



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 397**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/04 (2006.01)
C12Q 1/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07787282 .8**
96 Fecha de presentación : **10.07.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2041298**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2009**

54 Título: **Medio de cultivo sólido para la detección y/o la discriminación a nivel de la especie de los enterococos resistentes a los glicopéptidos.**

30 Prioridad: **10.07.2006 FR 06 06252**

73 Titular/es: **Alain Rambach**
73 bld Montparnasse
F-75006 Paris, FR

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.04.2011

72 Inventor/es: **Rambach, Alain**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.04.2011

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 356 397 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).

ES 2 356 397 T3

DESCRIPCIÓN

Medio de cultivo sólido para la detección y/o la discriminación a nivel de la especie de los enterococos resistentes a los glicopéptidos.

5 La presente invención se refiere al campo de la microbiología médica y clínica. Más particularmente, la invención se refiere a los medios que permiten detectar y/o discriminar unas especies bacterianas responsables de infecciones que, por ser resistentes a uno o varios antibióticos, requieren la adaptación de los tratamientos terapéuticos.

10 De manera más precisa, la presente invención se refiere a un medio de cultivo sólido para la detección y/o la discriminación, en los enterococos resistentes a los glicopéptidos, de los grupos de especies *E. faecalis* y/o *E. faecium* que pertenecen a los grupos de resistencia a los glicopéptidos VanA/VanB, y *E. gallinarum*/*E. casseliflavus* que pertenecen al grupo de resistencia a los glicopéptidos VanC, comprendiendo dicho medio, en un medio de cultivo selectivo para enterococos, por lo menos un sustrato cromógeno de la α -glucosidasa y por lo menos un activador de reacción coloreada seleccionado de entre el metil- α -glucósido y el glucosil- α -glucósido, o sus polímeros.

20 Unas cepas de enterococos resistentes a la vancomicina (VRE) y más ampliamente a los glicopéptidos, han sido aisladas por primera vez en clínica en los años 80. Desde entonces, la incidencia de los VRE en medio hospitalario no ha dejado de crecer. Estas bacterias son responsables generalmente de infecciones nosocomiales preocupantes para el personal médico. Además, la emergencia de VRE multi-resistentes, es decir unos enterococos resistentes no sólo a la vancomicina, sino también a uno o varios antibióticos no glicopeptídicos, representa una verdadera apuesta terapéutica para los clínicos. En efecto, la multiplicidad y la diseminación de los caracteres de resistencia entre cepas de enterococos han hecho que algunas de ellas sean invulnerables a las terapias estándares.

25 A diferencia de los mecanismos que confieren una resistencia a la mayoría de las familias de antibióticos, la resistencia a los glicopéptidos no depende del producto de un gen único sino que necesita la expresión regulada e interactiva de un conjunto de genes estrechamente asociados: los operones de resistencia a los glicopéptidos *van*.

30 En la actualidad, varios tipos (o grupos) de resistencia a los glicopéptidos han sido identificados en los enterococos, entre los cuales los tipos VanA (operón *vanA*), VanB (operón *VanB*) y VanC (operón *vanC*) son los que se encuentran con más frecuencia (véase la tabla I a continuación). Algunos de estos grupos de genes son transmisibles entre cepas bacterianas (se habla entonces de resistencia adquirida), mientras que otros son intrínsecos y no transmisibles (tabla I).

35 En definitiva, en el seno de los VRE, las especies de enterococos más frecuentes pueden ser repartidas generalmente en especies o grupos de especies asociados más específicamente a un tipo de resistencia a los glicopéptidos dado (Tabla I).

40 TABLA I

Tipo de resistencia a los glicopéptidos	Especies de enterococos	Origen de los genes de resistencia
VanA	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	adquirida
VanB	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	adquirida
VanC	<i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i>	intrínseca

60 Tal como lo muestra la tabla II a continuación, los tipos de resistencia a los glicopéptidos en los enterococos se distinguen no sólo por las secuencias genéticas responsables (secuencias de los operones *van*), su soporte (plasmídico o cromosómico) y los mecanismos de expresión y de regulación de la expresión utilizados (resistencia inducible o constitutiva), sino también por los niveles de resistencia a los glicopéptidos asociados.

65

ES 2 356 397 T3

TABLA II

Tipo de resistencia a los glicopéptidos	CMI	
	Vancomicina	Teicoplanina
VanA	64 -> 1024	16 -> 512
VanB	4 -> 1024	0,5 - 1
VanC	2 -> 32	0,5 - 1

CMI: concentración mínima inhibidora en mg/l

Con el fin de detectar y/o discriminar las bacterias, se utilizan comúnmente unos métodos basados en la búsqueda de caracteres o bien fenotípicos, o bien genotípicos. Varios de estos métodos pueden por otro lado ser combinados ventajosamente para aumentar el poder discriminatorio del análisis, mejorando la selectividad y/o la sensibilidad y/o la especificidad de la detección.

En el campo particular de la detección de los VRE, un método fenotípico conocido permite discriminar, mediante coloración específica, los cultivos de VRE VanC y los cultivos de VRE no-VanC (que no se colorean). Este método, realizado en medio líquido (tubo o pocillos), utiliza una acidificación del medio relacionada con la presencia de metil- α -glucósido. En este ensayo, el azúcar se utiliza a una concentración de 20 g/l, en presencia de un indicador de pH que sirve para revelar la acidificación del medio.

Sin embargo, el poder discriminatorio de este ensayo puede ser mejorado todavía, tanto en términos de selectividad como de especificidad, por un lado con el fin de eliminar los resultados falsos-positivos o falsos-negativos susceptibles de ser obtenidos, y por otro lado, con el fin de permitir la detección de los VRE a nivel de la especie, lo cual resulta imposible con el ensayo actual.

La patente FR 2 861 741 da a conocer un medio de cultivo para detectar un enterococo caracterizado porque comprende un agente reactivo cromógeno reductor que proporciona una coloración con *E. faecalis* pero no proporciona ninguna coloración con *E. faecium*.

Existe por lo tanto actualmente la necesidad de un ensayo de detección de los VRE encontrados con más frecuencia en clínica, que sea al mismo tiempo simple, rápido, sensible, selectivo, específico y fiable, para permitir la detección discriminante de los VRE a nivel de la especie y a nivel del tipo de resistencia a los glicopéptidos asociado.

Es precisamente a esta necesidad a la que responde la presente invención proponiendo unos medios fenotípicos que se pueden utilizar en medio sólido (en cajas) para la detección eficaz y discriminante de los VRE.

A este respecto, se observará que, tal como lo muestran el ejemplo y la tabla III a continuación, la técnica del ensayo en tubo del estado de la técnica, si se aplica tal cual en medio sólido, conduce sólo a una escasa coloración de las colonias, lo cual no permite por lo tanto discriminar o diferenciar los VRE.

Por otro lado, se muestra en este caso (véase la tabla III a continuación) que un sustrato cromógeno utilizado en medio sólido no permite, por sí solo, detectar los VRE de manera satisfactoria.

Los resultados indicados en el marco de la invención muestran que la combinación en tubo del metil- α -glucósido y de un indicador de pH no puede ser simplemente sustituida, en medio sólido, por un sustrato cromógeno de la α -glucosidasa, al contrario de lo que el experto en la materia podría sentir partiendo de la hipótesis probable de que la detección se realizaba mediante simple demostración de la presencia o de la ausencia del gen que codifica la enzima α -glucosidasa.

Además, la presente invención muestra que unas combinaciones diferentes de dos sustratos por lo menos de la α -glucosidasa, de los cuales uno es cromógeno, conducen, en medio sólido, a unos resultados totalmente inesperados en la medida en la que la coloración se invierte en función de los sustratos utilizados y de sus combinaciones. Se observará por otro lado que unos sustratos de la α -glucosidasa distintos de los descritos explícitamente a continuación, han sido ensayados, sin éxito, por el inventor. Por ejemplo, al contrario de la maltosa prevista a continuación, la trehalosa no permite obtener unos resultados interesantes en términos de detección y de diferenciación de las especies o grupos de especies de VRE (datos no mostrados).

Por último, los resultados obtenidos en el marco de la invención son no sólo sorprendentes e inesperados, sino también particularmente ventajosos puesto que permiten detectar de manera discriminante los VRE VanC con respecto

ES 2 356 397 T3

a los VRE VanA/VanB (y recíprocamente), o bien la especie *E. faecalis* o también la especie *E. faecium*, con respecto a las demás especies de VRE.

Así, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un medio de cultivo sólido para la detección y/o la discriminación de los grupos de especies de enterococos resistentes a los glicopéptidos:

- *E. faecalis* y/o *E. faecium*, que pertenecen a los grupos de resistencia a los glicopéptidos VanA/VanB; y
- *E. gallinarum*/*E. casseliflavus* que pertenecen al grupo de resistencia a los glicopéptidos VanC,

comprendiendo dicho medio, en un medio de cultivo selectivo para enterococos, por lo menos un sustrato cromógeno de la α -glucosidasa y por lo menos un activador de reacción coloreada seleccionado de entre el metil- α -glucósido o sus polímeros y el glucosil- α -glucósido o sus polímeros.

La utilización, en un medio sólido, de un sustrato cromógeno de la α -glucosidasa asociado a por lo menos un activador de reacción coloreada, tal como se ha descrito por primera vez en la presente memoria, presenta en particular la ventaja de permitir la elaboración de medios sólidos que posibilitan la diferenciación de las especies o grupos de especies de VRE a partir del aislamiento, sin tener que efectuar ensayos suplementarios.

Mediante la expresión “polímeros del metil- α -glucósido” se designan en la presente memoria los oligósidos y poliósidos adaptados a una utilización en un medio de cultivo bacteriano sólido y susceptibles de liberar, después de la ruptura de los enlaces osídicos (por ejemplo, mediante degradación enzimática), el metil- α -glucósido. Un ejemplo típico de dicho polímero es el metil- α -maltósido.

Mediante la expresión “polímeros del glucosil- α -glucósido” se designan en la presente memoria los oligósidos y poliósidos adaptados a una utilización en un medio de cultivo bacteriano sólido y susceptibles de liberar, después de la ruptura de los enlaces osídicos (por ejemplo, mediante degradación enzimática), el glucosil- α -glucósido, denominado más comúnmente maltosa.

Un “activador de reacción coloreada” es, en el sentido de la presente invención, un compuesto que tiene por función mejorar la calidad de la reacción observada. Este compuesto se selecciona de entre el metil- α -glucósido o sus polímeros y el glucosil- α -glucósido o sus polímeros. Tal como se desprende de los resultados detallados en la tabla III (véase el ejemplo a continuación), la presencia de por lo menos un activador de reacción coloreada en el medio de cultivo sólido según la presente invención es esencial para detectar de manera discriminante las especies o grupos de especies de VRE.

La presente invención posibilita así la detección y, ventajosamente, la identificación a nivel de la especie o del grupo de especies, de una colonia coloreada de VRE, incluso en presencia de millares de otras colonias susceptibles de desarrollarse en el medio selectivo sólido objeto de la invención. En realidad, las colonias de VRE detectadas por el medio de la invención se colorean con un cierto color mientras que los demás microorganismos aparecen de colores diferentes o son incoloros.

Además, la detección de las colonias de VRE es, en el marco de la presente invención, directa en el sentido de que no necesita ningún acto o intervención, tal como la utilización de un revelador cualquiera o la de una luz particular, posteriormente al cultivo de las bacterias.

Según un modo de realización, el medio de cultivo objeto de la presente invención comprende por lo menos un sustrato cromógeno de la α -glucosidasa y del metil- α -glucósido o uno de sus polímeros, utilizado a título de activador de reacción coloreada a una concentración de por lo menos 10 g/l aproximadamente, para la detección y/o la discriminación por coloración de las especies *E. gallinarum*/*E. casseliflavus* que pertenecen al grupo de resistencia a los glicopéptidos VanC. En estas condiciones, es gracias a la coloración bien particular y específica de las colonias de *E. gallinarum*/*E. casseliflavus* que es posible la diferenciación. Este color, aportado por el sustrato cromógeno, sólo afectará a las colonias de *E. gallinarum*/*E. casseliflavus*, de lo cual se desprende la noción de especificidad de la coloración.

De manera preferida, la concentración del metil- α -glucósido en el medio es de por lo menos 20 g/l aproximadamente. Más preferentemente, esta concentración es de 20 g/l aproximadamente.

Según otro modo de realización, el medio de cultivo de la invención comprende por lo menos un sustrato cromógeno de la α -glucosidasa y el glucosil- α -glucósido (maltosa) o uno de sus polímeros, utilizado a título de activador de reacción coloreada a una concentración de por lo menos 0,1 g/l aproximadamente, para la detección y/o la discriminación por coloración de la especie *E. faecalis* que pertenece a los grupos de resistencia a los glicopéptidos VanA/VanB. En este caso, sólo las colonias de las cepas de la especie *E. faecalis* son del color aportado por el sustrato cromógeno en la cajas.

De manera preferida, la concentración de la maltosa, en el medio es de por lo menos 0,2 g/l aproximadamente. Más preferentemente, esta concentración es de 0,2 g/l aproximadamente.

ES 2 356 397 T3

Según todavía otro modo de realización, el medio de cultivo de la invención comprende por lo menos un sustrato cromógeno de la α -glucosidasa y, a título de activadores de reacción coloreada, el metil- α -glucósido o uno de sus polímeros, utilizado a una concentración de por lo menos 10 g/l aproximadamente, y el glucosil- α -glucósido o uno de sus polímeros, utilizado a una concentración de por lo menos 0,1 g/l aproximadamente, para la detección y/o la discriminación por la ausencia de coloración de la especie *E. faecium* que pertenece a los grupos de resistencia a los glicopéptidos VanA/VanB. En este caso, las colonias de las cepas de las especies *E. faecalis* y *E. gallinarum*/*E. casseliflavus* se colorean gracias al sustrato cromógeno en las cajas. Sólo las colonias de las cepas de *E. faecium* no se colorean gracias a este sustrato, lo cual permite una diferenciación cualificada de diferenciación “por falta de coloración”, es decir por ausencia de la coloración aportada por el sustrato cromógeno, entendiéndose que las colonias de *E. faecium* podrán aparecer de un color diferente si se añade uno o varios componentes colorantes en el medio.

De manera preferida, las concentraciones del metil- α -glucósido y de la maltosa en el medio son respectivamente de por lo menos 20 g/l aproximadamente y de por lo menos 0,2 g/l aproximadamente. Más preferentemente, estas concentraciones son respectivamente de 20 g/l aproximadamente y 0,2 g/l aproximadamente.

Así, según los modos de realización utilizados, el medio de cultivo objeto de la invención permite discriminar fácilmente una especie o un grupo de especies de VRE, mediante simple coloración o coloración diferente o también ausencia de coloración de las colonias presentes en el medio de cultivo sólido.

El “medio de cultivo selectivo para enterococos” comprende diversos factores selectivos para enterococos, bien conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, unos inhibidores de las bacterias de Gram negativo permiten mejorar las propiedades del medio de cultivo y aislar más fácilmente los enterococos (bacterias de Gram positivo).

Además, puede ser interesante, con el fin de optimizar los resultados proporcionados por el medio de cultivo según la invención, añadir unos factores conocidos como selectivos para VRE; estos factores permitirán obtener un medio de cultivo sólido específico para VRE. Preferentemente, dicho medio selectivo y específico para VRE comprende por lo menos un antibiótico glicopeptídico.

En un modo de realización, dicho antibiótico glicopeptídico se selecciona de entre la vancomicina, la teicoplanina, y sus combinaciones.

Ventajosamente, la vancomicina se utiliza a una concentración comprendida entre 2 y 15 mg/l aproximadamente, preferentemente a una concentración comprendida entre 3 y 9 mg/l aproximadamente, más preferentemente a una concentración comprendida entre 4 y 8 mg/l aproximadamente, con un valor particularmente preferido de 6 mg/l aproximadamente.

La teicoplanina se utiliza a una concentración comprendida entre 0,5 y 16 mg/l aproximadamente, preferentemente a una concentración comprendida entre 1 y 10 mg/l aproximadamente, más preferentemente a una concentración comprendida entre 2 y 8 mg/l aproximadamente, con un valor particularmente preferido de 5 mg/l aproximadamente.

Evidentemente, el experto en la materia es capaz de determinar en cualquier caso y, si es necesario, ensayar las concentraciones o gamas de concentraciones del o de los glicopéptidos(s) apropiadas para realizar la presente invención (según sus conocimientos generales, buscando en la bibliografía y/o basándose en la tabla II anterior).

El agente cromógeno sustrato de la α -glucosidasa comprende preferentemente un cromóforo precipitable, que se libera mediante la hidrólisis del sustrato por su enzima. Así, la colonia bacteriana se colorea en función del cromóforo liberado. Siendo el cromóforo liberado sólido en el medio de cultivo, permanece por lo tanto localizado a nivel de la colonia en la que se ha liberado.

De manera preferida, dicho cromóforo se selecciona de entre los derivados indoxilo, halógeno-indoxilo (bromo-indoxilo, cloro-indoxilo, fluoro-indoxilo, yodo-indoxilo, dicloro-indoxilo, cloro-bromo-indoxilo, tri-cloro-indoxilo), el metil-indoxilo, o hidroxiquinolina. Unos derivados particularmente preferidos se seleccionan de entre los derivados siguientes: 6-cloro-indoxilo, 5-bromo-indoxilo, 3-bromo-indoxilo, 6-fluoro-indoxilo, 5-yodo-indoxilo, 4,6-dicloro-indoxilo, 6,7-dicloro-indoxilo, 5-bromo-4-cloro-indoxilo, 5-bromo-6-cloro-indoxilo, 4,6,7-tricloro-indoxilo, N-metil-indoxilo y 8-hidroxiquinolina.

Más preferentemente, el sustrato cromógeno de la α -glucosidasa es un 5-bromo-4-cloro-indoxil- α -glucósido.

El sustrato cromógeno se utiliza típicamente a una concentración comprendida entre 0,01 y 0,5 g/l aproximadamente. Una concentración preferida se sitúa a 0,1 g/l aproximadamente.

Se precisa que el sustrato cromógeno presente en el medio de cultivo según la presente invención puede ser sustituido por lo menos por un sustrato fluorógeno, o ser asociado al mismo. Este sustrato está formado por el acoplamiento de un sustrato de la α -glucosidasa con un fluoróforo tal como el 4-metil-umbeliferilo.

ES 2 356 397 T3

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a la utilización de un medio de cultivo tal como se ha definido anteriormente, para la detección y/o la discriminación de los grupos de especies de enterococos resistentes a los glicopéptidos:

- 5 - *E. faecalis* y/o *E. faecium*, que pertenecen a los grupos de resistencia a los glicopéptidos VanA/VanB; y
- *E. gallinarum*/*E. casseliflavus*, que pertenecen al grupo de resistencia a los glicopéptidos VanC.

10 Un tercer aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de detección y/o de discriminación, en una muestra, de los grupos de especies de enterococos resistentes a los glicopéptidos:

- *E. faecalis* y/o *E. faecium*, que pertenecen a los grupos de resistencia a los glicopéptidos VanA/VanB; y
- 15 - *E. gallinarum*/*E. casseliflavus*, que pertenecen al grupo de resistencia a los glicopéptidos VanC.

caracterizado porque comprende por lo menos las etapas siguientes:

- 20 a) la inoculación de un medio de cultivo tal como se ha definido anteriormente, con dicha muestra o un inóculo derivado de ésta;
- b) la detección, sobre dicho medio de cultivo, de la presencia de grupos de especies de enterococos resistentes a los glicopéptidos *E. faecalis*/*E. faecium*, y *E. gallinarum*/*E. casseliflavus*; y
- 25 c) de manera opcional, la diferenciación de las especies *E. faecalis*/*E. faecium*, y/o *E. gallinarum*/*E. casseliflavus*, de los demás microorganismos presentes sobre dicho medio de cultivo.

30 La utilización del medio de cultivo según la invención puede ser ventajosamente precedida de una etapa de enriquecimiento realizada con la ayuda de métodos conocidos por el experto en la materia. Se puede utilizar en particular agua peptonada alcalina a 1 g % de NaCl (pH 8,6), o agua peptonada alcalina a 3 g % de NaCl.

35 El objeto de la presente invención no está limitado a la descripción anterior. Otros modos de realización y ventajas de la presente invención se podrán desprender del ejemplo siguiente, proporcionado a título totalmente ilustrativo. Resulta evidente que ni el objeto ni el alcance de la presente invención están limitados por este ejemplo.

Ejemplo

40 a) *Base del medio de cultivo sólido (en g/l):*

- Peptona 10
- Extracto de levadura 5
- 45 - Agar 15

50 b) *Glicopéptidos*

Se han realizado varias series de experimentos: algunas series han sido realizadas en un medio selectivo para enterococos (desprovisto de glicopéptidos), y otras en un medio selectivo para VRE, que contiene 6 mg/l de vancomicina. Los resultados indicados en la tabla III siguientes reflejan los resultados medios obtenidos en el conjunto de las series.

55 c) *Otros ingredientes (en g/l):*

Véase la tabla III a continuación.

60 X- α -glucósido: sustrato cromógeno de la α -glucosidasa.

Los resultados indicados en la tabla III siguiente han sido obtenidos después de la inoculación de las bacterias en los medios de cultivo indicados, seguida en todos los casos de una incubación de 24 horas aproximadamente a 37°C aproximadamente.

65

Tabla III

CONTROL EN TUBO	SUSTRATO(S) DE LA α-GLUCOSIDASA PRESENTE(S) EN EL MEDIO	VanA/VanB		VanC		RESULTADOS
		<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. gallinarum</i>	
ENSAYOS SOBRE CAJAS	Técnica conocida	-	-	+/-	+	Detección discriminante de los VanC contra los VanC
	Extensión de la técnica conocida	+	+	+	+	Ninguna discriminación ni entre las especies ni entre los grupos de resistencia
	Metil-α-glucósido 20 g/l + indicador pH	-	-	-	-	Discriminación mediocre o nula, sobre todo para las cepas de crecimiento difícil
	X-α-glucósido 0,1 g/l	-	+/-	-	-	Discriminación mediocre, incluso nula, entre las especies entre los grupos de resistencia
	X-α-glucósido 0,1 g/l	-	++	-	-	Detección discriminante de la especie <i>E. faecalis</i>
	Glucosil-α-glucósido (maltosa) 0,2 g/l	-	-/+	-	-	Discriminación mediocre, incluso nula, entre las especies entre los grupos de resistencia
	Metil-α-glucósido 0,1 g/l	-	+/-	++	+	Detección de los VanC pero no suficientemente discriminante
	X-α-glucósido 0,1 g/l	-	-	+	+	Detección discriminante de los VanC contra los no VanC
	Metil-α-glucósido 20 g/l	-	++	++	+	Detección discriminante de la especie <i>E. faecium</i>
	X-α-glucósido 0,1 g/l	-	-	-	-	
	Glucosil-α-glucósido (maltosa) 0,2 g/l	-	-	-	-	

+: intensidad de la coloración
-: ninguna coloración

REIVINDICACIONES

5 1. Medio de cultivo sólido para la detección y/o la discriminación de los grupos de especies de enterococos resis-
tentes a los glicopéptidos:

- *E. faecalis* y/o *E. faecium*, que pertenecen a los grupos de resistencia a los glicopéptidos VanA/VanB; y
- *E. gallinarum*/*E. casseliflavus* que pertenecen al grupo de resistencia a los glicopéptidos VanC,

10 comprendiendo dicho medio, en un medio de cultivo selectivo para enterococos, por lo menos un sustrato cromó-
geno de la α -glucosidasa y por lo menos un activador de reacción coloreada seleccionado de entre el metil- α -glucósido
o sus polímeros y el glucosil- α -glucósido o sus polímeros.

15 2. Medio de cultivo según la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende por lo menos un sustrato cromó-
geno de la α -glucosidasa y el metil- α -glucósido o uno de sus polímeros, utilizado a una concentración de por lo menos
10 g/l aproximadamente, para la detección y/o la discriminación de las especies *E. gallinarum*/*E. casseliflavus* que
pertenecen al grupo de resistencia a los glicopéptidos VanC.

20 3. Medio de cultivo según la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende por lo menos un sustrato cromó-
geno de la α -glucosidasa y el glucosil- α -glucósido o uno de sus polímeros, utilizado a una concentración de por lo
menos 0,1 g/l aproximadamente, para la detección y/o la discriminación de la especie *E. faecalis* que pertenece a los
grupos de resistencia a los glicopéptidos VanA/VanB.

25 4. Medio de cultivo según la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende por lo menos un sustrato cromó-
geno de la α -glucosidasa, el metil- α -glucósido o uno de sus polímeros, utilizado a una concentración de por lo menos
10 g/l aproximadamente, y el glucosil- α -glucósido o uno de sus polímeros, utilizado a una concentración de por lo
menos 0,1 g/l aproximadamente, para la detección y/o la discriminación de la especie *E. faecium* que pertenece a los
30 grupos de resistencia a los glicopéptidos VanA/VanB.

5. Medio de cultivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque dicho medio de cultivo
selectivo para enterococos es un medio selectivo para enterococos resistentes a los glicopéptidos que comprende por
lo menos un antibiótico glicopeptídico.

35 6. Medio de cultivo según la reivindicación 5, **caracterizado** porque dicho antibiótico glicopeptídico se selecciona
de entre la vancomicina, la teicoplanina, y sus combinaciones.

40 7. Medio de cultivo según la reivindicación 6, **caracterizado** porque la vancomicina se utiliza a una concentración
comprendida entre 2 y 15 mg/l aproximadamente, preferentemente a una concentración comprendida entre 3 y 9 mg/l
aproximadamente, más preferentemente a una concentración comprendida entre 4 y 8 mg/l aproximadamente, con un
valor particularmente preferido de 6 mg/l aproximadamente.

45 8. Medio de cultivo según la reivindicación 6, **caracterizado** porque la teicoplanina se utiliza a una concentración
comprendida entre 0,5 y 16 mg/l aproximadamente, preferentemente a una concentración comprendida entre 1 y 10
mg/l aproximadamente, más preferentemente a una concentración comprendida entre 2 y 8 mg/l aproximadamente,
con un valor particularmente preferido de 5 mg/l aproximadamente.

50 9. Medio de cultivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque dicho sustrato cro-
mógeno libera, mediante hidrólisis, un cromóforo precipitable seleccionado de entre los derivados indoxilo, haló-
geno-indoxilo (bromo-indoxilo, cloro-indoxilo, fluoro-indoxilo, yodo-indoxilo, dicloro-indoxilo, cloro-bromo-indo-
xilo, tri-cloro-indoxilo), metil-indoxilo, o hidroxiquinolona en particular los derivados siguientes: 6-cloro-indoxi-
lo, 5-bromo-indoxilo, 3-bromo-indoxilo, 6-fluoro-indoxilo, 5-yodo-indoxilo, 4,6-dicloro-indoxilo, 6,7-dicloro-indoxi-
lo, 5-bromo-4-cloro-indoxilo, 5-bromo-6-cloro-indoxilo, 4,6,7-tricloro-indoxilo, N-metil-indoxilo y 8-hidroxiquino-
lina.

10. Medio de cultivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque dicho sustrato cromó-
geno de la α -glucosidasa es un 5-bromo-4-cloro-indoxil- α -glucósido.

60 11. Utilización de un medio de cultivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la detección y/o la
discriminación de los grupos de especies de enterococos resistentes a los glicopéptidos:

- *E. faecalis* y/o *E. faecium*, que pertenecen a los grupos de resistencia a los glicopéptidos VanA/VanB; y
- *E. gallinarum*/*E. casseliflavus* que pertenecen al grupo de resistencia a los glicopéptidos VanC.

65

ES 2 356 397 T3

12. Procedimiento de detección y/o de discriminación, en una muestra, de los grupos de especies de enterococos resistentes a los glicopéptidos:

- *E. faecalis* y/o *E. faecium*, que pertenecen a los grupos de resistencia a los glicopéptidos VanA/VanB; y
- *E. gallinarum*/*E. casseliflavus*, que pertenecen al grupo de resistencia a los glicopéptidos VanC.

caracterizado porque comprende por lo menos las etapas siguientes:

- a) la inoculación de un medio de cultivo tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, con dicha muestra o un inóculo derivado de ésta;
- b) la detección, sobre dicho medio de cultivo, de la presencia de grupos de especies de enterococos resistentes a los glicopéptidos *E. faecalis*/*E. faecium*, y *E. gallinarum*/*E. casseliflavus*; y
- c) de manera opcional, la diferenciación de las especies *E. faecalis*/*E. faecium*, y/o *E. gallinarum*/*E. casseliflavus*, de los demás microorganismos presentes sobre dicho medio de cultivo.