

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 385**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09175436 .6**
96 Fecha de presentación: **09.11.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2186906**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.05.2010**

54 Título: **Medio para detectar y diferenciar enterococos resistentes a la vancomicina**

30 Prioridad:
07.11.2008 GB 0820398
15.12.2008 GB 0822764

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.10.2012

73 Titular/es:
OXOID LIMITED
WADE ROAD
BASINGSTOKE HAMPSHIRE RG24 8PW, GB

72 Inventor/es:
Klein, Dagmara y
Dimmer, Stephen

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 388 385 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 para detectar y diferenciar enterococos resistentes a la vancomicina.

La presente invención se refiere a un medio para el crecimiento y/o la identificación de microorganismos y a un método de identificación de microorganismos mediante el uso del mismo. Más concretamente, la presente invención se refiere a un medio para detectar y diferenciar cepas bacterianas distintas, que es particularmente aplicable - pero no está de ningún modo limitado - a medios para detectar y diferenciar distintas cepas de enterococos resistentes a la vancomicina y a métodos para su diferenciación e identificación.

La detección e identificación de microorganismos es muy importante en varios campos, tales como la diagnosis de enfermedades infecciosas, el rastreo de brotes de enfermedad o de contaminación, y la detección y rastreo de la propagación de la resistencia a los antibióticos, etc.

En los últimos años se han establecido muchos métodos de detección e identificación de microorganismos, usando técnicas sofisticadas tales como la PCR y análogas. Aunque estos métodos pueden ser muy rápidos y sensibles, todavía hay necesidad de métodos más tradicionales que implican el cultivo de organismos en medios (sólidos, especialmente). Estos métodos tradicionales tienen la gran ventaja de que aíslan los organismos interesantes en forma viable y luego pueden subcultivarse en otros medios y/o analizarse.

En humanos y en muchos otros mamíferos suele haber enterococos en la cavidad oral y en el tracto gastrointestinal, aunque normalmente en concentraciones inferiores a las de la *E. coli*. Los enterococos crecen a menudo como pares de cadenas y en cultivo pueden prosperar en presencia de sales biliares o de azida sódica a concentraciones que inhiben las bacterias coliformes y muchas bacterias Gram-negativas. Los enterococos han presentado con frecuencia resistencia a ciertos antibióticos, incluyendo la penicilina y los aminoglicósidos, siendo la vancomicina, un antibiótico glicopeptídico, el antibiótico elegido para tratar pacientes con infecciones enterocócicas.

En las dos últimas décadas se ha incrementado la resistencia adquirida a los glicopéptidos en las poblaciones de enterococos. En particular los enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) se han relacionado con elevadas tasas de mortalidad y son una forma común de infección en las unidades hospitalarias de cuidados intensivos. En concreto, la resistencia adquirida, codificada por genes *vanA* o *vanB*, se considera una seria amenaza para la salud, ya que estos genes pueden transferirse mediante plásmidos y transposones a otras bacterias patógenas, incluyendo los estafilococos. La resistencia adquirida está asociada con *E. faecalis* y *E. faecium*, mientras que *E. casseliflavus* y *E. gallinarum* expresan en general un tipo de resistencia no transferible o intrínseca codificada por genes *vanC*. Por otra parte el *E. faecalis* y el *E. faecium*, ya sean sensibles o resistentes a la vancomicina, muestran diferencias de sensibilidad a otros antibióticos. Por consiguiente la detección de enterococos y la diferenciación de especies es importante para determinar las terapias de tratamiento y control de infecciones con antibióticos.

Para detectar ERV se han desarrollado varios medios de cultivo. Uno de estos medios es agar bilis esculina con vancomicina (BEAv). Los enterococos hidrolizan el glicósido, esculina, formando dextrosa y esculitina. La esculitina reacciona en el medio con citrato férrico o con otros iones ferrosos, formando un anillo marrón oscuro o negro de compuestos fenólicos alrededor de cada colonia. Se añaden sales biliares para inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas (distintas de los estreptococos del grupo D) y se incluye azida sódica para inhibir el crecimiento de bacterias Gram-negativas. El BEAv permite detectar enterococos pero no diferenciar especies, ya que todos los enterococos son capaces de hidrolizar esculina.

Por tanto se conocen medios para cultivar y detectar enterococos en general y también para detectar enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) en particular. No obstante los ERV suelen crecer poco en estos medios y las colonias resultantes son pequeñas y pueden tardar 48 horas o más en desarrollarse.

Además la mayoría de medios conocidos no distingue entre especies. Casi todo el estado técnico anterior revela substratos que utilizan sustancialmente todas las especies de enterococos. La distinción de especies es importante por varias razones. En primer lugar el *E. gallinarum* y el *E. casseliflavus* tienen en general una forma no transmisible de resistencia a la vancomicina (codificada por el gen *vanC*) que es de poca importancia clínica, mientras que, en cambio, el *E. faecium* y el *E. faecalis* tienen en general una forma transmisible de resistencia que es capaz de pasar a otros patógenos más agresivos, como los estafilococos. En segundo lugar el *E. faecium* y el *E. faecalis* difieren en su sensibilidad a otros antibióticos (cuando la vancomicina deja de ser una opción debido a su resistencia) y por tanto, para tratar eficazmente un paciente y detener la propagación de ERV es importante distinguir entre estas dos especies, a fin de determinar la terapia antibiótica apropiada.

La patente U.S. nº 5,620,865, de Chen y otros, revela un medio para cultivar y detectar enterococos en 24 horas. El medio está basado en una fórmula que comprende un indicador de nutrientes, el cual libera un segmento de nutriente en presencia de enzima β -glucosidasa, que es universal para todas las especies de enterococos y por lo tanto no permite identificarlas.

La patente U.S. 6,355,449, de Chen y otros, revela un medio, calificado como mejorado, para detectar la presencia de ERV, que comprende vancomicina, uno o más agentes selectivos para suprimir el crecimiento de hongos y bacterias no deseados, un primer indicador de nutrientes que proporciona una primera señal detectable cuando es

- partido por una β -glucosidasa y un segundo indicador de nutrientes que produce una molécula intermedia cuando es partido por pirrolidonil arilamidasa, de modo que la molécula intermedia proporciona una segunda señal detectable al reaccionar con un agente revelador. Como alternativa el segundo indicador de nutrientes puede proporcionar una segunda señal detectable al ser partido por pirrolidonil arilamidasa. Como la β -glucosidasa es común a todas las especies de enterococos y por tanto también está presente en otras varias bacterias, incluyendo *Listeria*, *Klebsiella*, y *Enterobacter*, se emplea un segundo enzima común a los enterococos para aumentar la probabilidad de que todos los microorganismos identificados sean enterococos. Sin embargo el empleo de dos enzimas diferentes revelado por Chen y otros no distingue entre especies de ERV.
- La patente US-5,536,645 revela un medio nutritivo esencialmente sintético para microorganismos.
- La patente US-5,786,167 revela un medio de cultivo y un método para distinguir bacterias de la especie *Salmonella* de otras bacterias gram-negativas.
- El International Journal of Food Microbiology [*Revista internacional de microbiología alimentaria*] (volumen 88, nº 2-3, (2003) p. 147-164) revela métodos para aislar, contar, caracterizar e identificar especies de enterococos, incluyendo medios de separación y recuento.
- La revista Clinical infectious Diseases [*Enfermedades infecciosas clínicas*] 2006:42 (suplemento 1) S25-S34 revela la resistencia a la vancomicina en cocos gram-positivos, incluyendo el mecanismo de resistencia.
- Un producto comercial para cultivar ERV se suministra con la marca CHROMagar[®] medium VRE (de CHROMagar Microbiology, París, Francia). El medio emplea dos substratos cromógenos y es capaz de distinguir *E. faecalis* y *E. faecium* de *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*, pero no *E. faecalis* de *E. faecium*.
- Otro producto comercial, el chromID[®] VRE (de bioMérieux, Francia), es un medio nutriente sólido que comprende vancomicina (8 mg/l) y dos substratos cromógenos, uno hidrolizado por α -glucosidasa y otro por β -galactosidasa, y es teóricamente capaz de distinguir entre *E. faecalis* y *E. faecium*. Sin embargo a las 24 horas la mayor parte de las colonias son pequeñas y difíciles de observar visualmente, si la muestra original solo contenía un pequeño número de enterococos. Además el crecimiento de ERV a partir de genes vanB es escaso debido a la alta concentración de (8 mg/l). Como el vanB produce una forma transmisible de resistencia a la vancomicina, es importante poder cultivar ERV vanB. Además el color de las colonias de *E. faecalis* cultivadas en este medio es con frecuencia inconsistente, lo cual aumenta el riesgo de falsa identificación. Se supone que el *E. faecalis* produce un color verde azulado, pero en la práctica no es constante. Asimismo se ha observado un incremento del crecimiento de ciertas levaduras, lo cual puede dar lugar a falsas interpretaciones positivas.
- Para detectar genes de resistencia a la vancomicina se dispone de métodos moleculares tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la tecnología de sondas de ciclación. Estos métodos proporcionan un alto nivel de sensibilidad y especificidad, y un menor tiempo de respuesta en comparación con el cultivo rutinario. Sin embargo, a menudo solo detectan los genes van y no proporcionan una identificación a nivel de especies. Además muchos laboratorios no tienen recursos, capacitación o un volumen que justifique la realización de procedimientos tan caros y complejos. Por otra parte la PCR no sería aplicable directamente en el caso de una típica muestra de paciente que contuviera una población mixta de microorganismos, sobre todo si el microorganismo diana estuviera en pequeñas cantidades. Por lo tanto puede ser necesario el cultivo previo de muestras para enriquecer y/o aislar determinados microorganismos, antes de emprender ensayos de PCR.
- La identificación (ID) a nivel de especies se puede conseguir utilizando un sistema ID comercial automatizado o manual, aunque se ha observado que algunos de los sistemas comerciales no siempre son capaces de identificar con precisión el *E. faecium*. Todos estos sistemas requieren un aislado puro y obtener una identificación definitiva puede tardar hasta 24 horas.
- Los métodos existentes de detección e identificación de ERV a nivel de especies requieren un aislado puro y/o múltiples ensayos. Por consiguiente es deseable un método para distinguir especies de enterococos, más que una identificación a nivel genérico, a partir de la muestra original del paciente.
- Por tanto hay la necesidad largamente percibida en la industria de proporcionar un medio capaz de distinguir entre especies de enterococos y dar resultados consistentes y fáciles de interpretar en un plazo máximo de 24 horas.
- Tradicionalmente la mayor parte de las formulaciones de medios de cultivo ha sido sustancialmente transparente debido a los ingredientes que las componen. Recientemente se ha hecho cada vez más popular el uso de medios que contienen substratos cromógenos o fluorogénicos susceptibles de ser hidrolizados por determinados enzimas característicos de ciertos microorganismos y que por tanto son útiles para identificar microorganismos, incluyendo bacterias, levaduras y hongos. Se describen ejemplos de tales medios en las patentes US 5,534,415, US 5,635,367, US 5,846,761, US 5,962,251, US 6,165,743, US 6,905,841, US 7,217,536 y US 7,351,548, cuyo texto se incorpora totalmente en la presente y se considera parte integrante de esta revelación.
- El uso de medios cromógenos (o fluorogénicos) requiere mayor contraste de color entre las colonias y el fondo del medio. Muchos fabricantes de medios de cultivo cromógenos (o fluorogénicos) han empezado a añadir agentes tales

como caolín o dióxido de titanio, para aumentar la opacidad de los medios y el contraste con las colonias de color, facilitando así su detección. La mejor detección e identificación de las colonias reduce el riesgo de falso diagnóstico.

No obstante, aunque la adición de agentes opacantes mejora la utilidad de los medios que contienen sustratos cromógenos (o fluorogénicos), el uso de un medio opaco oculta la información escrita, impresa o aplicada de otro modo al fondo de la placa de cultivo. A menudo esta información es necesaria para la identificación apropiada del cultivo y hay que mover la placa de cultivo a una posición que permita leer o detectar de otro modo la información, pues la opacidad del medio impide la lectura exacta u otra detección óptica a través del mismo. La manipulación extra de las placas de cultivo requiere tiempo y existe el riesgo de que el cultivo caiga o se altere. Es importante el acceso a la información porque, si se detecta mejor, disminuye el riesgo de identificación errónea y de cualquier otra confusión.

Los términos “sustrato cromógeno” y “sustrato fluorogénico” son bien conocidos de los expertos en la materia y se refieren a compuestos químicos que son divididos por unos enzimas producidos por algunas bacterias y que como resultado de esta división dan color o fluorescencia a ciertas colonias bacterianas.

Según un primer aspecto de la presente invención se propone un medio para el cultivo de enterococos resistentes a la vancomicina que comprende:

- (i) un medio nutritivo con una fuente energética efectiva para sustentar el crecimiento y la reproducción de los enterococos resistentes a la vancomicina;
- (ii) una cantidad efectiva de uno o más agentes selectivos para inhibir el crecimiento de los microorganismos diferentes de los enterococos resistentes a la vancomicina, de manera que dichos agentes selectivos incluyan al menos un antibiótico glicopeptídico;
- (iii) un intermedio del ciclo de Krebs, de manera que incluya un ácido α -cetoglutárico y/o sales del mismo, que el medio contenga adicionalmente un primer sustrato cromógeno con un grupo fosfato - como sustrato para una enzima fosfatasa producido por una primera especie de enterococo resistente a la vancomicina - y que dicho primer sustrato cromógeno produzca una primera señal detectable en presencia de dicha primera especie de enterococo resistente a la vancomicina.

También se describe aquí un medio para el cultivo de enterococos resistentes a la vancomicina que comprende:

- (i) un medio nutritivo con una fuente energética efectiva para sustentar el crecimiento y la reproducción de los enterococos resistentes a la vancomicina;
- (ii) una cantidad efectiva de uno o más agentes selectivos para inhibir el crecimiento de los microorganismos diferentes de los enterococos resistentes a la vancomicina;
- (iii) un intermedio del ciclo de Krebs.

La incorporación de un intermedio del ciclo de Krebs estimula de tal modo el crecimiento de enterococos resistentes a la vancomicina, que en 24 horas o menos se pueden obtener resultados significativos. El medio comprende un intermedio del ciclo de Krebs que incluye un ácido α -cetoglutárico y/o sales del mismo. También se describen aquí intermedios del ciclo de Krebs seleccionados de uno o más de los grupos formados por:

- derivados de ácido α -cetoglutárico;
- ácido D-isocítrico y sales y derivados del mismo;
- ácido cítrico y sales y derivados del mismo;
- ácido oxalacético y sales y derivados del mismo;
- ácido málico y sales y derivados del mismo;
- ácido fumárico y sales y derivados del mismo;
- ácido succínico y sales y derivados del mismo;
- ácido cis-aconítico y sales y derivados del mismo; y
- succinil-CoA

En este contexto el término derivado incluye cualquier compuesto químico que comprenda los principales elementos estructurales del compuesto original y que se transforme en el deseado intermedio del ciclo de Krebs en el medio nutritivo o en presencia del microorganismo. Tales derivados incluyen, por ejemplo, ésteres de alquilo inferiores que son desesterificados por estererasas presentes en el medio o en el microorganismo.

- 5 El medio contiene el intermedio del ciclo de Krebs ácido α -cetoglutárico y/o sales del mismo. También se describen aquí derivados y precursores de ácido α -cetoglutárico. Los precursores de ácido α -cetoglutárico incluyen el ácido pirúvico y sales y derivados del mismo, acetil-CoA, el ácido cis-aconítico y sales y derivados del mismo, y el ácido D-isocitrónico y sales y derivados del mismo. Se ha encontrado que el α -cetoglutarato es un intermedio particularmente efectivo para estimular el crecimiento de los enterococos resistentes a la vancomicina.
- 10 La inclusión de uno o más intermediarios del ciclo de Krebs, tales como el ácido α -cetoglutárico y las sales o derivados del mismo, mejora la respuesta del cultivo, actuando como un promotor del crecimiento. Como resultado se forman colonias más grandes a las 24 horas, lo cual mejora la identificación de la presencia de colonias bacterianas. El uso de intermediarios del ciclo de Krebs como promotores de crecimiento no ha sido revelado antes para microorganismos enterocócicos. Al mejorar la detección de los enterococos, cualquier intervención clínica necesaria se puede llevar a cabo más rápidamente.
- 15 Además el medio incluye preferiblemente un agente opacante, que es preferentemente caolín o dióxido de titanio y está presente en un intervalo de concentración de 0,1 g – 5 g/l de medio.
- El agente selectivo incluye al menos un antibiótico glicopeptídico. Los antibióticos glicopeptídicos comprenden la vancomicina y la teicoplanina.
- Además el medio comprende preferiblemente un agente selectivo elegido de uno o más de los grupos formados por:
- un compuesto antifúngico;
 - aztreonam;
 - eritromicina;
 - 20 poliximina B y sales de la misma;
 - cefoxitina;
 - anfotericina B.
- 25 El uso de un antibiótico glicopeptídico evita el crecimiento de microorganismos distintos de los resistentes a dicho antibiótico y asegura que solo los microorganismos resistentes produzcan colonias. Así, la presencia de una colonia indica que hay microorganismos resistentes a la vancomicina. Se pueden elegir agentes selectivos para inhibir el crecimiento de enterococos con una resistencia intrínseca, no transmisible, (vanC) a la vancomicina, tales como *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. arium*, y también de levaduras, bacterias ácido-lácticas y bacterias Gram-positivas y Gram-negativas no ERV.
- 30 La vancomicina se puede usar a un nivel que permita el crecimiento de organismos resistentes vanB, lo cual permite detectar la presencia de estos organismos clínicamente importantes. La vancomicina se usa preferiblemente a una concentración inferior a 8 mg/l, con mayor preferencia de 3 a 7 mg/l, sobre todo de 5 a 6 mg/l.
- 35 El medio también puede incluir agentes selectivos adicionales, tales como compuestos antifúngicos, para evitar el desarrollo excesivo de otros microorganismos en el medio. Los agentes selectivos adicionales se pueden escoger entre otros antibióticos, incluyendo por ejemplo los antibióticos de β -lactama y las cefalosporinas. Como ejemplos de otros antibióticos y compuestos antifúngicos apropiados que puedan servir de agentes selectivos en la presente invención cabe citar aztreonam, eritromicina, sulfato de poliximina B, colistina, cefoxitina y anfotericina B.
- 40 Los sustratos cromógenos o fluorógenos que llevan un grupo fosfato y/o un grupo galactopiranosilo se pueden añadir ventajosamente a este medio, tal como se describe abajo, a fin de poder usarlo para detectar y diferenciar entre distintas especies de enterococos resistentes a la vancomicina. Este aspecto de la presente invención está descrito abajo con mayor detalle.
- También se describe aquí un medio para detectar enterococos resistentes a la vancomicina, que comprende:
- (a) un medio nutritivo con una fuente energética efectiva para sustentar el crecimiento y la reproducción de los enterococos resistentes a la vancomicina;
 - 45 (b) una cantidad efectiva de uno o más agentes selectivos para inhibir el crecimiento de los microorganismos diferentes de los enterococos resistentes a la vancomicina;
 - (c) un primer sustrato cromógeno con un grupo fosfato - como sustrato para un enzima fosfatasa producido por una primera especie de enterococo resistente a la vancomicina - de manera que dicho primer sustrato cromógeno produzca una primera señal detectable en presencia de dicha primera especie de enterococo resistente a la vancomicina; y
 - 50 (d) un segundo sustrato cromógeno que lleva un grupo galactopiranosilo - como sustrato para un enzima

galactopiranosido producido por una segunda especie de enterococo resistente a la vancomicina – de modo que dicho segundo sustrato cromógeno produzca una segunda señal detectable en presencia de dicha segunda especie de enterococo resistente a la vancomicina.

5 En presencia de un enzima fosfatasa el sustrato cromógeno que lleva un grupo fosfato se metaboliza produciendo la señal detectable. Las especies de enterococos difieren en su capacidad de metabolizar los compuestos de fosfato y, como la señal detectable solo se producirá en presencia de una especie bacteriana capaz de metabolizar fosfato, el medio se puede emplear para distinguir especies de bacterias enterocócicas.

Los enzimas fosfatasa eliminan grupos fosfato de un sustrato, hidrolizando un monoéster de ácido fosfórico a un ión fosfato y una molécula con un grupo hidroxilo libre.

10 La fosfatasa alcalina es un enzima hidrolasa responsable de eliminar grupos fosfato de muchos tipos de moléculas.

Los sustratos cromógenos se emplean en cantidad suficiente para permitir que el crecimiento de la especie de enterococo específica del sustrato cromógeno produzca en el medio una señal característica detectable.

El primer sustrato cromógeno se usa preferiblemente a un intervalo de concentración de 0,05 hasta 0,4 g/l, con mayor preferencia de 0,1 a 0,35 g/l. El primer sustrato cromógeno se usa sobre todo a una concentración de 0,3 g/l.

15 Como segundo sustrato cromógeno se prefiere uno que lleva un grupo galactopiranosido. Estos sustratos pueden ser metabolizados por enzimas galactopiranosidasas, produciendo un compuesto de color. Un ejemplo de sustrato cromógeno apropiado es el 6-cloro-3-indolil- α -galactopiranosido. Este se emplea preferiblemente a un intervalo de concentración de 0,05 hasta 0,4 g/l. Con mayor preferencia se usa a una concentración de 0,1 a 0,3 g/l, sobre todo de 0,15 g/l.

20 Las señales detectables son preferiblemente señales visuales observables a simple vista.

Con mayor preferencia los sustratos cromógenos reaccionan en presencia de una especie de enterococo para producir una señal detectable que comprende un compuesto de color, de manera que las colonias bacterianas aparezcan coloreadas. Por consiguiente la presencia de una especie de enterococo se puede confirmar por simple valoración visual del medio.

25 Si se emplean dos sustratos cromógenos que produzcan cada uno un color particular al ser metabolizados por una especie bacteriana concreta, el medio permite detectar la presencia de una especie bacteriana concreta y también diferenciar dos especies distintas.

30 La presente invención es particularmente útil para detectar e identificar diferencialmente las especies de enterococo de importancia clínica *E. faecalis* y *E. faecium*. El uso de un sustrato cromógeno basado en fosfato da a la colonia un color fiable y consistente, minimizando la probabilidad de falsa identificación debida a una producción de color variable. El *E. faecalis* metaboliza el sustrato cromógeno basado en fosfato produciendo una colonia bacteriana coloreada. El *E. faecium* metaboliza el segundo sustrato cromógeno produciendo una colonia bacteriana de un color distinto. Cuando, por ejemplo, el primer sustrato cromógeno es 5-bromo-3-indolil-fosfato disódico y el segundo es 6-cloro-3-indolil- α -galactopiranosido, el *E. faecium* da lugar a colonias de color púrpura rosado (magenta) y el *E. faecalis* es indicado por la presencia de colonias azules.

35 Por tanto el medio de la presente invención permite detectar y diferenciar *E. faecium* y *E. faecalis* de manera rápida y fiable.

40 El medio comprende además el intermedio del ciclo de Krebs α -cetoglutarato. La inclusión de un intermedio del ciclo de Krebs tal como el ácido α -cetoglutarico mejora la respuesta del cultivo, actuando como promotor del crecimiento. Como resultado se forman colonias más grandes a las 24 horas, mejorando así la identificación de la presencia de colonias bacterianas. El uso de intermedios del ciclo de Krebs como promotores de crecimiento no ha sido revelado anteriormente para microorganismos enterocócicos. Al mejorar la detección de los enterococos se puede llevar más rápidamente a cabo cualquier intervención clínica necesaria.

45 El ciclo de Krebs (o ciclo de ácido cítrico o ciclo de ácidos tricarbónicos (TCA)) es una serie de reacciones químicas catalizadas enzimáticamente de importancia capital para las células que respiran usando oxígeno. El piruvato (de la glicólisis) se convierte en acetil-CoA, que se alimenta al ciclo y reacciona con oxalacetato formando citrato. Éste se transforma en cis-aconitato, luego en isocitrato, seguido de conversión en alfa-cetoglutarato, y luego seguidamente en succinil-CoA, succinato, fumarato y malato, antes de regenerar oxalacetato.

Aquí también se describen intermedios del ciclo de Krebs elegidos de uno o más de los grupos que comprenden:

50 ácido isocítrico y sales y derivados del mismo;

ácido cítrico y sales y derivados del mismo;

ácido oxalacético y sales y derivados del mismo;

ácido málico y sales y derivados del mismo;

ácido fumárico y sales y derivados del mismo;

ácido succínico y sales y derivados del mismo;

ácido aconítico y sales y derivados del mismo.

5 Opcionalmente, la visualización se facilita usando un medio de cultivo o una placa de cultivo que proporcione mayor contraste al emplear sustratos cromógenos (o fluorogénicos), pero que permita la visualización, u otra detección óptica a través del medio, de la información aplicada al fondo de la placa de cultivo. Por ejemplo, el medio puede contener un agente opacante, que es preferiblemente caolín o dióxido de titanio, a una concentración de 0,1 – 0,5 g/l de medio.

10 Como alternativa el medio puede estar contenido en una placa de cultivo cuya superficie de fondo haya sido alterada química o físicamente para hacerla semiopaca, sin ocultar la visualización del fondo de la placa.

El agente selectivo incluye al menos un antibiótico glicopeptídico. Los antibióticos glicopeptídicos comprenden la teicoplanina y la vancomicina.

15 El medio comprende además, preferiblemente, un agente selectivo seleccionado de uno o más de los grupos que incluyen:

un antibiótico glicopeptídico, incluyendo teicoplanina o vancomicina;

un compuesto antifúngico;

aztreonam;

eritromicina;

20 polimixina B y sales de la misma;

cefoxitina;

anfotericina B.

25 El uso de un antibiótico glicopeptídico evita el crecimiento de microorganismos distintos de los resistentes a este antibiótico y asegura que solo los microorganismos resistentes produzcan colonias. De este modo la presencia de una colonia indica que hay microorganismos resistentes a la vancomicina. Los agentes selectivos se pueden elegir para inhibir el crecimiento de enterococos con resistencia intrínseca no transmisible (vanC) a la vancomicina, tales como *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. arium*, y también de levaduras, bacterias ácido-lácticas y bacterias Gram-positivas y Gram-negativas no ERV.

30 La vancomicina se puede usar a un nivel que permita el crecimiento de organismos resistentes vanB, lo cual permite detectar la presencia de estos organismos clínicamente importantes. La vancomicina se usa preferiblemente a una concentración inferior a 8 mg/l, con mayor preferencia de 3 a 7 mg/l, sobre todo de unos 5 mg/l.

35 El medio también puede incluir agentes selectivos adicionales, tales como compuestos antifúngicos, para evitar el desarrollo excesivo de otros microorganismos en el medio. Los agentes selectivos adicionales se pueden escoger entre otros antibióticos, incluyendo por ejemplo los antibióticos de β -lactama y las cefalosporinas. Como ejemplos de otros antibióticos y compuestos antifúngicos apropiados que puedan servir de agentes selectivos en la presente invención cabe citar aztreonam, eritromicina, sulfato de poliximina B, colistina, cefoxitina y anfotericina B.

Preferiblemente la primera especie de enterococo es el *E. faecalis* y la segunda especie de enterococo es el *E. faecium*. Estas especies de enterococos tienen la capacidad de adquirir resistencia a la vancomicina y como tales se han asociado a elevadas tasas de mortalidad. Por tanto estas especies son de especial importancia clínica.

40 Preferiblemente el primer sustrato cromógeno se elige de la lista formada por:

5-bromo-3-indolil-fosfato disódico o de p-toluidina (azul);

5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato disódico o de p-toluidina (azul verdoso);

5-bromo-6-cloro-3-indolil-fosfato disódico o de p-toluidina (magenta);

6-cloro-3-indolil-fosfato disódico o de p-toluidina (rosa);

45 3-indolil-fosfato disódico o de p-toluidina (azul); y

fluorógenos 6-fluoro-3-indolil-fosfato disódico o de p-toluidina; y

4-metilumbeliferil-fosfato disódico o de p-toluidina.

Se apreciará que también pueden usarse otras sales adecuadas de estos substratos cromógenos de fosfato.

5 En una forma de ejecución particularmente preferida el primer substrato cromógeno es 5-bromo-3-indolil-fosfato disódico.

Preferiblemente el segundo substrato cromógeno se elige de la lista formada por:

5-bromo-3-indolil- α -galactopiranosido (azul);

5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -galactopiranosido (azul verdoso);

5-bromo-6-cloro-3-indolil- α -galactopiranosido (magenta);

10 6-cloro-3-indolil- α -galactopiranosido (rosa);

3-indolil- α -galactopiranosido (azul); y

fluorógenos 6-fluoro-3-indolil- α -galactopiranosido; y

4-metilumbeliferil- α -galactopiranosido.

15 En una forma de ejecución particularmente preferida el segundo substrato cromógeno es 6-cloro-3-indolil- α -galactopiranosido.

20 Los enterococos se pueden detectar en un medio líquido o gelatinoso. El medio también puede ser semisólido o sólido. Los medios gelatinosos se pueden preparar añadiendo agar al medio, como es bien sabido de los expertos en la materia. Antes de que cuaje, el medio gelatinoso licuado se vierte en placas de cultivo. Una vez cuajado se inocula en las placas la muestra que interesa, la cual puede ser una muestra clínica, incluyendo sin limitación una muestra de heces, un frotis rectal, un frotis perirrectal, orina o suero, una muestra del entorno, como por ejemplo de comida, o frotis de superficies de contacto de partes tales como pomos de puertas, paredes y encimeras.

La presente invención también proporciona un método de detección y diferenciación entre *E. faecalis* y *E. faecium*, que consiste en inocular una muestra biológica en un medio según la presente invención, incubar para lograr el crecimiento de enterococos y examinar en el medio la aparición de la primera y la segunda señal detectable.

25 El medio inoculado se incuba normalmente a 33 – 39°C, preferiblemente a 37°C, durante unas 22 a 26 horas, sobre todo durante 24 horas. Si los resultados son negativos tras esta primera incubación, el medio se incuba durante un periodo adicional de 24 horas. La presencia de enterococos resistentes a la vancomicina se determina observando las señales detectables. Por ejemplo, la presencia de *E. faecalis* está indicada por la aparición de colonias azules, mientras que el *E. faecium* produce colonias de color púrpura rosado (magenta), si el primer substrato cromógeno es 5-bromo-3-indolil-fosfato disódico y el segundo es 6-cloro-3-indolil- α -galactopiranosido.

30 Evidentemente, allí donde haya una especie enterocócica que contenga un enzima fosfatasa y también un enzima galactopiranosidasa se producirán ambos cromóforos y las especies adquirirán un color que es una mezcla de los dos diferentes colores de los cromóforos. Así, distintos enterococos producirán ciertas tonalidades diferentes. Esta gradación de la respuesta de color proporciona tanto un modo de identificación como de diferenciación entre los distintos enterococos resistentes a la vancomicina.

35 También se apreciará que no es esencial, aunque sea deseable, incluir tanto un primer como un segundo substrato cromógeno. En la siguiente tabla I se presentan varias posibles combinaciones.

TABLA I

Combinaciones posibles de fosfato, galactopiranosido y agente(s) selectivo(s)		
Fosfato Vancomicina Sin alfa-galactopiranosido	Dos especies de ERV detectadas (<i>faecium</i> , <i>faecalis</i>), ninguna diferenciación de especies	El color de las colonias depende de los cromóforos de fosfato usados (p.ej. azul, rosa, magenta, turquesa)
Alfa-galactopiranosido Vancomicina Sin fosfato	Dos especies de ERV detectadas (<i>faecium</i> , <i>faecalis</i>), diferenciación potencial de especies o solo detección de <i>E. faecium</i> (si se ajustan los antibióticos)	Color de las colonias: <i>E. faecalis</i> – incoloro, <i>E. faecium</i> – depende del alfa-gal usado (p.ej. azul, rosa, magenta, turquesa)

Vancomicina Sin fosfato Sin alfa-galactopiranosido	Dos especies de ERV detectadas (<i>faecium</i> , <i>faecalis</i>), ninguna diferenciación de especies	Colonias incoloras
Fosfato Alfa-galactopiranosido Sin vancomicina	Medio para detectar enterococos resistentes y no resistentes (p.ej. ¿en agua?); se podría distinguir entre <i>faecium</i> y <i>faecalis</i> , pero es difícil predecir qué otros enterococos podrían crecer en el mismo	Color de las colonias en función de los cromógenos usados
Fosfato Alfa-galactopiranosido Vancomicina Sin eritromicina	Medio para ERV y bacterias ácido-lácticas (BAL) (requisito muy improbable)	Las colonias de BAL pueden captar ambos cromógenos (predominantemente fosfato)
Fosfato Alfa-galactopiranosido Vancomicina Sin cefoxitina	Medio para ERV (incluyendo VanC como <i>E. gallinarum</i> , <i>casseliflavus</i> , dependiendo de la CIM real de vancomicina). VanC podrían distinguirse basándose en el tono de púrpura.	<i>E. gallinarum</i> , <i>casseliflavus</i> pueden captar ambos cromógenos
Fosfato Alfa-galactopiranosido Vancomicina Sin ACG	Dos especies de ERV detectadas (<i>faecium</i> , <i>faecalis</i>), colonias significativamente más pequeñas, absorción más lenta de cromógeno (especialmente rosa), mayor necesidad de cromógeno en la formulación, crecimiento inhibido, necesidad de prolongar el tiempo de incubación.	Color de las colonias en función de los cromógenos usados (los colores pueden tardar hasta 48 h en revelarse)

Aquí también se describe un medio para detectar enterococos resistentes a la vancomicina, que comprende:

- (a) una cantidad efectiva de uno o más agentes selectivos para inhibir el crecimiento de microorganismos distintos de los enterococos resistentes a la vancomicina; y
- 5 (b) dos o más componentes elegidos del grupo formado por:
 - (i) un sustrato cromógeno que lleva un grupo fosfato
 - (ii) un agente opacante
 - (iii) un compuesto intermedio del ciclo de Krebs

10 El uso de un sustrato basado en fosfato produce una reacción de color más consistente. Por ejemplo, en presencia de *E. faecalis* y 5-bromo-3-indolil fosfato se produce un color azul consistente. El empleo de agentes opacantes incrementa el contraste entre los cromógenos y el fondo, lo cual mejora la detección visual y permite obtener más pronto los resultados. El empleo de un intermedio del ciclo de Krebs (tal como el ácido α -cetoglutárico) como factor de crecimiento da lugar a colonias de mayor tamaño y más fáciles de ver a las 24 h.

15 Se seleccionan dos o más de estos componentes para usar en el medio, lo cual permite adaptar las características del medio a requisitos particulares.

20 Aquí también se describe un medio semiopaco preparado en una placa de cultivo. Pero en otras formas de ejecución la placa de cultivo puede ser semiopaca o bien puede serlo la pared del fondo de la placa que soporta el medio o al menos una o más áreas escogidas de dicha pared. Como alternativa la presente invención es una combinación de un medio de cultivo semiopaco contenido en una placa semiopaca. El medio o la placa de cultivo también se puede utilizar para cultivar una o más muestras de un paciente.

Por tanto aquí también se describe un medio de cultivo contenido en una placa que comprende un medio nutritivo para sustentar el crecimiento de uno o más microorganismos y que contiene:

al menos un sustrato cromógeno o un sustrato fluorógeno y un agente opacante en cantidad suficiente para aumentar la opacidad del medio sin ocultar la visualización del fondo de la placa.

25 Aquí también se describe un medio de cultivo contenido en una placa que comprende:

un medio nutritivo para sustentar el crecimiento de uno o más microorganismos y al menos un substrato cromógeno o un substrato fluorógeno,

de modo que dicha placa tiene una superficie de fondo que ha sido química o físicamente alterada para hacerla semiopaca sin ocultar su visualización.

5 Pueden prepararse placas semiopacas de varios modos, incluyendo, sin limitación, la adición de un agente opacante tal como el dióxido de titanio u otro pigmento sustancialmente blanco a la resina plástica, antes de moldear la placa, en cantidad suficiente para alcanzar el nivel deseado de semiopacidad. La adición de productos químicos a resinas poliméricas, designado a veces como “dopado”, es una práctica común en la industria de los plásticos y los agentes opacantes pueden agregarse según métodos conocidos del estado técnico.

10 Como alternativa la superficie interior y/o exterior de la placa de cultivo se puede grabar mecánica o químicamente, marcar, imprimir, hacerse rugosa o alterarse de cualquier otro modo conocido en la técnica para hacer el fondo de la placa semiopaco o producir al menos una región semiopaca en el fondo de la placa. “En el fondo de la placa” se refiere a la superficie interior o exterior de la pared del fondo o a una combinación de ambas.

15 Se puede preparar un medio semiopaco añadiéndole un agente opacante como dióxido de titanio o caolín antes de dejarlo solidificar, en cantidad suficiente para aumentar la opacidad del medio, pero permitiendo aún la visualización de la información contenida en el fondo de una placa de cultivo que contenga el medio semiopaco. Por ejemplo se puede añadir dióxido de titanio o caolín, o combinaciones de ambos, a la mayoría de las formulaciones de medios de cultivo, sin efectos adversos, a una concentración de 0,1 – 20 g/l, preferiblemente 0,1 – 5 g/l, con mayor preferencia 0,5 – 2 g/l. En concreto un intervalo de 0,5 – 2 g/l de dióxido de titanio o caolín es útil para mejorar el contraste visual con muchos substratos cromógenos o fluorógenos.

20 También se puede utilizar una combinación de placa semiopaca y medio semiopaco. Una placa que tenga al menos una parte de la superficie del fondo, interior o exterior, tratada mecánica o químicamente para aumentar su opacidad se puede usar para contener un medio que lleve una cantidad reducida de agente opacante. Por ejemplo, un medio que contenga 0,1 - 1 g/l de dióxido de titanio o 0,1 - 1 g/l de caolín es útil contenido en una placa semiopaca o con al menos una área semiopaca.

25 El nivel óptimo de semiopacidad depende del cromógeno o fluorógeno empleado y del microorganismo o de los microorganismos seleccionados. Como es conocido del estado técnico, las colonias pueden aparecer en cualquier parte con colores pálidos hasta oscuros, incluyendo varios tonos de rosa, azul, beige, amarillo, verde, rojo, magenta, violeta, púrpura, etc.

30 El uso de un medio semiopaco y/o de una placa semiopaca permite dividir el área de cultivo dentro de la placa en múltiples sitios de cultivo y a la vez el ensayo de múltiples muestras de un paciente en la misma placa de cultivo. Las figuras 6A - 6C muestran algunos ejemplos de las muchas posibilidades de división del área de cultivo para poder alojar múltiples muestras. Las líneas se pueden dibujar, imprimir, grabar, entallar, resaltar o aplicar por cualquier otro método adecuado para usarlo con las placas de cultivo.

35 La presente invención se ilustra seguidamente mediante ejemplos.

La figura 1A representa una placa de agar en que se visualizan colonias azules de *E. faecalis*;

La figura 1B representa una placa de agar en que se visualizan colonias rosa oscuro a violeta de *E. faecium*;

La figura 2 representa el crecimiento de *E. faecium* en placas de agar. En la figura 2A el medio es ChromID VRE (bioMérieux, Francia). En la figura 2B es un medio según la presente invención;

40 La figura 3 representa el crecimiento de una cepa vanB en placas de agar que contienen el medio ChromID VRE (fig. 3A) y un medio según la presente invención (fig. 3B);

La figura 4 representa el crecimiento de *E. faecalis* en placas de agar que contienen el medio ChromID VRE (fig. 4A) y un medio según la presente invención (fig. 4B);

45 La figura 5 representa el crecimiento de *E. gallinarum* en placas de agar que contienen el medio ChromID VRE (bioMérieux, Francia) (fig. 5A) y un medio según la presente invención (fig. 5B);

La figura 6 representa ejemplos de las múltiples posibilidades de división del área de cultivo.

Tal como se emplea aquí, el término “medio” (en plural “medios”) se refiere a una mezcla sólida, semisólida, en polvo o líquida que contiene todos o prácticamente todos los componentes necesarios para permitir el crecimiento y la reproducción de un microbio. El medio puede ser estéril o no, tal como requiere la práctica comúnmente aceptada.

50 Tal como se emplea aquí, el término “muestra biológica” se refiere a cualquier muestra tomada o procedente de una sustancia que supuestamente puede contener bacterias y/u otros microorganismos, e incluye, sin limitarse a ellas,

muestras del entorno (p.ej. de suelo o de agua) o muestras de humanos (p.ej. muestras clínicas como las de heces, frotis rectales, orina, sangre, heridas).

Tal como se emplea aquí, el término “microorganismo” se refiere a organismos microscópicos e incluye, sin limitarse a ellos, bacterias, hongos, levaduras, mohos y virus.

- 5 Tal como se emplea aquí, el término “substrato cromógeno” o “cromógeno” se refiere a un substrato conjugado con un cromóforo. El cromóforo produce un color visible a disociarlo del substrato. Análogamente substrato fluorógeno o fluorógeno se refiere a un substrato acoplado a un fluoróforo. Un fluoróforo produce una señal fluorescente.

10 Los substratos cromógenos reaccionan con un enzima, dando un compuesto coloreado. Los substratos cromógenos pueden sintetizarse y diseñarse de manera que posean una selectividad para el enzima similar a la del substrato natural. Se produce un compuesto coloreado cuando el substrato cromógeno es disociado por el enzima. De modo análogo los substratos fluorógenos reaccionan produciendo un compuesto fluorescente.

La figura 1 muestra colonias de *E. faecalis* (fig. 1A, azul) y colonias de *E. faecium* (fig. 1B, rosa oscuro a violeta) creciendo en placas de agar que contienen el medio de la presente invención.

Los substratos cromógenos son 5-bromo-3-indolil fosfato y 6-cloro-3-indolil- α -galactopiranosido.

- 15 Las colonias están bien formadas tras 24 horas de incubación y el medio produce colonias coloreadas consistentes, fácilmente identificables, que permiten detectar la presencia de *E. faecalis* y *E. faecium*.

20 La figura 2 representa *E. faecium* creciendo en medio ChromID VRE (fig. 2A) y en el medio de la presente invención (fig. 2B). Las colonias de *E. faecium* que crecen en el medio de la presente invención son considerablemente más grandes a las 24 horas. Esto ilustra una ventaja de la presente invención – es decir, que las colonias son más grandes y por tanto más fácilmente identificables al cabo de 24 horas de incubación.

La figura 3 representa una cepa vanB de *E. faecium* creciendo en medio ChromID VRE (fig. 3A) y en un medio según la presente invención (fig. 3B). Estas cepas vanB están mucho más inhibidas en el medio ChromID VRE que en el medio según la presente invención. Esto ilustra otra ventaja de la presente invención – es decir, que los organismos resistentes se detectan empleando el medio de la presente invención.

- 25 El medio de la presente invención también produce colonias de *E. faecalis* más grandes al cabo de 24 horas, si se compara con los medios existentes, tal como ilustran las figs. 4A y 4B. La figura 4A representa *E. faecalis* creciendo en medio ChromID VRE y la figura 4B colonias más grandes en un medio de la presente invención.

30 El *E. casseliflavus* y el *E. arium* están totalmente inhibidos en el medio según la presente invención. El *E. gallinarum* no está totalmente inhibido en medio ChromID VRE (véase fig. 5A), pero en el medio de la presente invención solo pueden observarse colonias individuales después de 48 horas (fig. 5B).

35 La adición de un agente opacante al medio y/o el uso de una placa semiopaca permite dividir el área de cultivo en múltiples sitios y a la vez ensayar varias muestras de un paciente en la misma placa de cultivo. En las figuras 6A - 6C se ven algunos ejemplos de las muchas posibilidades de división del área de cultivo para poder alojar múltiples muestras. Las líneas se pueden dibujar, imprimir, grabar, entallar, resaltar o aplicar de cualquier otro modo adecuado para usarlo con las placas de cultivo.

Ejemplo 1: medio ERV

BASE ERV:

Componente	g/l	Intervalo potencial g/l	Intervalo potencial g/l	Sustitutos
Dextrina	0,86	0 – 5	0,5 - 1	maltodextrina
	0,09	0 – 10	0,05 - 1	
NaOH	0,083	0,01 – 0,5	0,05 – 0,1	KOH
Sal microfina	5,43	5 - 25	5 – 7,5	NaCl
Mezcla de estreptococos*	4	1 - 10	2 - 6	
Peptona micoproteica	0,4	0 – 5	0,2 - 0,5	otras peptonas
Sulfato magnésico	0,1	0,1 - 2	0,1 – 0,2	
L-treonina	0,2	0 – 5	0,1 – 0,2	otros aminoácidos

ES 2 388 385 T3

Caseína, digesto péptico	8,17	5 - 30	5 - 15	
Triptona de yogur	8,42	1 - 30	5 - 15	triptona
Extracto de levadura en polvo	8,17	0 - 10	5 - 9	
Agar	12,50	10 - 16	12 - 15	
Ácido cetoglutárico	1	0 - 10	0,5 - 2	
Caolín	10	0,5 - 20	5 - 15	óxido de titanio IV
*MEZCLA DE ESTREPTOCOCOS (para aproximadamente 100 kg de mezcla estándar):				
Extracto de levadura en polvo	64 kg			
Piruvato sódico	32 kg			
Uracilo	0,64 kg			
Sulfato de adenina	0,64 kg			
Piridoxina HCl	0,64 kg			
Ácido fólico	0,064 kg			

MEZCLA DE ANTIBIÓTICOS/ANTIFÚNGICOS:

Componente	mg/l	Intervalo potencial mg/l	Sustitutos
vancomicina	6	5 - 6	teicoplanina
aztreonam	18	4 - 30	
eritromicina	0,5	0,5 - 30	
poliximina B sulfato	12,06		colistina
cefotaxima	20	0,5 - 60	cefalosporinas
anfotericina B	5	0,5 - 30	otros antifúngicos

SUBSTRATOS CROMÓGENOS:

- 5
 1. Substratos cromógenos basados en galactopiranosido, en un intervalo de concentraciones de 0,05 g/l hasta 0,4 g/l, ejemplo: 6-cloro-3-indolil- α -galactopiranosido, 0,15 g/l
 2. Substratos cromógenos basados en fosfato, en un intervalo de concentraciones de 0,05 g/l hasta 0,4 g/l, ejemplo: 5-bromo-3-indolil fosfato disódico, 0,3 g/l

Ejemplo del método de preparación del medio:

- 10
 1. Añadir base ERV, 6-cloro-3-indolil- α -galactopiranosido (0,15 g/l) y polisorbato 80 (0,2 ml) a 1 l de agua destilada y mezclar suavemente (la mezcla se puede calentar durante la homogeneización, pero sin llegar a hervir)
 2. Esterilizar en autoclave (por ejemplo: a 121°C durante 15 minutos)
 3. Enfriar hasta aproximadamente 50°C
- 15
 4. Suplementar con mezcla antibiótica/antifúngica y 5-bromo-3-indolil fosfato disódico (0,3 g/l) disuelta en una pequeña cantidad de un disolvente adecuado, tal como es sabido del estado técnico, y filtrar en condiciones estériles antes de agregarla al medio ERV enfriado
 5. Verter en placas o recipientes estériles de cultivo apropiados
 6. Dejar gelificar y secar del modo conocido en el estado técnico.

Ejemplo del método de uso del medio:

- 5 1. Inocular la muestra en las placas (puede ser una muestra clínica, incluyendo sin limitación una muestra de heces, un frotis rectal, un frotis perirrectal, orina o suero, o una muestra del entorno, incluyendo sin limitación muestras de comida o frotis de superficies de contacto de partes tales como pomos de puertas, paredes, encimeras, etc.). La muestra se puede inocular por estrías sobre la superficie de una placa de agar, arrastrando un instrumento adecuado (por ejemplo un asa de siembra) a través de la placa de agar.
2. Incubar a 33 – 39°C durante aproximadamente 24 horas (22 - 26 horas); si los resultados son negativos incubar 24 horas más.
- 10 3. Determinar la presencia de *E. faecalis* resistente a la vancomicina por la aparición de colonias azules y la presencia de *E. faecium* resistente a la vancomicina por la aparición de colonias púrpura rosado (magenta) a púrpura.

REIVINDICACIONES

1. Medio para el cultivo de enterococos resistentes a la vancomicina que comprende:
 - (i) un medio nutritivo con una fuente energética efectiva para sustentar el crecimiento y la reproducción de los enterococos resistentes a la vancomicina;
 - 5 (ii) una cantidad efectiva de uno o más agentes selectivos para inhibir el crecimiento de los microorganismos diferentes de los enterococos resistentes a la vancomicina, de manera que dichos agentes selectivos incluyen al menos un antibiótico glicopeptídico;
 - 10 (iii) un intermedio del ciclo de Krebs, de manera que incluya un ácido α -cetoglutárico y/o sales del mismo, que el medio contenga adicionalmente un primer sustrato cromógeno con un grupo fosfato - como sustrato para un enzima fosfatasa producido por una primera especie de enterococo resistente a la vancomicina - y que dicho primer sustrato cromógeno produzca una primera señal detectable en presencia de dicha primera especie de enterococo resistente a la vancomicina.
2. Medio según la reivindicación 1, que comprende además un agente opacante, el cual es caolín o dióxido de titanio y está presente a una concentración de 0,1 – 5 g/l de medio.
- 15 3. Medio según cualquier reivindicación precedente que comprende además un agente selectivo escogido de uno o más de los grupos formados por:
 - un compuesto antifúngico;
 - aztreonam;
 - eritromicina;
 - 20 poliximina B y sales de la misma;
 - cefotaxima;
 - anfotericina B.
- 25 4. Medio según cualquier reivindicación precedente que comprende además un segundo sustrato cromógeno que lleva un grupo galactopiranosilo - como sustrato para un enzima galactopiranosido producido por una segunda especie de enterococo resistente a la vancomicina – de modo que dicho segundo sustrato cromógeno produce una segunda señal detectable en presencia de dicha segunda especie de enterococo resistente a la vancomicina.
5. Medio según cualquier reivindicación precedente, cuyo primer sustrato cromógeno se selecciona de la lista formada por:
 - 5-bromo-3-indolil-fosfato disódico o de p-toluidina (azul);
 - 30 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato disódico o de p-toluidina (azul verdoso);
 - 5-bromo-6-cloro-3-indolil-fosfato disódico o de p-toluidina (magenta);
 - 6-cloro-3-indolil-fosfato disódico o de p-toluidina (rosa);
 - 3-indolil-fosfato disódico o de p-toluidina (azul); y
 - fluorógenos 6-fluoro-3-indolil-fosfato disódico o de p-toluidina; y
 - 35 4-metilumbeliferil-fosfato disódico o de p-toluidina.
6. Medio según la reivindicación 5, en que el primer sustrato cromógeno es 5-bromo-3-indolil-fosfato disódico.
7. Medio según la reivindicación 4 o las reivindicaciones 5 y 6, en tanto que dependientes de la reivindicación 4, en que el segundo sustrato cromógeno se selecciona de la lista formada por:
 - 5-bromo-3-indolil- α -galactopiranosido (azul);
 - 40 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -galactopiranosido (azul verdoso);
 - 5-bromo-6-cloro-3-indolil- α -galactopiranosido (magenta);
 - 6-cloro-3-indolil- α -galactopiranosido (rosa);
 - 3-indolil- α -galactopiranosido (azul); y

fluorógenos 6-fluoro-3-indolil- α -galactopiranosido; y

4-metilumbeliferil- α -galactopiranosido.

8. Medio según la reivindicación 7, en el cual el segundo sustrato cromógeno es 6-cloro-3-indolil- α -galactopiranosido.
- 5 9. Medio según cualquier reivindicación precedente, en que la primera especie enterocócica es *E. faecalis*.
10. Medio según la reivindicación 4, las reivindicaciones 5 y 6, en tanto que dependientes de la reivindicación 4, o las reivindicaciones 7, 8 y 9, en que la segunda especie enterocócica es *E. faecium*.
- 10 11. Método para detectar *E. faecalis* y *E. faecium* y distinguirlos, que consiste en inocular una muestra biológica en un medio según cualquiera de las reivindicaciones 4, 5 y 6, en tanto que dependientes de la reivindicación 4, o de las reivindicaciones 7, 8 y 9, incubarla para lograr el crecimiento de enterococos y examinar en el medio la aparición de la primera y segunda señales detectables.

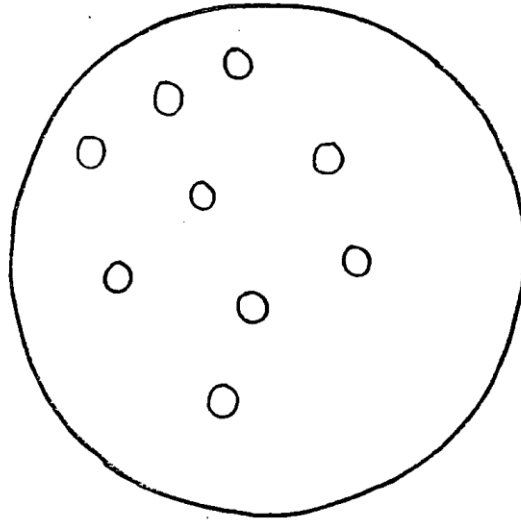


FIG 1A

○ = azul

● = rosa oscuro a violeta

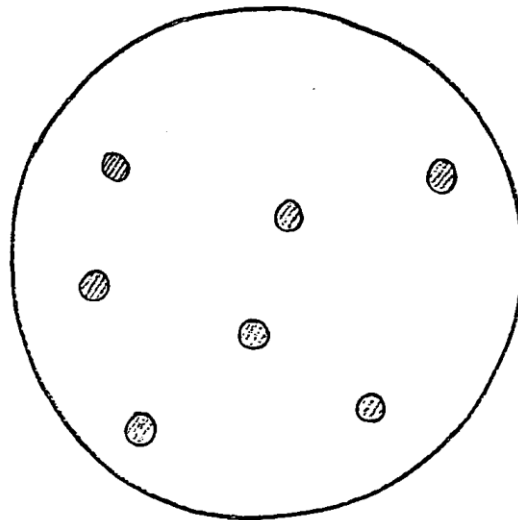


FIG 1B

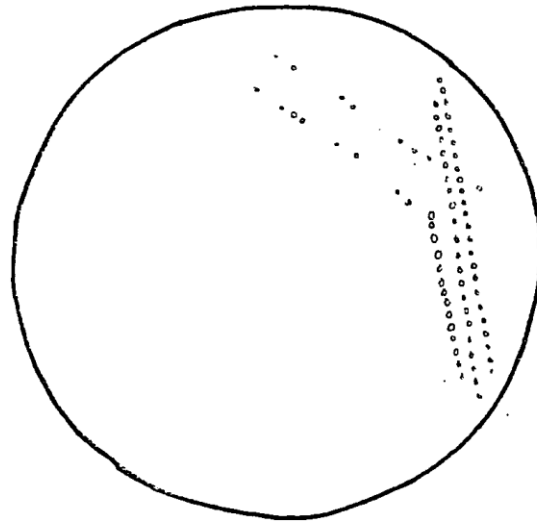


FIG 2A

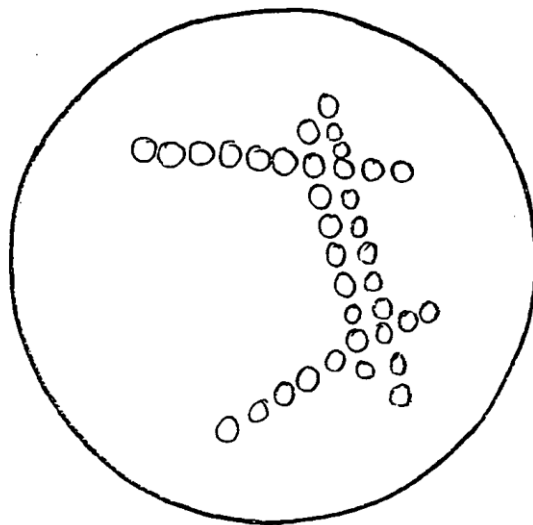


FIG 2B

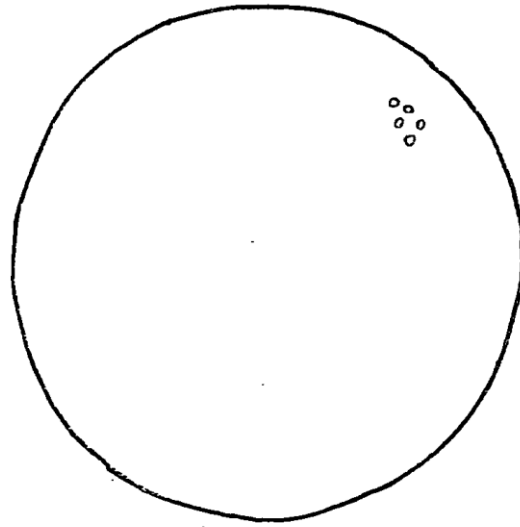


FIG 3A

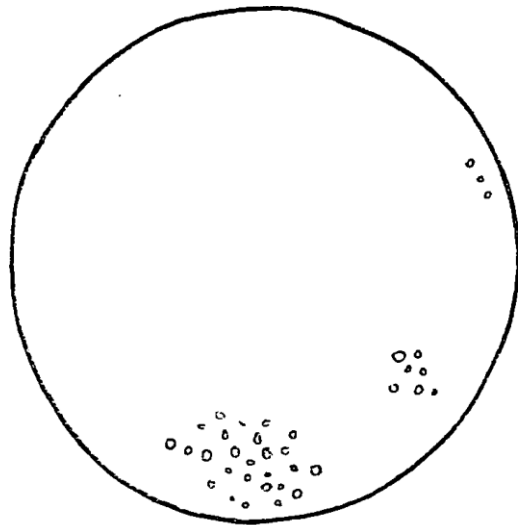


FIG 3B

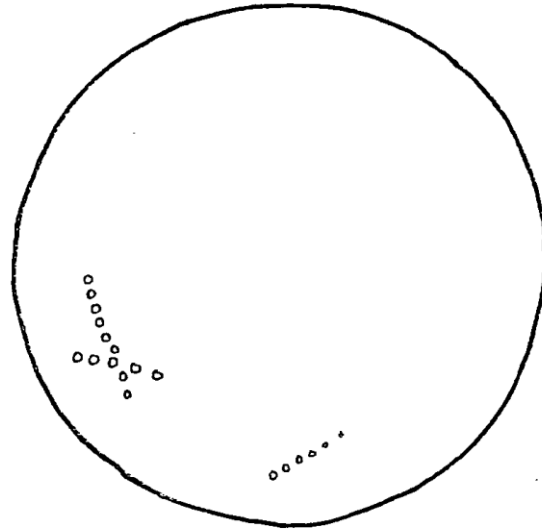


FIG 4A

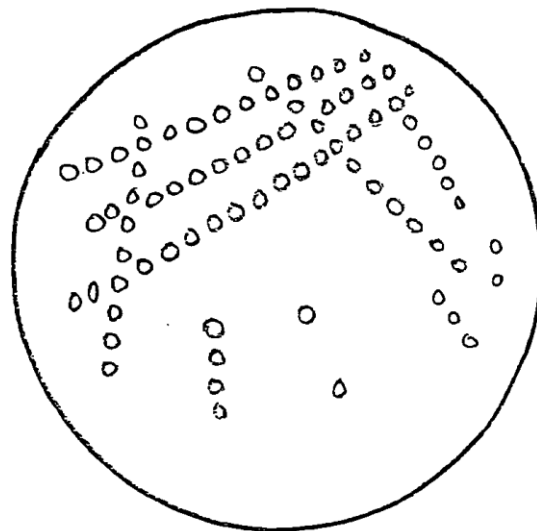


FIG 4B

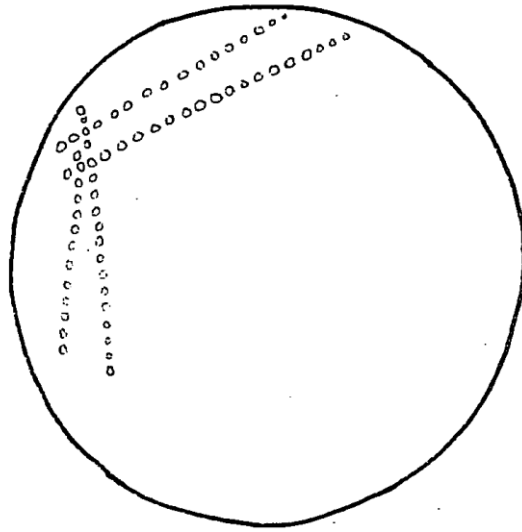


FIG 5A

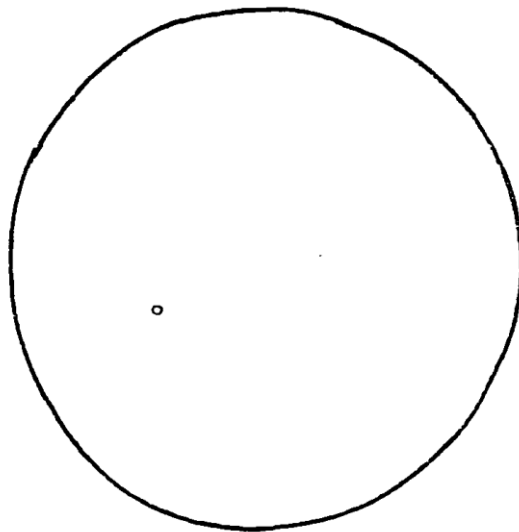


FIG 5B

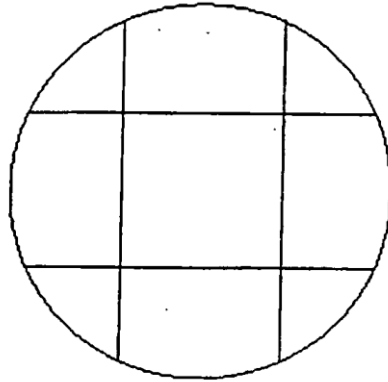


FIG. 6A

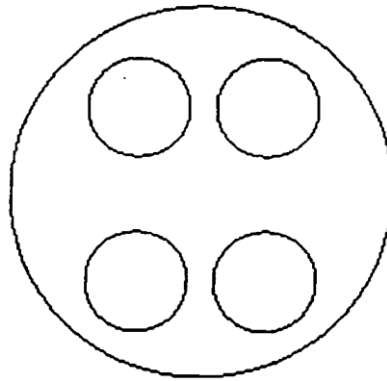


FIG. 6B

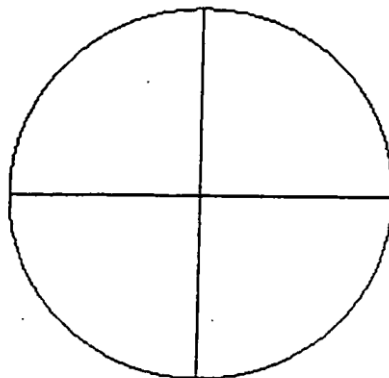


FIG. 6C