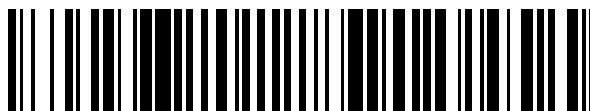


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 501 091**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/14 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
C12Q 1/42 (2006.01)
C12Q 1/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2005 E 12167653 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.07.2014 EP 2487235**

54 Título: **Medio de detección de Streptococcus agalatae utilizando la actividad esterasa**

30 Prioridad:

16.09.2004 FR 0452068

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

01.10.2014

73 Titular/es:

BIOMÉRIEUX (100.0%)
Chemin de l'Orme
69280 Marcy L'Etoile, FR

72 Inventor/es:

ROBICHON, DENIS y
BARBAUX, LAURENCE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 501 091 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 de detección de *Streptococcus agalactiae* utilizando la actividad esterasa

La presente invención se refiere al campo de la detección y de la identificación de *Streptococcus agalactiae*. Más particularmente, 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* comprende numerosas especies muy extendidas en la naturaleza, en la piel y las mucosas del hombre y de los animales y son el origen de múltiples infecciones. Son bacterias ubicuistas que se encuentra en estado libre en el medio exterior (suelo, aire, agua), en estado saprófito o en estado de comensal en el ser humano 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 unos cocos Gram+, de 0,5 a 1 μ m de diámetro, que presentan un grupo en cadena e inmóviles. Catalasa negativa, con metabolismo fermentador, son anaeróbicos facultativos y son sensibles a las variaciones de temperatura (crecimiento óptimo 37°C) y a las variaciones de pH (pH óptimo de 7).

Streptococcus agalactiae (o estreptococo B) está reconocido 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 unas 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 de secreciones vaginales. Una infección precoz aparece a menudo a partir del nacimiento o en las primeras horas de 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 (> del 50%). Las infecciones tardías se traducen generalmente en una meningitis (meningitis del lactante) y en artritis.

El cribado sistemático de los portadores de *Streptococcus agalactiae* se recomienda en final del embarazo, idealmente entre las 34 y 38 semanas de amenorrea (35-37 semanas de embarazo), debido, en particular, a su predominio (10% en Francia, es decir al menos 75000 mujeres embarazadas/año) y de sus consecuencias durante los partos a término, lo que provoca un problema de salud pública.

Los medios selectivos y/o los medios que permiten una orientación del diagnóstico están disponibles en el comercio. Sin embargo, estos medios tienen como inconveniente que no son suficientes por sí solos para el diagnóstico de *Streptococcus agalactiae* y que es necesario efectuar unas 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 más habitualmente utilizados son el caldo de Todd-Hewitt, el caldo de enriquecimiento destinado a la búsqueda de los estreptococos del grupo B en la mujer embarazada. Este caldo contiene diferentes antibióticos que inhiben la mayoría de los gérmenes Gram negativos de la flora acompañante, tales como el ácido nalixídico y la gentamicina, o el ácido nalixídico, la polymixina y el cristal violeta.

Después de la etapa de enriquecimiento, el caldo de Todd-Hewitt complementado con antibióticos debe ser traspasado sobre unos medios destinados a la búsqueda de los estreptococos (véanse las recomendaciones del CDC (Center for Disease Control), MMWR (Morbidity and Mortality Weekly Report), 16 de agosto de 2002, Vol. 51, n° RR-11).

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

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

Estos medios selectivos tienen como inconveniente que deben ser completados por unos ensayos bioquímicos y/o inmunológicos.

Actualmente, el único medio selectivo listo para el empleo disponible en el comercio, que permite el aislamiento y la identificación directa de *Streptococcus agalactiae* a partir de extracciones recto-vaginales es el medio Granada (BiolyS SA). Este medio tiene como característica que favorece la producción de un pigmento carotenoide 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 como inconveniente que la detección directa de *Streptococcus agalactiae* se realiza en condición anaerobia, lo que no es fácil de realizar. Por otra parte, no está disponible ningún medio de detección que contenga uno o más sustratos enzimáticos.

El documento EP 1 293 575 describe un sistema de ensayos universales para la identificación de múltiples familias de microorganismos. Así, este documento realiza un catálogo que mezcla en dos largas listas los microorganismos detectables y los sustratos enzimáticos utilizables. El documento EP 1 293 575 sugiere al experto en la materia la combinación de sustrato siguiente: peptidasa + glicosidasa + ureasa + triptofanasa + esterasa + descarboxilasa. Además, en este documento, se encuentra una gran lista de microorganismos a detectar.

El documento EP0881284 describe un medio de cultivo para la detección específica de las enterobacterias. El documento EP0881284 muestra la detección de las salmonelas y de otras enterobacterias utilizando el medio BKD1, que contiene un sustrato de esterasa, y que esta detección les es específica, ya que este medio no permite detectar otras cepas, tales como *Streptococcus spp.*

El documento FR2708286 describe un medio de cultivo que comprende al menos dos cromógenos. Unos ejemplos de tales cromógenos son descritos en el documento FR2708286. Este documento describe un número importante de sustratos potenciales. Pero, el documento FR2708286 no describe ni ilustra la detección de *Streptococcus agalactiae*. El documento FR2708286 ilustra sólo la detección de los estreptococos D.

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

En efecto, de manera sorprendente, la solicitante ha puesto en evidencia que sólo los *Streptococcus agalactiae* entre las especies de bacterias más próximas y más frecuentemente encontradas de manera asociada no eran capaces de utilizar los sustratos enzimáticos de esterasa de manera precoz (a menos de 18h después de la inoculación), de manera que son las únicas que no se revelan de manera precoz por los sustratos de esterasa, por ejemplo, no obteniendo ninguna modificación de las colonias en el medio de manera precoz, por ejemplo no obteniendo modificación alguna de la coloración de las colonias en el medio cuando se utiliza un sustrato de esterasa cromogénico, sin que la coloración se difunda en el medio de reacción, por lo tanto, concentrada a nivel de las colonias, sin que por ello las moléculas tengan un efecto nefasto sobre su crecimiento.

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

Los sustratos enzimáticos de esterasa apropiados para los fines de la invención son cualquier sustrato conocido por el experto en la materia que permiten poner en evidencia tal actividad enzimática. Tales sustratos pueden, por ejemplo, ser cromogénicos o fluorescentes y están descritos por ejemplo en el catálogo BIOSYNTH, Substrates and Reagents o www.biosynth.com o en el catálogo GLYCOSYNTH, enzyme substrates catalogue o www.glycosynth.co.uk.

A título de ejemplo de sustratos de esterasa, se pueden citar los derivados de indoxil-octanoato, indoxil-nonanoato o indoxil-decanoato, preferentemente los derivados indoxil-octanoato, más preferentemente sus derivados halogenados, más preferentemente 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 particularmente precoz.

Se observa como una ligera actividad esterasa después de 24h de incubación (actividad inferior a 0,6 sobre una escala de 0 a 4), la detección de los *Streptococcus agalactiae* puede ser mejorada añadiendo al menos otro sustrato enzimático. Debido a la propiedad particular de los *Streptococcus agalactiae* de no utilizar o 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* es muy reducida, de manera que esto modifique sólo débilmente el aspecto de las colonias obtenidas, se indicará únicamente de aquí en adelante que el *Streptococcus agalactiae* no es capaz de utilizar el sustrato de esterasa.

Así, la presente invención tiene por objeto un medio de reacción que comprende o que está constituido de un sustrato de esterasa que el *Streptococcus agalactiae* no es capaz de utilizar en menos de 18h después de la inoculación y de al menos un sustrato enzimático utilizado por *Streptococcus agalactiae*, diferente de un sustrato de esterasa.

Los sustratos enzimáticos diferentes de un sustrato de esterasa (sustrato no esterasa) apropiados para los fines de la invención son cualquier sustrato cuya utilización por una cepa confiere a la colonia un aspecto diferente del

aspecto obtenido durante la utilización del sustrato de esterasa. Tal aspecto diferente es, por ejemplo, una coloración diferente. Por otra parte, este sustrato no esterasa es tal que, cuando una cepa utiliza al mismo tiempo este sustrato no esterasa y el sustrato de esterasa (cepa diferente 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 reacción al mismo tiempo 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 esterasa), mientras que las otras cepas son capaces de utilizar bien únicamente el sustrato de esterasa (son +/-), o bien al mismo tiempo el sustrato de esterasa y el sustrato no esterasa (son +/+). Asimismo, cuando se combinan en un medio de reacción al mismo tiempo 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 únicamente el sustrato de esterasa (son +/-), o bien al mismo tiempo 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 +/+.

Así, por ejemplo, si se combina un sustrato de esterasa cromógeno que conlleva una coloración azul de las colonias cuando la colonia en cuestión utiliza el sustrato, y otro sustrato enzimático cromógeno que conlleva 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 incolora a ligeramente azul, bien sea azul, o bien violeta (rosa+azul). La coloración rosa y el aspecto incoloro a ligeramente azul son únicamente representativos de los *Streptococcus agalactiae* de la siguiente manera: bien la cepa es capaz de utilizar el sustrato no esterasa y la colonia se vuelve rosa (cepa -/+), o bien 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 de la siguiente manera: bien la cepa es capaz únicamente de utilizar el sustrato de esterasa y se vuelve azul (cepa +/-), o bien la cepa es capaz al mismo tiempo de utilizar el sustrato de esterasa y el otro sustrato enzimático, y se vuelve rosa y azul, es decir violeta (cepa +/+).

Del mismo modo, si se combina un sustrato de esterasa que absorbe la fluorescencia, que conlleva una extinción de fluorescencia cuando la colonia en cuestión utiliza el sustrato, y otro sustrato enzimático fluorescente que conlleva una fluorescencia a nivel de las colonias cuando la colonia en cuestión utiliza el sustrato, siendo este último sustrato utilizado por *Streptococcus agalactiae*, se pueden obtener dos tipos de colonias: bien unas colonias fluorescentes, o bien unas 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 del sustrato de esterasa. Las colonias poco o nada fluorescentes son representativas de las otras especies de la siguiente manera: bien la cepa es capaz únicamente de utilizar el sustrato de esterasa y es no fluorescente, o bien la cepa es capaz al mismo tiempo de utilizar el sustrato de esterasa y el otro sustrato enzimático y es poco o nada fluorescente.

Según un modo de realización, tales sustratos diferentes de un sustrato de esterasa apropiados para los fines 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.

Los sustratos enzimáticos de α -glucosidasa apropiados para los fines de la invención son cualquier sustrato conocido por el experto en la materia que permite poner en evidencia tal actividad enzimática. Tales sustratos pueden ser, por ejemplo, cromogénicos o fluorescentes y están descritos por ejemplo en el catálogo BIOSYNTH, Substrates and Reagents o www.biosynth.com o en el catálogo GLYCOSYNTH, enzyme substrates catalogue o www.glycosynth.co.uk.

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 umbeliferona y los sustratos a base de derivados de naftol.

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

Ejemplos de tales derivados de indoxilo comprenden los derivados de 3-indolil- α -D-glucopiranosido, preferentemente unos derivados halogenados de estos compuestos. A título de ejemplo 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 este último compuesto particularmente preferido.

Los sustratos enzimáticos de fosfatasa apropiados para los fines de la invención son cualquier sustrato conocido por el experto en la materia que permite poner en evidencia tal actividad enzimática. Tales sustratos pueden ser, por ejemplo, cromogénicos o fluorescentes y están descritos por ejemplo en el catálogo BIOSYNTH, Substrates and Reagents o www.biosynth.com.

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 umbeliferona y los sustratos a base de nitrofenilo.

Preferentemente, el sustrato enzimático de fosfatasa apropiado para los fines de la invención es un sustrato a base de derivados de indoxilo.

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

- 10 Los sustratos enzimáticos de β -celobiosidasa apropiados para los fines de la invención son cualquier sustrato conocido por el experto en la materia que permiten poner en evidencia tal actividad enzimática. Tales sustratos pueden ser, por ejemplo, cromogénicos o fluorescentes y están descritos por ejemplo en el catálogo BIOSYNTH, Substrates and Reagents o www.biosynth.com o en el catálogo GLYCOSYNTH, enzyme substrates catalogue o www.glycosynth.co.uk.

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 umbeliferona y los sustratos a base de nitrofenilo.

- 15 Preferentemente, el sustrato enzimático de β -celobiosidasa apropiado para los fines de la invención es un sustrato a base de derivado de indoxilo.

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 este último compuesto particularmente preferido.

- 20 Los sustratos enzimáticos de N-acetil-glucosaminidasa apropiados para los fines de la invención son cualquier sustrato conocido por el experto en la materia que permite poner en evidencia tal actividad enzimática. Tales sustratos pueden ser, por ejemplo, cromogénicos o fluorescentes y están descritos por ejemplo en el catálogo BIOSYNTH, Substrates and Reagents o www.biosynth.com o en el catálogo GLYCOSYNTH, enzyme substrates catalogue o www.glycosynth.co.uk.

- 25 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 umbeliferona y los sustratos a base de nitrofenilo.

Preferentemente, el sustrato enzimático de N-acetil-glucosaminidasa apropiado para los fines de la invención es un sustrato a base de derivado de indoxilo.

- 30 Ejemplos de tales derivados de indoxilo comprenden los derivados de 3-indolil- 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 este último compuesto particularmente preferido.

- 35 Los sustratos enzimáticos de β -glucosidasa apropiados para los fines de la invención son cualquier sustrato conocido por el experto en la materia que permiten poner en evidencia tal actividad enzimática. Tales sustratos pueden ser, por ejemplo, cromogénicos o fluorescentes y están descritos por ejemplo en el catálogo BIOSYNTH, Substrates and Reagents o www.biosynth.com o en el catálogo GLYCOSYNTH, enzyme substrates catalogue o www.glycosynth.co.uk.

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 umbeliferona y los sustratos a base de nitrofenilo.

- 40 Preferentemente, el sustrato enzimático de β -glucosidasa apropiado para los fines de la invención es un sustrato a base de derivado de indoxilo.

Ejemplos de tales derivados de indoxilo comprenden los derivados de 3-indolil- β -D-glucopiranósido tales como 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -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.

- 45 Según un modo de realización, el medio de reacción comprende i) un sustrato de esterasa que *Streptococcus agalactiae* no es capaz de utilizar en menos de 18h después de la inoculación y ii) un sustrato de fosfatasa o un sustrato de α -glucosidasa, siendo preferida la asociación sustrato de esterasa/sustrato de fosfatasa.

- 50 Según otro modo de realización, el medio de reacción comprende, además del sustrato de esterasa y el sustrato de fosfatasa o de α -glucosidasa, un sustrato enzimático seleccionado 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.

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

5 Este medio de reacción puede bien 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 reacción constituye también el medio de cultivo.

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

10 El agar es el medio tradicional sólido en microbiología para el cultivo de los microorganismos, pero es posible utilizar gelatina o 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 las descritas en el Handbook of Microbiological Media (CRC Press).

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

15 Los sustratos enzimáticos de la invención son utilizables en una amplia gama de pH, en particular pH 5,5 y 10.

La concentración del o de los sustratos enzimáticos en el medio de reacción está comprendida entre 10 y 2000 mg/l, preferentemente entre 50 y 500 mg/l, más preferentemente entre 80 y 400 mg/l, lo que constituye un modo de realización preferido de la invención.

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

El medio de reacción útil para los fines de la invención puede también comprender otros componentes útiles para mejorar la especificidad y/o la sensibilidad del procedimiento de la invención.

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

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

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

El medio de 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.

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

Ejemplos de antibióticos convenientes para los fines de la invención comprenden el aztreonam y la anfotericina B. Estos antibióticos están disponibles en el comercio por ICN, Squibb o Sigma.

40 La cantidad de cada antibiótico en el medio de reacción varía en función del antibiótico en cuestión y se determinará fácilmente por el experto en la materia.

El medio de reacción puede también comprender uno o más elementos en combinación, tales como aminoácidos, peptonas, hidratos de carbono, nucleótidos, minerales, vitaminas, tensioactivos, tampones, sales de fosfato, de amonio, de sodio, de metales. En las solicitudes de patente de la solicitante, EP 656 421 y WO99/09207 se describen unos ejemplos de medios.

45 La realización del procedimiento de la descripción puede efectuarse según las etapas siguientes, que consisten en:

a) inocular un medio de reacción tal como se ha definido anteriormente, con toda 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, lo que constituye otro objeto de la invención.

Las etapas de inoculación y de incubación son ampliamente conocidas por el experto en la materia.

Por ejemplo, la temperatura de incubación puede ser de 37°C. En lo que se refiere a la atmósfera de incubación, ésta es preferentemente aerobia.

- 5 La revelación se realiza a simple vista por visualización de un cambio de coloración que no difunde en el medio de 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 materia.

Las muestras biológicas a analizar son cualquier muestra clínica susceptible de contener *Streptococcus agalactiae*, como una extracción vaginal, una extracción de orina o cualquier muestra cuyo análisis pueda ayudar a un clínico dictar un diagnóstico.

- 10 La invención se entenderá mejor con la ayuda de los ejemplos siguientes, dados a título 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 reacción

- 15 Se han preparado los medios de reacción mezclando un extracto de corazón-cerebro (4,84 g/l; Solabia), infusión de carne (1,96 g/l; Solabia), biotina (1 g/l; Solabia), biotripcasa (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 del autoclave durante 15 minutos a 121°C, se añadió un sustrato enzimático de esterasa, tal como se indica anteriormente, a razón de 0,3 g/l; y después se enfrió al baño maría a 50°C.

* 5-bromo-4-cloro-3-indolil-octanoato (X-C8; Inalco), que da una coloración turquesa cuando se utiliza, y

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

Después, se han vertido los medios en placa de Petri para la inoculación ulterior de las 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 solicitante, puestas en suspensión en agua fisiológica, para dar unas colonias aisladas sobre cada uno de los medios. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas. Las colonias formadas se examinaron visualmente después de 18, 24 y más de 40 horas de incubación. Se anotó la coloración de estas colonias, el crecimiento, así como la intensidad de esta coloración (representativa de la actividad esterasa).

1.3. Resultados

Los resultados son dados en la tabla 1 siguiente y son expresados:

- 30 - 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, correspondiendo 0 a una ausencia de actividad y correspondiendo 4 a la presencia de una coloración muy intensa,
 - según el tiempo de incubación en horas (T).

Tabla 1

Cepas (n° de acceso)	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 agalactiae</i> (0101060)	18	0,4			0,4		
	24	0,7	T	0,3	0,7	R	0,3
	> 40	1,3	T	3	1,3	R	2

Cepas (n° de acceso)	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

Los resultados ponen en evidencia que los estreptococos B pueden ser detectados precozmente utilizando un sustrato enzimático de esterasa ya que presentan una actividad de nula a muy baja a las 18-24h.

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

Se ha repetido el modo de realización descrito antes en el ejemplo 1, con la diferencia de que se ha añadido, al mismo tiempo que los 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), los cuales dan una coloración rosa cuando se utilizan.

10 Los resultados son dados en la tabla 2 siguiente, en la que se da el crecimiento, la coloración y la intensidad, como en el ejemplo 1, y en la que R= Rosa/Rojo, RM= Rosa-Marrón, T= Turquesa, V= Verde, Vi= Violeta, A= Azul, Gvi= Gris-Violeta y GA = Gris-Azul

Tabla 2

Cepas (n° de acceso)	T	X-C8 + Rose-alfa-Glu			X-C8 + Rose-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> (8709013)	18	0,2	R	2	0,5	R	3
	24	0,3	R	2	0,5	R	3,5
	> 40	1	R	4	1,7	R	4
<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	GA	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	GA	3,5	1,3	GVi	3,5

Cepas (n° de acceso)	T	X-C8 + Rose-alfa-Glu			X-C8 + Rose-P		
		C	Co	I	C	Co	I
	> 40	1,3	GA	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

Esta 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*.

- 5 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

Se ha repetido el modo de realización descrito en el ejemplo 2, utilizando 0,3 g/l de X-C8, 0,2 g/l de Rosa-P, con la diferencia de que se ha añadido también 0,08 g/l de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-celobiósido (Cellobio) al mismo tiempo que los otros sustratos, así como 0,5 g/l de Na_2HPO_4 y 0,5 g/l de K_2HPO_4 antes del autoclave.

- 10 Se ha utilizado, a título de medio control, un medio únicamente con X-C8 y Rosa-P.

Los resultados son dados en la tabla 3 siguiente en la que se da el crecimiento, la coloración y la intensidad, como en el ejemplo 1, y en la que R= Rosa/Rojo, Ma= malva, Vi= Violeta, A= Azul, GA= Gris-Azul y Vi=Violín.

Tabla 3

Cepas (n° de acceso)	T	Control			X-C8 + Rose-P + Cellobio		
		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> (7701031)	18	1,3	R	4	1	R	4
	24	1,5	R	4	1,5	R	4
	> 40	1,5	R	4	1,5	R	4
<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	A	0,5
	24	0,5	R	0,1	0,4	A	1,3
	> 40	1	R	2,3	1	A	2,7
<i>Enterococcus faecium</i> (0002043)	18	1,5	Ma	1,7	1,3	A	3
	24	1,7	Ma	3	1,5	GA	4
	> 40	2	Vi	4	2	V1	4

- 15 Los resultados obtenidos en la 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, entre ellos un 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

Se ha repetido el modo de realización descrito en el ejemplo 3, con la diferencia de que se han utilizado 0,4 g/l de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -N-acetil-glucosaminida (X-NAGlu) en lugar de Celobio.

El medio control es idéntico al medio ensayado, con la diferencia de que no contiene X-NAGlu.

- 5 Los resultados son dados en la tabla 4 siguiente en la que se da el crecimiento, la coloración y la intensidad, como en el ejemplo 1, y en la que R= Rosa/Rojo, A= Azul, GR= Gris-Rosa y Mg =Magenta.

Tabla 4

Cepas (n° de acceso)	T	Control			X-C8 + Rose-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	A	3
	> 40	2,5	A	4	3	A	4
<i>Enterococcus faecium</i> (0002043)	18	0,5	GR	2	0,5	A	3
	24	0,8	GR	2,7	0,8	A	3,5
	> 40	1	Mg	4	1	A	4

- 10 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, entre ellos un sustrato de esterasa.

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

- 15 Se ha repetido el modo de realización descrito en el ejemplo 4, con la diferencia de que se han utilizado 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.

El medio control es idéntico al medio ensayado, con la diferencia de que no contiene X- β -Glu ni GreenA- β -Glu.

Los resultados son dados en la tabla 5 siguiente en la que se da el crecimiento, la coloración y la intensidad, como en el ejemplo 1, y en la que R= Rosa/Rojo, M= Malva, Vi= Violeta, A= Azul, GA= Gris-Azul.

Tabla 5

Cepas (n° de acceso)	T	Control			X-C8 + Rose-P + X- β -Glu			X-C8 + Rose-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

Cepas (n° de acceso)	T	Control			X-C8 + Rose-P + X- β -Glu			X-C8 + Rose-P + GreenA- β -Glu		
		C	Co	I	C	Co	I	C	Co	I
<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	A	3	0,3	A	0,5
	24	0,5	R	0,1	0,4	A	4	0,4	A	2
	> 40	1	R	2,3	1	A	4	1	A	3,5
<i>Enterococcus faecium</i> (0002043)	18	1,5	Ma	1,7	1,5	A	4	1,5	GA	4
	24	1,7	Ma	3	1,5	A	4	1,7	GA	4
	> 40	2	Vi	4	2	A	4	2	GA	4

Los resultados obtenidos en la 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, entre ellos un sustrato de esterasa.

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

Se ha repetido el modo de realización descrito en el ejemplo 1, con la diferencia de que se ha añadido, al mismo tiempo que los 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.

A título de medio control, se ha utilizado el mismo medio, pero sin solución fosfato.

10 Los resultados son dados en la tabla 6 siguiente en la que se da el crecimiento, la coloración y la intensidad, como en el ejemplo 1, y en la que R= Rosa y Mg= Magenta.

Tabla 6

Cepas (n° de acceso)	T	Control			Medio con solución fosfato		
		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

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

Ejemplo 7: Comparación de la sensibilidad y de 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

20 Para este estudio de sensibilidad y de especificidad, se ha utilizado un medio según la invención preparado como se describe para 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 ha utilizado el medio Granada (ref 10 077, BIOLYS, Francia) (Milieu Granada).

Se han sembrado 69 cepas de microorganismos, incluyendo 14 de *S. agalactiae*, se han dejado incubar a 37°C hasta 24h y a temperatura ambiente pasado este tiempo. Se han visualizado las colonias como se ha descrito anteriormente. La confirmación de las colonias sospechosas características de estreptococos B, es decir que aparecen rosas/rojas, se ha realizado mediante el ensayo de aglutinación utilizando el reactivo Slidex Strepto Kit según las recomendaciones del proveedor (bioMérieux, Francia). Las colonias no características, es decir diferentes de rosa o que tienen la coloración característica pero que dan una respuesta negativa al ensayo de aglutinación (cepas falsas positivas), se identificaron mediante las Galerías ID 32 Strep (bioMérieux, Francia).

Los resultados son expresados en % de buen diagnóstico con respecto a todos los ensayos en términos de sensibilidad y de especificidad y se dan en la tabla 7 siguiente, correspondiendo el % de sensibilidad al número de verdaderos positivos detectados en el medio por el número total de verdaderos positivos a detectar (*100) y correspondiendo el % de especificidad al número de verdaderos negativos detectados en el medio por el número total de verdaderos negativos a detectar (*100).

Tabla 7

	Sensibilidad y especificidad de detección de <i>S. agalactiae</i> en %					
	Medio Granada			Medio de la invención		
	18h	24h	> 40h	18h	24h	> 40h
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, muestran también que el medio de detección de la invención posee también una buena especificidad, especificidad mejorada después del enriquecimiento debido a un paso en caldo de Todd-Hewitt a las 18-24 horas a 35-37°C, con o sin 5% de CO₂ antes de la siembra de la gelosa (véanse las recomendaciones del CDC (Center for Disease Control), MMWR (Morbidity and Mortality Weekly Report), 16 de agosto de 2002, Vol. 51, n° RR-11)

Ejemplo 8: Utilización del medio a partir de muestras clínicas

Para este estudio, se ha utilizado el medio según la invención tal como el preparado descrito anteriormente en el ejemplo 7.

Se han utilizado en este estudio un total de 134 muestras/legras que provienen de extracciones vaginales o endocervicales de mujeres embarazadas.

Cada legra se ha emulsionado en 1 ml de agua fisiológica estéril y 100 µl de esta solución se han depositado, por un lado, en una gelosa Columbia que contiene 5% de sangre de caballo y, por otro lado, sobre el medio utilizado en el procedimiento de la invención. Por otra parte, se han utilizado 100 µl de 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 y después se incubaron durante 20h a 37°C en aerobiosis.

La confirmación de las colonias sospechosas características de Estreptococo B, es decir que aparecen rosas/rojas, se ha realizado mediante un ensayo de aglutinación utilizando el reactivo Slidex Strepto Kit según las recomendaciones del proveedor (bioMérieux, Francia).

Entre las 134 muestras, 112 se sembraron sobre los medios gelosados, por un lado, directamente a partir de la suspensión en agua fisiológica y, por otro lado, después de un enriquecimiento en caldo de Todd Hewitt. Las 22 muestras restantes se sembraron en los medios gelosados únicamente, directamente a partir de la suspensión en agua fisiológica.

Los resultados, expresados en porcentaje medio de sensibilidad y de especificidad son presentados en la tabla 8 siguiente.

Tabla 8

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

5 Los resultados de la tabla 8 anterior muestran que el medio de la invención, utilizado con unas 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 en el medio de la invención frente a 19 en el medio Columbia, y sólo hay un único resultado falso + en el medio esterasa frente a 24 en la gelosa Columbia. Se puede incluso señalar que los resultados son mejores que cuando se ha ensayado el medio con las cepas de laboratorio.

10

REIVINDICACIONES

1. Medio de reacción que comprende (i) un sustrato enzimático de esterasa que el *Streptococcus agalactiae* no es capaz de utilizar en menos de 18h después de la inoculación, (ii) un sustrato enzimático seleccionado entre los sustratos de β -celobiosidasa, los sustratos de N-acetil-glucosaminidasa y los sustratos de β -glucosidasa, y (iii) un sustrato de fosfatasa.
2. Medio de reacción según la reivindicación 1, caracterizado por que el sustrato (ii) es un sustrato de β -celobiosidasa.
3. Medio de reacción según la reivindicación 1, caracterizado por que el sustrato (ii) es un sustrato de N-acetil-glucosaminidasa.
4. Medio de reacción según la reivindicación 1, caracterizado por que el sustrato (ii) es un sustrato de β -glucosidasa.
5. Medio de reacción según la reivindicación 4, caracterizado por que el sustrato β -glucosidasa es un sustrato de indoxilo.
6. Medio de reacción según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que el sustrato de esterasa se selecciona ente los derivados de indoxilo octanoato, de indoxilo nonanoato y de indoxilo decanoato.
7. Medio de reacción según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que la concentración en cada sustrato enzimático está comprendida entre 10 y 2000 mg/l.
8. Medio de reacción según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que comprende también unas soluciones fosfato.
9. Medio de reacción según la reivindicación 8, caracterizado por que las soluciones fosfato se seleccionan entre Na_2HPO_4 y K_2HPO_4 .
10. Medio de reacción según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que comprende también una mezcla de inhibidores para inhibir o limitar el crecimiento de las cepas indeseables.
11. Medio de reacción según la reivindicación 10, caracterizado por que los inhibidores son unos antibióticos.
12. Medio de reacción según la reivindicación 11, caracterizado por que los antibióticos son Aztreonam y anfotericina B.