

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 417**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/14 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12Q 1/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05799851 .0**

96 Fecha de presentación: **14.09.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1789575**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.05.2007**

54

Título: **Procedimiento de detección de Streptococcus agalactiae empleando la actividad esterasa**

30

Prioridad:

16.09.2004 FR 0452068

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

21.12.2012

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

21.12.2012

73

Titular/es:

**BIOMERIEUX (100.0%)
CHEMIN DE L'ORME
69280 MARCY-L'ETOILE, FR**

72

Inventor/es:

**BARBAUX, LAURENCE y
ROBICHON, DENIS**

74

Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 393 417 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

Procedimiento de detección de *Streptococcus agalactiae* empleando la actividad esterasa

La presente solicitud de patente se refiere al ámbito de la detección y la identificación de *Streptococcus agalactiae*. Más concretamente, la invención se refiere a la utilización de sustratos de esterasa, eventualmente en asociación con al menos un sustrato de α -glucosidasa, de fosfatasa, de β -celobiosidasa o de N-acetil-glucosaminidasa, para la detección y la identificación de *Streptococcus agalactiae*.

El género *Streptococcus* incluye numerosas especies muy extendidas en la naturaleza, sobre la piel y las mucosas del hombre y de los animales y son la causa de múltiples infecciones. Son bacterias ubicuistas que se encuentran en estado libre en el medio exterior (suelo, aire, agua), en estado saprófito o en estado de comensal en el hombre y los animales. Sus localizaciones son la rinofaringe para los estreptococos de los grupos A, C, G, H y *salivarius*, el intestino para los estreptococos fecales del grupo D y la cavidad vaginal para los estreptococos del grupo B. Su papel patógeno es extremadamente variado y depende de las especies en cuestión y de su localización en el organismo.

Los estreptococos son cocos Gram+, de 0,5 a 1 μ m de diámetro, presentando un grupo en cadena e inmóviles. Catalasa negativa, con metabolismo fermentador, son anaerobios facultativos y son sensibles a las variaciones de temperatura (crecimiento óptimo 37°C) y a las variaciones de pH (pH óptimo 7).

Streptococcus agalactiae (o estreptococo B) se reconoce como uno de los principales agentes infecciosos responsables de la mamitis en los bóvidos. En el hombre, es esencialmente un saprófito de las vías genitales de la mujer (vagina), pero se encuentra también en la rinofaringe y en el intestino, en particular, en el recto. En los adultos, la colonización sigue siendo a menudo asintomática, pero el *Streptococcus agalactiae* puede ser responsable de septicemias, de neumonías, de meningitis, de artritis, de infecciones urinarias y de supuraciones profundas. En la mujer embarazada o después del parto, la infección puede conducir a endometritis y a una esterilidad.

En el recién nacido, la contaminación se produce *in utero* o, generalmente, durante el parto por inhalación del líquido amniótico o secreciones vaginales. Una infección precoz aparece a menudo a partir del nacimiento o dentro de las primeras horas de la vida. La infección precoz es favorecida por la premadurez, la ruptura de las membranas y una fuerte colonización de la vagina de la madre. La tasa de mortalidad en este tipo de infección es muy elevada (> 50%). Las infecciones tardías se traducen generalmente en meningitis (meningitis del lactante) y en artritis.

El cribado sistemático de portadores de *Streptococcus agalactiae* se recomienda al final de embarazo, idealmente entre 34 y 38 semanas de amenorrea (35-37 semanas de embarazo), debido, en particular, a su predominio (10% en Francia, lo que representa al menos 75.000 mujeres embarazadas) y de sus consecuencias durante los partos a largo plazo, lo que provoca un problema de salud pública.

Medios selectivos y/o medios que permiten una orientación del diagnóstico están disponibles en el comercio. No obstante, estos medios tienen por inconveniente que no se bastan por sí solos para el diagnóstico de *Streptococcus agalactiae* y que es necesario efectuar pruebas complementarias, tales como la puesta en evidencia del antígeno del grupo B de Lancefield (polisacárido con presencia dominante de ramnosa) y la hidrólisis del hipurato (caldo de hipurato).

Los medios selectivos utilizados más habitualmente son el caldo de Todd-Hewitt, caldo de enriquecimiento destinado a la búsqueda de estreptococos del grupo B en la mujer embarazada. Este caldo contiene diferentes antibióticos que inhiben la mayor parte de los gérmenes Gram negativos de la flora de acompañamiento, tales como el ácido nalixídico y la gentamicina o el ácido nalixídico, la poilmixina y el cristal violeta.

Después de la etapa de enriquecimiento, el caldo de Todd-Hewitt complementado con antibióticos se debe trasladar sobre medios destinados a la búsqueda de estreptococos (véase las recomendaciones del CDC (Center for Disease Control), MMWR (Morbidity and Mortality Weekly Report), 16 de agosto de 2002, Vol. 51, nº RR-11).

El medio de Lim es una variante del caldo de Todd-Hewitt y contienen el 1% de extracto de levadura, del ácido nalixídico y de la colistina.

Una gelosa Columbia que contiene el 5% de sangre también se utiliza y permite particularmente la puesta en evidencia del carácter β -hemolítico de *Streptococcus agalactiae*. Sin embargo, este carácter no siempre aparece: el halo de hemólisis alrededor de las colonias puede ser estrecho, dando más bien el aspecto α - e incluso γ -hemolítico. Por el contrario, este carácter se vuelve claro si en las proximidades de las colonias de *Streptococcus agalactiae*, se encuentran colonias de *Staphylococcus aureus* (Factor CAMP).

Del documento de la solicitud de patente europea nº 1.293.575 se conoce un procedimiento de detección y de identificación de microorganismos que utilizan distintos sustratos enzimáticos, de entre ellos un sustrato de esterasa. Entre los microorganismos enumerados por este documento nº 1.293.575 hay Estreptococos tal como el *S. agalactiae*.

Estos medios selectivos tienen como inconveniente que se deben completar mediante ensayos bioquímicos y/o inmunológicos.

5 Actualmente, el único medio selectivo listo para el empleo disponible en el mercado, que permite el aislamiento y la identificación directa de *Streptococcus agalactiae* a partir de extracciones recto-vaginales es el medio Granada (Biolyt SA). Este medio tiene como característica de que favorece la producción de un pigmento carotinoide por las cepas de *Streptococcus agalactiae* debido a la presencia en el medio de almidón soluble, proteosa peptona nº 3, glucosa, piruvato de sodio, sulfato de magnesio, metotrexato, colistina, cristal violeta, agar, suero de caballo, Na₂HPO₄ anhidro, metronidazol, MOPS (ácido morfolinopropanosulfónico) hemisódico, agua destilada e incubación en anaerobiosis. Este medio tiene por lo tanto el inconveniente de que la detección directa de *Streptococcus*
10 *agalactiae* se realiza en condiciones anaerobias, lo que no es fácil de emplear. Por otro lado, no está disponible ningún medio de detección que contiene uno o más sustratos enzimáticos.

La firma solicitante ha puesto ahora en evidencia contra todo lo esperado, que era posible utilizar sustratos enzimáticos, en particular sustratos enzimáticos de esterasa, para la detección específica y la identificación de *Streptococcus agalactiae*.

15 En efecto, de manera sorprendente, la firma solicitante ha puesto en evidencia que únicamente el *Streptococcus agalactiae* entre las especies de bacterias más próximas y las más frecuentemente encontradas de manera asociada no eran capaces de utilizar los sustratos enzimáticos de esterasa de manera precoz (a menos de 18 h después de la inoculación), de modo que sean las únicas que no se revelan de manera precoz por los sustratos de esterasa, por ejemplo, no obteniendo modificación de las colonias en el medio de manera precoz, por ejemplo no
20 obteniendo modificación de la coloración de las colonias en el medio cuando se utiliza un sustrato de esterasa cromógeno, sin que la coloración difunda en el medio de la reacción, por lo tanto, concentradas a nivel de las colonias, sin que por ello estas moléculas no tengan ningún efecto dañino sobre su crecimiento.

En consecuencia, este sustrato enzimático tiene como ventaja suplementaria que la lectura de los resultados se puede hacer de manera precoz, en particular, en aproximadamente 18-20 h de incubación, con un muy buen
25 contraste.

Así la presente solicitud tiene por objeto un método de detección específico y de identificación de *Streptococcus agalactiae*, caracterizado porque utiliza un medio de la reacción que incluye al menos un sustrato enzimático de esterasa que *Streptococcus agalactiae* no es capaz de utilizar a menos de 18 h después de la inoculación.

Los sustratos enzimáticos de esterasa apropiados a efectos de la solicitud son cualquier sustrato conocido por el experto en la técnica que permite poner en evidencia tal actividad enzimática. Tales sustratos pueden ser por ejemplo cromogénicos o fluorescentes y se describen por ejemplo en el catálogo BIOSYNTH, Substrates and Reagents o en www.biosynth.com o en el catálogo GLYCOSYNTH, Enzyme Substrates Catalogue o www.glycosynth.co.uk.
30

A título de ejemplo de sustratos de esterasa, se pueden citar los derivados de indoxil octanoato, indoxil-nonanoato o indoxil-decanoato, preferentemente derivados indoxil octanoato, preferentemente también sus derivados halogenados, preferentemente también los derivados clorados y bromados tales como el 5-bromo-6-cloro-3-indoxil-octanoato y el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-octanoato para los cuales la lectura es especialmente precoz.
35

Se observa como una ligera actividad esterasa después de 24 h de incubación (actividad inferior a 0,6 sobre una escala de 0 a 4), la detección del *Streptococcus agalactiae* se puede mejorar añadiendo al menos otro sustrato enzimático. A causa de la propiedad particular del *Streptococcus agalactiae* que se debe utilizar o a utilizar muy poco el sustrato de esterasa, es indiferente que el otro sustrato enzimático sea o no utilizado por *Streptococcus agalactiae* y las otras especies. Además, como la utilización del sustrato de esterasa por *Streptococcus agalactiae* no es más que muy baja de modo que esto solo modifique débilmente el aspecto de las colonias obtenidas, indicaremos únicamente de aquí en adelante que *Streptococcus agalactiae* no sea capaz de utilizar el sustrato de esterasa.
40
45

Así, según un modo de realización, el procedimiento de la solicitud utiliza un medio de la reacción que comprende también otro sustrato enzimático diferente de un sustrato de esterasa.

Los sustratos enzimáticos distintos que un sustrato de esterasa (sustrato no esterasa) apropiados a efectos de la solicitud son cualquier sustrato cuya utilización por unas cepas confiere a la colonia un aspecto diferente del aspecto obtenido durante la utilización del sustrato de esterasa. Tal aspecto diferente es por ejemplo una diferente coloración. Por otra parte, este sustrato no esterasa está tal que, cuando una cepa utiliza a la vez este sustrato no esterasa y el sustrato de esterasa (cepas diferentes de *Streptococcus agalactiae*), el aspecto de las colonias obtenidas (por ejemplo su coloración) es también diferente del aspecto de las colonias de *Streptococcus agalactiae*. En efecto, cuando se combinan en un medio de la reacción a la vez un sustrato de esterasa y un sustrato no esterasa utilizable por las cepas de *Streptococcus agalactiae*, las cepas de *Streptococcus agalactiae* son entonces negativas para la esterasa y positivas para el sustrato no esterasa (se les puede anotar como -/+ , correspondiendo la primera parte de la ecuación al sustrato de esterasa y correspondiendo la segunda parte al sustrato no
50
55

5 esterasa), mientras que las otras cepas son capaces de utilizar bien sea únicamente el sustrato de esterasa (son +/-), o bien a la vez el sustrato de esterasa y el sustrato no esterasa (son +/+). Del mismo modo, cuando se combina en un medio de la reacción a la vez un sustrato de esterasa y un sustrato no esterasa no utilizable por las cepas de *Streptococcus agalactiae*, las cepas de *Streptococcus agalactiae* son entonces negativas para la esterasa y negativas para el sustrato no esterasa (son -/-), mientras que las otras cepas son capaces de utilizar bien sea únicamente el sustrato de esterasa (son +/-), o bien a la vez el sustrato de esterasa y el sustrato no esterasa (son +/+). En resumen, las cepas de *Streptococcus agalactiae* son siempre -/+ o -/- mientras que las otras especies son siempre +/- o +/+.

10 Así, por ejemplo, si se combina un sustrato de esterasa cromógeno que implica una coloración azul de las colonias cuando la colonia en cuestión utiliza el sustrato, y otro sustrato enzimático cromógeno implica una coloración rosa de las colonias cuando la colonia en cuestión utiliza el sustrato, se pueden obtener cuatro tipos de coloración: bien sea rosa, o bien incoloro a ligeramente azul, bien sea azul, o bien violeta (rosa + azul). La coloración rosa y el aspecto incoloro a ligeramente azul son únicamente representativos del *Streptococcus agalactiae* del siguiente modo: bien sea la cepa es capaz de utilizar el sustrato no esterasa y la colonia se vuelve rosa (cepas +/-), o sea no es capaz de utilizar el sustrato no esterasa y la colonia sigue siendo incolora o se vuelve ligeramente azul (cepa -/-). Las coloraciones azul y violeta son representativas de las otras especies del siguiente modo: bien sea que la cepa es capaz únicamente de utilizar el sustrato de esterasa y se vuelve azul (cepas +/-), o bien la cepa es capaz a la vez de utilizar el sustrato de esterasa y el otro sustrato enzimático y se vuelve rosa y azul, o violeta (cepas +/+).

15 Del mismo modo, si se combina un sustrato de esterasa que absorbe la fluorescencia, que implica una extinción de fluorescencia cuando la colonia en cuestión utiliza el sustrato, y otro sustrato enzimático fluorescente que implica una fluorescencia a nivel de las colonias cuando la colonia en cuestión utiliza el sustrato, estando este último sustrato utilizado por *Streptococcus agalactiae*, se pueden obtener dos tipos de colonias: bien sea colonias fluorescentes, o bien colonias poco o nada fluorescentes. Las colonias fluorescentes son únicamente representativas de los *Streptococcus agalactiae* ya que esta especie es únicamente capaz de utilizar el sustrato enzimático distinto que el sustrato de esterasa. Las colonias poco o nada fluorescentes son representativas de las otras especies del siguiente modo: bien sea que la cepa es capaz únicamente de utilizar el sustrato de esterasa y es no fluorescente, o bien la cepa es capaz a la vez de utilizar el sustrato de esterasa y el otro sustrato enzimático y es poco o nada fluorescente.

20 Ejemplos de tales sustratos distintos que un sustrato de esterasa apropiados a efectos de la invención comprenden los sustratos de α -glucosidasa, los sustratos de fosfatasa, los sustratos de β -celobiosidasa, los sustratos de N-acetil-glucosaminidasa y los sustratos de β -glucosidasa.

25 Así, según otro modo de realización, el procedimiento de la solicitud utiliza como medio de la reacción, un medio de la reacción que comprende, además de un sustrato de esterasa, al menos un sustrato enzimático elegido entre los sustratos de α -glucosidasa, los sustratos de fosfatasa, los sustratos de β -celobiosidasa, los sustratos de N-acetil-glucosaminidasa y los sustratos de β -glucosidasa.

30 Los sustratos enzimáticos de α -glucosidasa apropiados a efectos de la solicitud son cualquier sustrato conocido por el experto en la técnica que permite poner en evidencia tal actividad enzimática. Tales sustratos pueden ser por ejemplo cromogénicos o fluorescentes y se describen por ejemplo en el catálogo BIOSYNTH, Substrates and Reagents o en www.biosynth.com o en el catálogo GLYCOSYNTH, Enzyme Substrates Catalogue o en www.glycosynth.co.uk.

35 A título de ejemplo de sustrato de α -glucosidasa, se pueden citar los sustratos a base de derivados de indoxilo, los sustratos a base de derivados de umbelliferona y los sustratos a base de derivados de naftol.

Preferentemente, el sustrato enzimático de α -glucosidasa apropiado a efectos de la invención es un sustrato a base de derivados de indoxilo.

45 Ejemplos de tales derivados de indoxilo comprenden los derivados de 3-indolil- α -D-glucopiranosido, preferentemente los derivados halogenados de estos compuestos. A título de ejemplos de derivados de 3-indolil- α -D-glucopiranosido halogenados, se pueden citar el 6-bromo-3-indolil- α -D-glucopiranosido, el 5-bromo-6-cloro-3-indolil- α -D-glucopiranosido, el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-glucopiranosido, el 5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-metil- α -D-glucopiranosido y el 6-cloro-3-indolil- α -D-glucopiranosido, siendo especialmente preferido este último compuesto.

50 Los sustratos enzimáticos de fosfatasa apropiados a efectos de la solicitud son cualquier sustrato conocido por el experto en la técnica que permite poner en evidencia tal actividad enzimática. Tales sustratos pueden ser por ejemplo cromogénicos o fluorescentes y se describen por ejemplo en el catálogo BIOSYNTH, Substrates and Reagents o en www.biosynth.com.

55 A título de ejemplo de sustrato de fosfatasa, se pueden citar los sustratos a base de derivados de indolilo, los sustratos a base de derivados de umbelliferona y los sustratos a base de nitrofenilo.

Preferentemente, el sustrato enzimático de fosfatasa apropiado a efectos de la solicitud es un sustrato a base de

derivados de indoxilo.

Ejemplos de tales derivados de indoxilo comprenden los derivados de 3-indolilo-fosfato tales como 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato, el 5-bromo-6-cloro-3-indolil fosfato y el 6-cloro-3-indolil-fosfato, siendo especialmente preferido este último compuesto.

5 Los sustratos enzimáticos de β -celobiosidasa apropiados a efectos de la invención son cualquier sustrato conocido por el experto en la técnica que permite poner en evidencia tal actividad enzimática. Tales sustratos pueden ser por ejemplo cromogénicos o fluorescentes y se describen por ejemplo en el catálogo BIOSYNTH, Substrates and Reagents o en www.biosynth.com o en el catálogo GLYCOSYNTH, Enzyme Substrates Catalogue o en www.glycosynth.co.uk.

10 A título de ejemplo de sustrato de β -celobiosidasa, se pueden citar los sustratos a base de derivados de indolilo, los sustratos a base de derivados de umbelliferona y los sustratos a base de nitrofenilo.

Preferentemente, el sustrato enzimático de β -celobiosidasa apropiado a efectos de la solicitud es un sustrato a base de derivados de indoxilo.

15 Ejemplos de tales derivados de indoxilo comprenden los derivados de 3-indolilo- β -D-celobiósido tales como 6-cloro-3-indolil- β -D-celobiósido y el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-celobiósido, siendo especialmente preferido este último compuesto.

20 Los sustratos enzimáticos de N-acetil-glucosaminidasa apropiados a efectos de la invención son cualquier sustrato conocido por el experto en la técnica que permite poner en evidencia tal actividad enzimática. Tales sustratos pueden ser por ejemplo cromogénicos o fluorescentes y se describen por ejemplo en el catálogo BIOSYNTH, Substrates and Reagents o en www.biosynth.com o en el catálogo GLYCOSYNTH, Enzyme Substrates Catalogue o en www.glycosynth.co.uk.

A título de ejemplo de sustrato de N-acetil-glucosaminidasa, se pueden citar los sustratos a base de derivados de indoxilo, los sustratos a base de derivados de umbelliferona y los sustratos a base de nitrofenilo.

25 Preferentemente, el sustrato enzimático de N-acetil-glucosaminidasa apropiado a efectos de la solicitud es un sustrato a base de derivados de indoxilo.

Ejemplos de tales derivados de indoxilo comprenden los derivados de 3-indolilo- β -N-acetil-glucosaminida tales como 5-bromo-6-cloro-3-indolil-N-acetil- β -D-glucosaminida, el 6-cloro-3-indolil-N-acetil- β -D-glucosaminida y el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -N-acetil- glucosaminida, siendo especialmente preferido este último compuesto.

30 Los sustratos enzimáticos de β -glucosidasa apropiados a efectos de la solicitud son cualquier sustrato conocido por el experto en la técnica que permite poner en evidencia tal actividad enzimática. Tales sustratos pueden ser por ejemplo cromogénicos o fluorescentes y se describen por ejemplo en el catálogo BIOSYNTH, Substrates and Reagents o en www.biosynth.com o en el catálogo GLYCOSYNTH, Enzyme Substrates Catalogue o en www.glycosynth.co.uk.

35 A título de ejemplo de sustrato de β -glucosidasa, se pueden citar los sustratos a base de derivados de indolilo, los sustratos a base de derivados de umbelliferona y los sustratos a base de nitrofenilo.

Preferentemente, el sustrato enzimático de β -glucosidasa apropiado a efectos de la solicitud es un sustrato a base de derivados de indoxilo.

40 Ejemplos de tales derivados de indoxilo comprenden los derivados de 3-indolilo- β -D-glucopiranósido tales como 5-bromo-4-cloro-3-indolil-3-D-glucopiranósido, 5-bromo-6-cloro-3-indolil- β -D-glucopiranósido, 6-cloro-3-indolil- β -D-glucopiranósido y el 5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-metil- β -D-glucopiranósido.

Según un modo de realización, el procedimiento de la solicitud utiliza un medio de la reacción que comprende:

- i) un sustrato de esterasa y
- ii) un sustrato de fosfatasa o un sustrato de α -glucosidasa, siendo la asociación sustrato de esterasa/sustrato de fosfatasa la preferida.

45 Según otro modo de realización, el medio de la reacción comprende, además del sustrato de esterasa y el sustrato de fosfatasa o de α -glucosidasa, un sustrato enzimático elegido entre un sustrato de β -celobiosidasa, un sustrato de N-acetil-glucosaminidasa y un sustrato de β -glucosidasa, preferentemente un sustrato de β -celobiosidasa y un sustrato de N-acetil-glucosaminidasa.

50 El medio de la reacción tal como se utiliza en el procedimiento de la solicitud es por lo tanto un medio de la reacción de detección a causa de la presencia de al menos un sustrato enzimático.

Este medio de la reacción puede bien sea servir únicamente de medio de revelación, o bien de medio de cultivo y de revelación. En el primer caso, el cultivo de los microorganismos se efectúa antes de la siembra y, en el segundo caso, el medio de la reacción constituye también el medio de cultivo.

5 El medio de la reacción puede ser sólido, semisólido o líquido. Por medio sólido o semisólido, se entiende por ejemplo un medio gelificado.

El agar es el medio tradicional sólido en microbiología para el cultivo de los microorganismos, pero es posible utilizar la gelatina o la agarosa. Un cierto número de preparaciones están disponibles en el comercio, como, por ejemplo, el agar Columbia, la gelosa Tripcasa-soja, la gelosa Mac Conkey, la gelosa Sabouraud o más generalmente la descrita en el Handbook of Microbiological Media (CRC Press).

10 La cantidad de agar en el medio de la reacción es de 2 a 40 g/l. Para los medios sólidos, la cantidad de agar es preferentemente de 9 a 25 g/l, preferentemente también de 12 a 14 g/l. Para los medios semisólidos, la cantidad de agar es preferentemente de 2 a 6 g/l.

Los substratos enzimáticos de la solicitud son utilizables en una amplia gama de pH, en particular, entre pH 5,5 y 10.

15 La concentración de o de los substrato(s) enzimático(s) en el medio de la reacción está comprendida entre 10 y 2000 mg/l, preferentemente entre 50 y 500 mg/l, preferentemente también entre 80 y 400 mg/l, lo que constituye un modo de realización preferido de la solicitud.

Por supuesto, el experto en la técnica determinará la concentración del o de los substrato(s) enzimático(s) en el medio en esta gama en función del substrato elegido. Así, en la medida en que el substrato de esterasa utilizado es el 5-bromo-4-cloro-3-indolil-octanoato, se prefiere una concentración comprendida entre 100 y 400 mg/l.

20 El medio de la reacción útil a efectos de la solicitud puede también comprender otros componentes útiles para mejorar la especificidad y/o la sensibilidad del procedimiento de la invención.

Así, según un modo de realización de la solicitud, el medio de la reacción comprende soluciones fosfato tales como soluciones de Na_2HPO_4 y K_2HPO_4 .

25 En efecto, la utilización de tales soluciones fosfato permite mejorar de manera sensible la legibilidad del medio que se traduce bien sea en un refuerzo de la claridad de coloración, o bien en un aumento de la expresión y/o la detección de la actividad fosfatasa a 18 h.

La concentración de tales soluciones fosfato está comprendida entre 0,3 y 1,5 g/l para cada solución, siendo preferido una concentración de 0,5 g/l.

30 El medio de la reacción puede también contener una mezcla de inhibidores para inhibir o limitar el crecimiento de las cepas indeseables, tales como las cepas falso positivo, por ejemplo *Candida* o *Staphylococcus saprophyticus*, sin modificar la sensibilidad de detección del medio.

A este respecto, la mezcla de la reacción puede contener una mezcla de antibióticos. La adición de antibióticos en el medio de la reacción permite entre otras cosas un ahorro de tiempo ya que la identificación de *Streptococcus agalactiae* se hace directamente.

35 Ejemplos de antibióticos que convienen a efectos de la invención comprenden el Aztreonam y la anfotericina B. Estos antibióticos están disponibles en el comercio para ICN, Squibb o Sigma.

La cantidad de cada antibiótico en el medio de la reacción varía en función del antibiótico en cuestión y vendrá determinada fácilmente por el experto en la técnica.

40 El medio de la reacción puede también comprender uno o varios elementos en combinación, tales como aminoácidos, peptonas, hidratos de carbono, nucleótidos, minerales, vitaminas, tensioactivos, tampones, sales de fosfato, de amonio, de sodio y de metales. Se describen algunos ejemplos de medios en las solicitudes de patente de la firma solicitante, patente europea n° 656.421 y solicitud de patente internacional n° WO99/09207.

El empleo del procedimiento de la solicitud se puede efectuar según las etapas siguientes que consisten en:

- 45
- a) inocular un medio de la reacción tal como se define anteriormente, con toda o parte de la muestra,
 - b) incubar el medio inoculado,
 - c) revelar la presencia de al menos una sola actividad esterasa o en combinación con al menos otra actividad enzimática diferente de una actividad esterasa,

lo que constituye otro objeto de la invención.

Las etapas de inoculación e incubación se conocen de sobra por el experto en la técnica.

Por ejemplo, la temperatura de incubación puede ser de 37°C. Tratándose de la atmósfera de incubación, es preferentemente aerobia.

5 Se emplea la revelación a simple vista por visualización de un cambio de coloración que no difunde en el medio de la reacción, por lo tanto concentrada a nivel de las colonias. En el caso de la revelación de la fluorescencia, se utilizan los dispositivos de lectura de la fluorescencia conocidos por el experto en la técnica.

Las muestras biológicas que se deben analizar son cualquier muestra clínica susceptible de contener *Streptococcus agalactiae*, como una extracción vaginal, una extracción de orina o cualquier otra muestra cuyo análisis puede ayudar a un médico a indicar un diagnóstico.

10 La solicitud se comprenderá mejor con la ayuda de los ejemplos siguientes dados con carácter ilustrativo y no limitativo.

Ejemplo 1: Detección de *Streptococcus agalactiae* con la ayuda de sustratos enzimáticos de esterasa

1.1 Preparación de los medios de la reacción

15 Se prepararon los medios de la reacción mezclando extracto corazón-cerebro (4,84 g/l; Solabia), infusión de carne (1,96 g/l; Solabia), bionona (1 g/l; Solabia), biotricasa (7,2 g/l; Solabia), carbonato de sodio (0,3 g/l; VWR), piruvato de sodio (2 g/l; Fluka), tampón HEPES (0,4 g/l; Sigma), peptona de lactalbúmina (2 g/l; DMV), glucosa (1 g/l; Merck), agar americano (2 g/l; Sobigel) y agar europeo (12 g/l; Roko).

Después de tratamiento en autoclave 15 min a 121°C, se añadió un sustrato enzimático de esterasa tal como se indica más abajo a razón de 0,3 g/l; luego se enfrió al baño maría a 50°C:

- 20
- 5-bromo-4-cloro-3-indolil-octanoato (X-C8; Inalco), que da una coloración turquesa cuando se utiliza, y
 - 5-bromo-6-cloro-3-indolil-octanoato (Magenta-C8; Inalco), que da una coloración rosa-roja cuando se utiliza.

Se vertieron a continuación los medios en placas de Petri para la inoculación posterior con cepas de bacterias.

1.2 Siembra de las cepas de microorganismos

25 Se sembraron tres cepas de *Streptococcus agalactiae* y tres cepas de otras bacterias, todas procedentes de la colección de la firma solicitante, puestas en suspensión en suero fisiológico, para dar colonias aisladas sobre cada uno de los medios. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h. Las colonias formadas se examinaron visualmente después de 18, 24 y más de 40 horas de incubación. Se anotaron la coloración de estas colonias, el crecimiento, así como la intensidad de esta coloración (representativa de la actividad esterasa).

1.3 resultados

30 Los resultados se recogen en el tabla 1 y se expresan:

- en crecimiento (C) con indicación del tamaño en mm,
 - en color (Co) con T = Turquesa, R = Rosa o Rojo,
 - en intensidad (I) de coloración basándose en una escala arbitraria que va de 0 a 4, 0 correspondiendo a una ausencia de actividad y 4 correspondiendo a la presencia de una coloración muy intensa, según el
- 35 tiempo de incubación en horas (T).

Tabla 1

Cepas (n° de entradas)	T	X-C8			Magenta-C8		
		C	Co	I	C	Co	I
<i>Streptococcus agalactiae</i> (7611003)	18	1,2			1,2		
	24	2	T	0,3	2	R	0,3
	> 40	2,5	T	2,3	2,5	R	1,7
<i>Streptococcus</i>	18	0,4			0,4		

<i>agalactiae</i> (0101060)	24	0,7	T	0,3	0,7	R	0,3
	> 40	1,3	T	3	1,3	R	2

Tabla 1 (continuación)

Cepas (n° de entradas)	T	X-C8			Magenta-C8		
		C	Co	I	C	Co	I
<i>Streptococcus agalactiae</i> (8904053)	18				0,3		
	24	0,2			0,5		
	> 40	0,3	T	0,3	1		
<i>Enterococcus faecalis</i> (0008192)	18	0,8	T	1,7	0,8	R	1
	24	2	T	3	1,8	R	1,7
	> 40	2	T	3,5	2	R	3,5
<i>Enterococcus faecium</i> (7611005)	18	0,5	T	2	0,7	R	1
	24	1	T	3	1,7	R	2,7
	> 40	1	T	3	1,7	R	3
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (7509009)	18	0,5	T	2	0,5	R	2
	24	1,5	T	3	1	R	3
	> 40	1,5	T	3	1,3	R	3,5

5 Los resultados ponen en evidencia que los estreptococos B se pueden detectar precozmente utilizando un sustrato enzimático de esterasa ya que ellos presentan una actividad nula a muy baja a 18-24 h

Ejemplo 2: Detección de *Streptococcus agalactiae* con la ayuda de un sustrato de esterasa y de un sustrato de α -glucosidasa o de fosfatasa

10 Se repitió el modo operativo descrito más arriba en el ejemplo 1, excepto que en este caso se añadieron, al mismo tiempo 0,3 g/l del sustrato de esterasa X-C8, 0,3 g/l de 6-cloro-3-indolil- α -D-glucopiranosido (Rosa- α -Glu), o bien 0,3 g/l de 6-cloro-3-indolil-fosfato (Rosa-P), que dan una coloración rosa cuando se utilizan.

Los resultados se recogen en el tabla 2 más abajo en la cual se recogen el crecimiento, la coloración y la intensidad, como en el ejemplo 1, y donde R = Rosa/Rojo, RM = Rosa-Marrón, T = Turquesa, V = Verde, Vi = Violeta, B = Azul, GVi = Gris-Violeta y GB = Gris-Azul.

Tabla 2

Cepas (n° de entradas)	T	X-C8 + Rosa-alfa-Glu			X-C8 + Rosa-P		
		C	Co	I	C	Co	I
<i>Streptococcus agalactiae</i> (7611003)	18	1,3	R	3	1	R	3
	24	1,3	R	3	1,7	R	4
	> 40	2	R	4	2	R	4
<i>Streptococcus agalactiae</i>	18	0,2	R	2	0,5	R	3
	24	0,3	R	2	0,5	R	3,5

(8709013)	> 40	1	R	4	1,7	R	4
-----------	------	---	---	---	-----	---	---

Tabla 2 (continuación)

Cepas (n° de entradas)	T	X-C8 + Rosa-alfa-Glu			X-C8 + Rosa-P		
		C	Co	I	C	Co	I
<i>Streptococcus agalactiae</i> (7702055)	18	1	R	2	0,8	R	3
	24	1,7	RM	2,7	1,3	R	4
	> 40	1,7	R	4	1,7	R	4
<i>Enterococcus faecium</i> (7611005)	18	1,5	T	3	1,7	GB	3
	24	1,7	T	3	1,7	B	3,5
	> 40	1,8	T	4	2	GVi	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (7509009)	18	0,7	V	3	0,6	GVi	3,5
	24	1,3	GB	3,5	1,3	GVi	3,5
	> 40	1,3	GB	3,5	1,5	GVi	4
<i>Staphylococcus aureus</i> (9202070)	18	3	GVi	3	2	Vi	4
	24	3	Vi	4	3	Vi	4
	> 40	3	Vi	4	3	Vi	4

5 Este tabla pone en evidencia que la detección de las cepas de *Streptococcus agalactiae* se mejora cuando se utiliza un sustrato de esterasa cromógeno en combinación con otro sustrato enzimático cromógeno, diferente de un sustrato de esterasa, y utilizable por las cepas de *Streptococcus agalactiae*.

Ejemplo 3: Detección de *Streptococcus agalactiae* con la ayuda de un sustrato de esterasa, de un sustrato de fosfatasa y de un sustrato de β-celobiosidasa

10 Se repitió el modo operativo descrito en el ejemplo 2, utilizando 0,3 g/l de X-C8, 0,2 g/l de Rosa-P, excepto que en este caso se añadieron también 0,08 g/l de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-celobiosido (Celobio) al mismo tiempo que los otros sustratos, así como 0,5 g/l de Na₂HPO₄ y 0,5 g/l de K₂HPO₄ antes del tratamiento en autoclave.

Se utilizó, como medio testigo, un medio con únicamente X-C8 y Rosa-P.

15 Los resultados se recogen en el tabla 3 presentada más abajo en la cual se recogen el crecimiento, la coloración y la intensidad, como en el ejemplo 1, y donde R = Rosa/Rouge, Ma = Morado, Vi = Violeta, B = Azul, GB = Gris-Azul y VI = Violín.

Tabla 3

Cepas (n° de entradas)	T	Testigo			X-C8 + Rosa-P + Celobio		
		C	Co	I	C	Co	I
<i>Streptococcus agalactiae</i> (0101060)	18	0,7	R	1,7	0,7	R	1,3
	24	0,7	R	4	0,7	R	3
	> 40	1,5	R	4	1,5	R	4
<i>Streptococcus agalactiae</i>	18	1,3	R	4	1	R	4
	24	1,5	R	4	1,5	R	4

(7701031)	> 40	1,5	R	4	1,5	R	4
-----------	------	-----	---	---	-----	---	---

Tabla 3 (continuación)

Cepas (n° de entradas)	T	Testigo			X-C8 + Rosa-P + Celobio		
		C	Co	I	C	Co	I
<i>Streptococcus agalactiae</i> (7702055)	18	1	R	2	1	R	2
	24	1,5	R	4	1,5	R	4
	> 40	1,7	R	4	1,7	R	4
<i>Streptococcus anginosus</i> (8507046)	18	0,3			0,3	B	0,5
	24	0,5	R	0,1	0,4	B	1,3
	> 40	1	R	2,3	1	B	2,7
<i>Enterococcus faecium</i> (0002043)	18	1,5	Ma	1,7	1,3	B	3
	24	1,7	Ma	3	1,5	GB	4
	> 40	2	Vi	4	2	VI	4

- 5 Los resultados obtenidos en el tabla 3 ponen en evidencia una mejora de la especificidad de detección de *Streptococcus agalactiae* con respecto a las otras cepas cuando se utilizan tres sustratos enzimáticos uno de ellos sustrato de esterasa.

Ejemplo 4: Detección de *Streptococcus agalactiae* con la ayuda de un sustrato de esterasa, de un sustrato de fosfatasa y de un sustrato de N-acetil-glucosaminidasa

- 10 Se repitió el modo operativo descrito en el ejemplo 3 excepto que en este caso se utilizaron 0,4 g/l de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -N-acetil-glucosaminida (X-NAGlu) en lugar del Celobio.

El medio testigo es idéntico al medio ensayado, excepto que en este caso no contiene X-NAGlu.

Los resultados se recogen en el tabla 4 presentada más abajo en la cual se recogen el crecimiento, la coloración y la intensidad, como en el ejemplo 1, y donde R = Rosa/Rouge, B = Azul, GR = Gris-Rosa y Mg = Magenta.

Tabla 4

Cepas (n° de entradas)	T	Testigo			X-C8 + Rosa - P + X-NAGlu		
		C	Co	I	C	Co	I
<i>Streptococcus agalactiae</i> (7611003)	18	0,5	R	3	0,5	R	2,3
	24	1	R	4	1	R	3
	> 40	1,2	R	4	1,2	R	4
<i>Streptococcus agalactiae</i> (7701031)	18	0,5	R	2,7	0,5	R	2,7
	24	0,7	R	4	0,7	R	4
	> 40	0,7	R	4	0,7	R	4
<i>Enterobacter cloacae</i> (0010003)	18	1,7	R	2,3	1,7	GR	2
	24	2	R	3	2	B	3
	> 40	2,5	B	4	3	B	4
<i>Enterococcus</i>	18	0,5	GR	2	0,5	B	3

<i>faecium</i> (0002043)	24	0,8	GR	2,7	0,8	B	3,5
	> 40	1	Mg	4	1	B	4

Los resultados en esta tabla ponen en evidencia una mejora de la especificidad de detección de *Streptococcus agalactiae* con respecto a las otras cepas cuando se utilizan tres sustratos enzimáticos uno de ellos sustrato de esterasa.

5 **Ejemplo 5: Detección de *Streptococcus agalactiae* con la ayuda de un sustrato de esterasa, de un sustrato de fosfatasa y de un sustrato de β-glucosidasa**

Se repitió el modo operativo descrito en el ejemplo 4 excepto que en este caso se utilizaron 0,08 g/l de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucopiranosido (X-β-Glu) y 0,3 g/l de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-metil-β-D-glucopiranosido (GreenA-β-Glu) en lugar del X-NAGlu.

10 El medio testigo es idéntico al medio ensayado, excepto que en este caso no contiene X-β-Glu ni GreenA-β-Glu.

Los resultados se recogen en el tabla 5 presentada más abajo en la cual se recogen el crecimiento, la coloración y la intensidad, como en el ejemplo 1, y donde R = Rosa/Rouge, Ma = Morado, Vi = Violeta, B = Azul y GB = Gris-Azul.

Tabla 5

Cepas (n° de entradas)	T	Testigo			X-C8 + Rosa-P + X-β-Glu			X-C8 + Rosa - P + GreenA-β-Glu		
		C	Co	I	C	Co	I	C	Co	I
<i>Streptococcus Agalactiae</i> (9001001)	18	0,4			0,3			0,2		
	24	0,5	R	0,5	0,5	R	0,3	0,4	R	0,3
	> 40	1,7	R	4	1,3	R	4	1,5	R	4
<i>Streptococcus Agalactiae</i> (7701031)	18	1,3	R	4	1,3	R	4	1	R	4
	24	1,5	R	4	1,5	R	4	1,5	R	4
	> 40	1,5	R	4	1,5	R	4	1,5	R	4
<i>Streptococcus Agalactiae</i> (7702055)	18	1	R	2	1	R	2	1	R	2
	24	1,5	R	4	1,5	R	4	1,3	R	4
	> 40	1,7	R	4	1,7	R	4	1,5	R	4
<i>Streptococcus Anginosus</i> (8507046)	18	0,3			0,3	B	3	0,3	B	0,5
	24	0,5	R	0,1	0,4	B	4	0,4	B	2
	> 40	1	R	2,3	1	B	4	1	B	3,5
<i>Enterococcus Faecium</i> (0002043)	18	1,5	Mi	1,7	1,5	B	4	1,5	GB	4
	24	1,7	Mi	3	1,5	B	4	1,7	GB	4
	> 40	2	Vi	4	2	B	4	2	GB	4

15 Los resultados obtenidos en el tabla 5 ponen en evidencia una mejora de la especificidad de detección de *Streptococcus agalactiae* con respecto a las otras cepas cuando se utilizan tres sustratos enzimáticos incluido un sustrato de esterasa.

Ejemplo 6: Mejora de la sensibilidad de detección por adición de solución fosfato

20 Se repitió el modo operativo descrito en el ejemplo 1, excepto que en este caso se añadieron, al mismo tiempo 0,3 g/l del sustrato de esterasa X-C8, 0,3 g/l de Rosa-P, así como 0,5 g/l de Na₂HPO₄ y 0,5 g/l de K₂HPO₄.

Como medio testigo, se utilizó el mismo medio, pero sin solución de fosfato.

Los resultados se recogen en el tabla 6 presentada abajo en la cual se recogen el crecimiento, la coloración y la intensidad, como en el ejemplo 1, y donde R = Rosa y Mg = Magenta.

5

Tabla 6

Cepas (n° de entradas)	Testigo				Medio con solución fosfato		
	T	C	Co	I	C	Co	I
<i>Streptococcus agalactiae</i> (7611003)	18	1,3	R	3	1,3	Mg	3,5
	24	1,7	Mg	4	1,7	Mg	4
	> 40	1,8	Mg	4	1,8	Mg	4
<i>Streptococcus agalactiae</i> (0101060)	18	0,4	R	0,5	0,5	Mg	3
	24	0,5	Mg	4	0,7	Mg	3,5
	> 40	1,5	Mg	4	1,5	Mg	4
<i>Streptococcus agalactiae</i> (7702055)	18	1	Mg	3	1	R	3,5
	24	1,5	Mg	4	1,5	Mg	4
	> 40	1,5	Mg	4	1,5	Mg	4

Los resultados en esta tabla 6 ponen en evidencia bien sea una mejora de la claridad de coloración a partir de 18 h, o un aumento de la expresión de las cepas de *S. agalactiae*.

10 **Ejemplo 7: Comparación de la sensibilidad y la especificidad de detección de *S. agalactiae* utilizando un medio que contiene un sustrato de esterasa según la invención y los medios disponibles en el comercio**

Para este estudio de sensibilidad y de especificidad, se utilizó un medio según la invención preparado tal como se describe en el ejemplo 1, que contiene 0,3 g/l de X-C8, así como: 0,2 g/l de Rosa-P, 0,08 g/l de Celobio, 0,5 g/l de Na₂HPO₄, 0,5 g/l de K₂HPO₄, 0,012 g/l de Aztreonam y 0,004 g/l de Anfotericina B.

Como medio de comparación, se utilizó el medio Granada (Ref. 10.077, BIOLYS, Francia) (Medio Granada).

15 Se sembraron 69 cepas de microorganismos, 14 de las cuales de *Streptococcus agalactiae*, se dejó incubar a 37°C hasta 24 h y a temperatura ambiente pasado este tiempo. Se visualizaron las colonias tal como se describe anteriormente. La confirmación de las colonias sospechosas características de *Streptococo B*, es decir, que parecen rosas/rojas, fue realizada por ensayo de aglutinación utilizando el kit de reactivo Slidex Strepto según las recomendaciones de los proveedores (bioMérieux, Francia). Las colonias no características, es decir, distintas que
20 rosas o que tienen la coloración característica pero que daban una respuesta negativa al ensayo de aglutinación (cepas falsas positivas), fueron identificadas por las Galerías ID 32 Strep (bioMérieux, Francia).

25 Se expresan los resultados en % de buen diagnóstico con respecto a todos los ensayos en términos de sensibilidad y especificidad y se recogen en la tabla 7 presentada más abajo, correspondiendo el % de sensibilidad al número de verdaderos positivos detectados sobre el medio por el número total de verdaderos positivos que se deben detectar (*100) y correspondiendo el % de especificidad al número de verdaderos negativos detectados sobre el medio por el número total de verdaderos negativos que se deben detectar (*100).

Tabla 7

	Sensibilidad y especificidad de detección de <i>S. agalactiae</i> en %					
	Medio Granada			Medio de la invención		
	18 h	24 h	> 40 h	18 h	24 h	> 40 h
Sensibilidad sin enriquecimiento	50	50	50	79	79	93
Sensibilidad con enriquecimiento	50	50	50	79	86	93
Especificidad sin enriquecimiento	100	100	100	87	82	80
Especificidad con enriquecimiento	100	100	100	89	93	82

Los resultados indicados en esta tabla ponen en evidencia la mejora de la sensibilidad de detección de los Estreptococos B (*Streptococcus agalactiae*) utilizando el procedimiento de la invención. Por otra parte, ponen de manifiesto también que el medio de detección de la invención posee también una buena especificidad, especificidad mejorada después del enriquecimiento a causa de un paso en caldo de Todd-Hewitt las 18-24 horas a 35-37°C con o sin 5% de CO₂ antes de la siembra de la gelosa (véase recomendaciones del CDC (Center for Disease Control), MMWR (Morbidity and Mortality Weekly Report), el 16 de agosto de 2002, Vol. 51, n° RR-11).

Ejemplo 8: Utilización del medio a partir de muestras clínicas

Para este estudio, se utilizó el medio según la invención tal como el preparado que se describe anteriormente en el ejemplo 7.

Se utilizaron un total de 134 muestras/escobillas procedentes de extracciones vaginales o endocervicales de mujeres embarazadas en este estudio.

Se emulsionó cada escobilla en 1 ml de suero fisiológico estéril y se depositaron 100 µl de esta solución, por una parte, sobre una Gelosa Columbia que contenía 5% de sangre de caballo y, por otra parte, sobre el medio utilizado en el procedimiento de la invención. Por otra parte, se utilizaron 100 µl de la solución anterior para inocular un caldo de Todd Hewitt. Después de 20 horas de incubación a 37°C y en aerobiosis, la gelosa con sangre y el medio de la invención se sembraron a partir del caldo de Todd Hewitt luego se incubaron durante 20 h a 37°C en aerobiosis.

La confirmación de las colonias sospechosas características de Estreptococo B, es decir, que parecen rosas/rojas, fue realizada por ensayo de aglutinación utilizando el kit de reactivo Slidex Strepto según las recomendaciones de los proveedores (bioMérieux, Francia).

Entre las 134 muestras, 112 se sembraron sobre los medios gelosados, por una parte, directamente a partir de la suspensión en suero fisiológico y, por otra parte, después del enriquecimiento en caldo de Todd Hewitt. Las 22 muestras restantes se sembraron sobre los medios gelosados únicamente directamente a partir de la suspensión en suero fisiológico.

Los resultados, expresados en porcentaje medio de sensibilidad y especificidad se presentan en el tabla 8.

Tabla 8

	Gelosa Columbia	Gelosa de la invención
Sensibilidad	95	100
Especificidad	90	99,5

Los resultados del tabla 8 presentada más arriba ponen de manifiesto que el medio de la invención, utilizado con muestras clínicas, permite una mejora de la sensibilidad y de la especificidad de detección de los *Streptococcus agalactiae*. En efecto, 20/20 extracciones que contienen *Streptococcus agalactiae* se detectan sobre el medio de la invención contra 19 sobre el medio Columbia y sólo hay un único resultado falso + sobre el medio esterasa contra 24 sobre la gelosa Columbia. Hasta se puede tener en cuenta que los resultados son mejores que cuando se ensayo el medio con las cepas de laboratorio.

REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento de detección específico y de identificación de *Streptococcus agalactiae*, caracterizado porque se utiliza un medio de la reacción que comprende al menos un sustrato enzimático de esterasa que *Streptococcus agalactiae* no es capaz de utilizar a menos de 18 h después de la inoculación.
- 5 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el sustrato de esterasa se elige entre los derivados de indoxilo-octanoato, de indoxilo-nonanoato y de indoxilo-decanoato.
- 3.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque el medio de la reacción comprende también otro sustrato enzimático utilizado por *Streptococcus agalactiae*, diferente de un sustrato de esterasa.
- 10 4.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque dicho otro sustrato enzimático es al menos un sustrato enzimático elegido entre los sustratos de α -glucosidasa, los sustratos de fosfatasa, los sustratos de β -celobiosidasa, los sustratos de N-acetil-glucosaminidasa y los sustratos de β -glucosidasa.
- 5.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque dicho medio de la reacción comprende:
- 15 i) un sustrato de esterasa y
- ii) un sustrato de fosfatasa o un sustrato de α -glucosidasa.
- 6.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque dicho medio de la reacción comprende también un sustrato enzimático elegido entre un sustrato de β -celobiosidasa, un sustrato de N-acetil-glucosaminidasa y un sustrato de β -glucosidasa.
- 20 7.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la concentración de cada sustrato enzimático está comprendida entre 10 y 2.000 de mg/l.
- 8.- Procedimiento de detección específico y de identificación de bacteria(s) de la especie *Streptococcus agalactiae* en una muestra susceptible de contener esta bacteria, caracterizado porque comprende las etapas que consisten en:
- 25 a) inocular un medio de la reacción tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, con todo o parte de la muestra,
- b) incubar el medio inoculado,
- c) revelar la presencia de al menos una actividad esterasa sola o en combinación con al menos otra actividad enzimática diferente de una actividad esterasa.
- 30 9.- Utilización de un medio de la reacción que comprende un sustrato de esterasa y al menos un sustrato enzimático elegido entre un sustrato de α -glucosidasa, un sustrato de fosfatasa y un sustrato de β -celobiosidasa para la detección específica y la identificación de *Streptococcus agalactiae*.