgánica	0,3-1 %
	- Sales minerales	<0,1 %
	- glucosa	0,5-1 %
25	- Un indicador de pH con zona de viraje entre 6 y 8	0,001 %
	- un dispositivo para recoger los gases formados	

Todos estos medios se han de incubar a la temperatura óptima del crecimiento de la cepa objeto de estudio, si bien para los termófilos cuyo rango de temperaturas de crecimiento incluya temperaturas menores de 40°C es preferible incubarlos a esas temperaturas.

El pH final de los medios oscilará entre pH 5 y 6.5

En general, para facilitar el crecimiento de estas bacterias debe añadirse a todos los medios una solución que contenga vitaminas del grupo B, pantotenato, ácido nicotínico y/o vitamina C. Se pueden añadir a todos los medios infusiones de cerebro-corazón de 10-20% para aportar todos los nutrientes necesarios para estos microorganismos.

Asimismo se pueden añadir soluciones de sales minerales en cantidades traza que aporten potasio, fósforo, magnesio, calcio, cloruros, sodio, sulfatos, cobre, manganeso, zinc, cobalto, molibdeno y/o boro.

Por último se indica que los kits para llevar a cabo el procedimiento de la invención pueden presentarse en placas Petri, tubos, microtubos, microplacas o cualquier otro soporte miniaturizado o no.

A continuación, la invención es ilustrada por los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1

Se procede al aislamiento de colonias a partir de una muestra de yogur utilizando el método estándar de diluciones decimales seriadas sobre un medio selectivo para *Lactobacillus*. A continuación, se procede a sembrar una colonia aislada en una placa que contenga ese mismo medio. Se realiza una tinción de Gram (método estándar) para comprobar si se trata de un coco o un bacilo Gram positivo o Gram negativo. La prueba del Gram revela la presencia de un bacilo Gram positivo. Se hace una suspensión de una e varias colonias a partir del cultivo anterior en agua estéril hasta obtener una concentración celular aproximada de 10⁸ células/ml, se siembran 100 PLI de esta suspensión en cada uno de los tubos de la batería de identificación, se incuban los tubos en una estufa termostaticada a 28°C durante 24-48 h Finalmente se procede a la lectura de los resultados de acuerdo con los siguientes criterios:

Producción de ácido a partir de azúcares (los especificados en la patente):
positivo: amarillo negativo: rojo

ES 2 164 535 B1

Producción de gas a partir de glucosa:

positivo: gas en un dispositivo adecuado negativo: ausencia de gas en la campana Durham.

5 Crecimiento en alta concentración de cloruro sódico:

positivo: turbio negativo: transparente

Crecimiento a 45 y 50°C

10 positivo: turbio negativo: transparente

Hidrólisis de esculina

positivo: negro negativo: verde

15 Hidrólisis de hipurato. Se incuba y se añade cloruro férrico.

positivo: precipitado negativo: se redisuelve al agitar

Crecimiento en bilis al 40%

20 positivo: turbio negativo: sin turbidez

Catalasa: añadir agua oxigenada después de 48 de incubación

positivo: burbujas negativo: ausencia de burbujas

25 *Lactobacillus casei* se caracteriza por originar color amarillo (positivo en los tubos con los siguientes azúcares: amigdalina, fructosa, galactosa, glucosa, maltosa, manosa, melecitosa, ribosa, salicin, sacrosa y trealosa.

30 De acuerdo con las tablas oficiales que figuran en el Manual de Bergey de Bacteriología Determinativa de 1986 y 1994 se realiza el análisis de los resultados y la identificación de las especies.

Ejemplo 2

35 Se aíslan colonias a partir de una muestra de vino con picado láctico utilizando el método estándar de diluciones decimales seriadas sobre un medio selectivo para bacterias lácticas. La tinción Gram revela la presencia de un coco Gram positivo agrupado en pares o en cadenas. A continuación, se realiza una suspensión de una o varias colonias a partir del cultivo anterior en agua estéril hasta obtener una concentración celular aproximada de 10^8 células/ml. Se siembran 100 μ l de esta suspensión en cada uno de los tubos de la batería de identificación, se incuban los tubos en una estufa termostatzada a 28°C durante 40 28-48 h. Posteriormente, se observa la presencia de gas en el tubo de la glucosa lo que indica que se trata del género *Leuconostoc*. La presencia de color amarillo (positivo) en los tubos con los siguientes azúcares: trealosa y arabinosa y la hidrólisis de esculina positiva indican que se trata de la especie *Leuconostoc oenos*. Finalmente se procede al análisis de los resultados e identificación de las especies de acuerdo con las tablas oficiales que figuran en el Manual de Bergey de Bacteriología Determinativa de 1994.

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Kit para la identificación de cocos y bacilos Gram positivos y/o negativos que producen alteraciones de alimentos, bebidas, cosméticos o medicamentos presentes en muestras clínicas o veterinarias, de alimentos tanto de origen animal como vegetal, de agua, suelo, atmósferas y, en general, de cualquier tipo de muestras, **caracterizado** porque incluye, en combinación, la realización de las siguientes pruebas:

- catalasa
- hidrólisis de esculina
- 10 - hidrólisis de hipurato
- crecimiento en 6,5 % de NaCl
- crecimiento en bilis al 40 %
- 15 - crecimiento a 45 y 50i C
- producción de ácidos a partir de azúcares: sacarosa, maltosa, fructosa, L-arabinosa, manitol, lactosa, salicina, trealosa, melibiosa, xilosa, amigdalina, melecitosa, rafinosa, manosa, galactosa, acetato y DL-lactato
- 20 - producción de gas a partir de glucosa.

2. Procedimiento para la identificación de cocos y bacilos Gram positivos y/o negativos que producen alteraciones de alimentos, bebidas, cosméticos o medicamentos, mediante el kit descrito en la reivindicación 1, que comprende las etapas de:

- 25 (a) aislar las bacterias en un medio sólido en placas adecuado para su crecimiento a la temperatura y pH adecuados para cada cepa a aislar;
- (b) incubar el medio resultante;
- 30 (c) realizar una tinción de Gram y una tinción de esporas;
- (d) sembrar a partir de este medio, una colonia o suspensión de bacterias en los medios de cultivo adecuados para la realización de las pruebas deseadas; y
- 35 (e) identificar la bacteria aislada comparando los resultados de dichas pruebas con los de una base de datos patrones.

caracterizado porque los citados medios de cultivo y reactivos identificadores son los específicos para cada prueba.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque cuando los citados medios de cultivo son sólidos o semisólidos, se les añadirá 0,7-2 % de agar.

4. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque el conjunto de medios se incubará a diferentes temperaturas según la temperatura óptima de crecimiento de cada cepa bacteriana objeto de estudio.

5. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la fuente de nitrógeno orgánica asimilable por las bacterias se encuentra en unos límites de 0,1 - 1 %.

6. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la fuente de carbono asimilable por las bacterias se encuentra en unos límites de 0,4-1 %.

7. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque en el conjunto de medios de cultivo se emplean sales minerales que aporten potasio, fósforo, magnesio, calcio, cloruros, sodio, sulfatos, cobre, manganeso, zinc, cobalto, molibdeno y/o boro.

8. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizados** porque en el conjunto de medios se emplean vitaminas del grupo B, pantotenato y ácido nicotínico e infusiones de cerebro-corazón de 10-20 % para aportar todos los nutrientes necesarios para estos microorganismos.

9. Procedimiento según las reivindicaciones 2 a 8, **caracterizados** porque los conjuntos de medios o kits se presentan en placas Petri, tubos, microtubos, microplacas o cualquier otro soporte miniaturizado o no.



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C12Q 1/04

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	SNEATH et al. "Bergey's manual of Systematic Bacteriology", Baltimore (USA). Williams & Wilkings, 1986. Volumen 2, páginas 1114-1138.	1,2
Y	COLLINS C.H. et al. "Microbiological Methods", London. Butterworths, 1987. Páginas 98-100,105-113.	1,2

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

11.01.2002

Examinador

A. Collados Martín Posadillo

Página

1/1