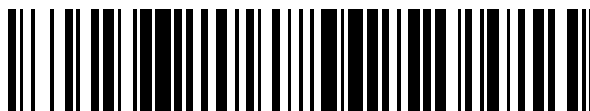


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 824**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/14 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.06.2009** **PCT/FR2009/051201**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2010** **WO10004164**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2009** **E 09784426 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016** **EP 2291537**

54 Título: **Medio de cultivo que comprende un compuesto inhibidor o retardador de germinación de esporas**

30 Prioridad:

26.06.2008 FR 0854275

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

17.04.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

COSTA, AURÉLIEN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 608 824 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 cultivo que comprende un compuesto inhibidor o retardador de germinación de esporas

5 El campo de la invención es el del control microbiológico clínico o industrial. Más particularmente, la presente invención se refiere esencialmente a un medio de cultivo de microorganismos diana, susceptibles de estar presente en una muestra, más particularmente en una muestra alimenticia o medioambiental, comprendiendo dicho medio de cultivo al menos un compuesto inhibidor o retardador de la germinación de esporas.

10 La presente invención se describirá particularmente a continuación, en referencia a unos productos deshidratados, sin que esto, sin embargo, constituya una limitación a la invención.

15 La calidad y la seguridad son las preocupaciones principales de la industria agroalimentaria a nivel mundial. En las materias primas y los productos finales, debe ser posible detectar, identificar y cuantificar la flora microbiana y garantizar así el valor de los productos, desde su fabricación hasta su consumo. Se analizan así los indicadores de calidad del producto, reflejo de un índice de contaminación global por una flora de alteración a la que pertenecen las enterobacterias como *Escherichia coli*, los estafilococos de coagulasa positiva, las *Pseudomonas*, los *Bacillus*, las levaduras, los mohos, etc. En particular, la búsqueda de estafilococos de coagulasa positiva en los polvos de leche se ha vuelto en la actualidad imprescindible.

20 Entre los estafilococos de coagulasa positiva, *Staphylococcus aureus* es la especie más patógena del género *Staphylococcus*, aunque es comensal en el hombre. En efecto, puede ser responsable de intoxicaciones alimenticias, de infecciones localizadas supuradas, y en algunos casos extremos, de septicemias en sujetos que han sufrido un trasplante o portador de prótesis cardíaca.

25 La dificultad de la realización de un medio de cultivo que permite el recuento específico de los estafilococos de coagulasa positiva reside:

30 * no solamente en la necesidad que este medio de cultivo presenta una buena estabilidad que permite la detección de una contaminación muy baja en estafilococos de coagulasa positiva (del orden de 10 unidades que forman colonia (UFC)/g) presentes en dicho medio, sino también

35 * en la necesidad de poder inhibir unos niveles a veces muy elevados de otros gérmes, y muy particularmente de gérmes tales como los de *Bacillus* que son fenotípicamente cercanos a los estafilococos de coagulasa positiva.

40 En efecto, en lo que se refiere precisamente a los gérmes de *Bacillus*, la diferenciación de los estafilococos de coagulasa positiva con respecto a los *Bacillus* por unos agentes selectivos resulta particularmente delicada; afectando generalmente también la mayoría de los inhibidores eficaces sobre una de estas bacterias a la otra bacteria. Así, se ha observado que el medio de cultivo tradicional de tipo Baird-Parker-RPF (plasma de conejo + fibrógeno bovino) no permitía una inhibición eficaz y sistemática de *Bacillus*.

45 Por otro lado, en el campo agroalimentario, los fabricantes recurren frecuentemente a procedimientos de fabricación de productos por deshidratación, cuyas condiciones permiten generalmente la eliminación de la mayoría de los gérmes, en particular en su forma vegetativa. Ahora bien, las bacterias del género *Bacillus*, por su capacidad para formar unas esporas, son capaces de resistir a condiciones extremas tales como las utilizadas durante la deshidratación. Se encuentran entonces en los productos deshidratados. Así, se ha observado que el nivel de contaminación en *Bacillus* de leches en polvo podía ser importante.

50 Además, la mayoría de las materias primas necesarias para la realización de medios de cultivo se presentan también frecuentemente en forma deshidratada (polvo).

Estas materias primas secas se contaminan también regularmente por estos gérmes de *Bacillus* que, tal como se ha explicado anteriormente, resisten a las condiciones de deshidratación.

55 Se deduce que se llegan a observar frecuentemente unos resultados falsos positivos en el control microbiológico de los productos deshidratados tales como los polvos de leche, debido a que unas bacterias del género *Bacillus* se analizan, equivocadamente, como estafilococos de coagulasa positiva.

60 Por el contrario, el riesgo de falso-negativos es también importante en la medida en la que la cantidad frecuentemente importante de *Bacillus*, y siempre muy superior a la de los estafilococos de coagulasa positiva, oculta frecuentemente la presencia de estos últimos.

65 Se comprende entonces fácilmente que una cantidad importante de *Bacillus* resulta un obstáculo importante para la realización de un medio de cultivo destinado a la identificación, incluso al recuento de bacterias diana tales como estafilococos de coagulasa positiva, y puede conducir a una mala estimación de la presencia de estos gérmes presentes en una muestra de análisis tal como una muestra alimenticia. La muestra se define como una pequeña

parte o pequeña cantidad aislada de una entidad para el análisis.

El documento EP-B-1 390 524 describe unos medios de detección específica de *Staphylococcus aureus* y unos procedimientos de identificación y/o de recuento que utiliza tales medios. La especificidad de la detección aumenta por la adición en el medio de una mezcla de inhibidores del crecimiento de microorganismos no estafilococos susceptibles de estar presentes en el medio.

A pesar de que diferentes métodos de desarrollo de un medio de cultivo para el recuento específico de los estafilococos de coagulasa positiva hayan sido ensayados, no llevaron al éxito esperado, en cuanto a la limitación del impacto de los *Bacillus*.

Así, unos agentes selectivos de tipo antibióticos no permiten combinar una buena selectividad frente a gérmenes de *Bacillus* con el mantenimiento de una buena sensibilidad frente a gérmenes de estafilococos de coagulasa positiva.

Dos publicaciones que datan de varias decenas de años hace referencia a la acción de la D-alanina sobre la germinación de las esporas.

Así, se conoce por la publicación de HALMANN M., KEYNAN A., 1962 "Stages in germination of spores of *Bacillus Licheniformis*", J. Bacteriol. 84:1187-1193 que la L-alanina deshidrogenasa es necesaria para la primera etapa bioquímica de germinación de las esporas de *Bacillus Licheniformis* y que esta primera etapa puede ser inhibida por la D-alanina, diversas sales, el piruvato de etilo, y el octanol.

Se menciona también en la publicación de YASUSA-YASAKI Yoko *et al.*, 1978, "Inhibition of *Bacillus subtilis* Spore Germination by Various Hydrophobic Compounds: Demonstration of Hydrophobic Character of L-alanine Receptor Site", Journal of Bacteriology, Vol.136, n° 2, p 484-490 que los inhibidores de la L-alanina que causan la iniciación de la esporulación son:

- el octanol sobre *Bacillus licheniformis* y *Bacillus cereus*,
- el alcohol feniletílico sobre *Bacillus megaterium*,
- la 8-hidroxiquinolina sobre *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*,
- el etanol y la dicitohexilcarbodiimida sobre *Bacillus cereus*.

Además, Yasuda Y. *et al.*, 1993, "Regulation of L-alanine germination of *Bacillus subtilis* spores by alanine racemase", Amino Acids, vol. 4, n° 1-2, p. 89-99, describe el estudio de la regulación por la alanina racemasa de la germinación de las esporas de *Bacillus subtilis* por la L-alanina y divulga que la D-alanina y la difenilamina son unos inhibidores de la germinación de las esporas de *Bacillus subtilis*.

Los estudios publicados a continuación se centran esencialmente en la caracterización del mecanismo de germinación de las formas esporuladas de gérmenes, de los cuales el género *Bacillus* es un ejemplo.

Dichos estudios han descrito precisamente las diferentes etapas que intervienen en el proceso de germinación.

Este conocimiento del mecanismo de germinación se ha utilizado esencialmente, hasta ahora, para favorecer la germinación de las esporas de microorganismos, en particular de *Bacillus*, con varios objetivos:

- acelerar la germinación y así mejorar el crecimiento/detección en unos medios de cultivo
- favorecer la germinación para eliminar los gérmenes en su forma vegetativa, que son entonces mucho más sensibles a los agentes inhibidores presentes en forma de antibióticos en los medios de cultivo o en forma de detergentes o desinfectantes en algunos procedimientos de limpiezas industriales, estando otros procedimientos, por su parte, basados en tratamientos a altas temperaturas.

La presente invención propone remediar los inconvenientes antes mencionados, aportando una solución a contracorriente de las ya identificadas y que no consiste en favorecer la germinación de las esporas, sino, al contrario, en bloquearla, o al menos retrasarla.

Representa, por otro lado, una alternativa muy interesante para el uso de antibióticos, cuyos espectros de acción no son generalmente compatibles con la necesidad de diferenciación entre los microorganismos diana, tales como los estafilococos de coagulasa y unos microorganismos, tales como *Bacillus*, susceptibles de interferir la detección, la identificación, incluso el recuento de dichos microorganismos diana.

La presente invención posee además la ventaja de no modificar las cualidades nutritivas del medio de cultivo, lo que permite evitar los problemas de especificidad antes evocados y hacer así el medio de cultivo desarrollado más

particularmente apto para el análisis de los productos tales como los productos deshidratados, en los que el nivel de *Bacillus* es importante.

Por ello, uno de los objetivos esenciales de la presente invención consistió en realizar un medio de cultivo de microorganismos diana, en particular bacterias, que fuese capaz bloquear, al menos retrasar, la germinación de esporas eventualmente contenidas en la muestra a analizar, sin que esto tenga incidencia sobre el crecimiento de dichos microorganismos diana.

Un primer objetivo de la invención consiste así en un medio de cultivo y de detección de estafilococos de coagulasa positiva, que comprende:

* al menos un sustrato específico, natural o sintético, que permite la detección de al menos una actividad metabólica de dichos estafilococos de coagulasa positiva, cuyo producto de degradación hace variar el pH,

permitiendo un indicador de pH revelar el consumo de dicho sustrato,

* al menos un compuesto inhibidor o retardador de la germinación de esporas de *Bacillus* susceptible de interferir con el cultivo y la detección de dichos estafilococos de coagulasa positiva, siendo dicho compuesto o retardador de germinación de esporas seleccionado del grupo que comprende la D-alanina, la difenilamina, los alcoholes de fórmula $C_nH_{2n+2}OH$ en la que n varía de 6 a 12, preferentemente el octanol, el nonanol, el decanol, los inhibidores de enzimas de tipo tripsina y/o sus mezclas.

Preferentemente, los estafilococos de coagulasa positiva son *Staphylococcus aureus*.

En el sentido de la presente invención, el sustrato es un sustrato metabólico, tal como una fuente de carbono o de nitrógeno, cuyo producto de degradación hace variar el pH, variación detectable gracias a un indicador de pH. El indicador de pH es una sustancia química cuyo color varía en función de modificaciones del pH asociadas al crecimiento microbiano. Se citarán como ejemplos de cromóforos el rojo neutro, el azul de anilina, el azul de bromocresol. En un segundo modo de realización, el indicador de pH es un fluoróforo (por ejemplo la 4-metilumbelliferona, los derivados del aminocumarina o los derivados de la resorufina).

El sustrato se puede seleccionar también entre cualquier sustrato que puede ser hidrolizado en un producto que permite la detección, directa o indirecta, de una actividad enzimática específica del microorganismo buscado. En el caso de la detección directa, el sustrato comprende una primera parte específica de la actividad enzimática y una segunda parte que actúa como marcador, que puede ser cromógeno o fluorescente.

El medio de cultivo, objeto de la invención, puede estar en forma de polvo, en forma de gel o en forma de líquido listo para el uso, es decir listo para la inoculación en tubo, frasco, o sobre caja de Petri. En el caso de un medio gelificado, el agar es el agente gelificante tradicional en microbiología para el cultivo de los microorganismos, pero es posible utilizar gelatina o agarosa. Finalmente, el medio puede ser envasado en una botella, un cartucho o una tarjeta específicos de un aparato automatizado de bacteriología (se citará a título de ejemplo la tarjeta Vitek®, la tarjeta Tempo® y la botella BacT/ALERT®, comercializados por la solicitante). En este caso, el compuesto retardador o inhibidor puede presentarse en forma de una solución independiente destinada a ser añadida al medio de cultivo antes de su uso.

Entre las muestras de origen alimenticio, se pueden citar de manera no exhaustiva una muestra de productos deshidratados tales como los polvos de leche, los cereales, las sopas en polvos, las preparaciones de pasteles. Este es también el caso de la repostería. Una muestra alimenticia puede finalmente proceder de una alimentación destinada a los animales, tal como en particular harinas animales.

Se mencionarán también las muestras relacionadas con el medioambiente, tales como las muestras de superficie, de agua, de aire.

Según un modo de realización preferido, la concentración del compuesto inhibidor o retardador de la germinación de las esporas, en dicho medio, está comprendida entre 0,01 y 1 mol/l, preferiblemente 0,05 y 0,1 mol/l.

El indicador de pH que permite revelar el consumo del sustrato, es preferiblemente un cromóforo o un fluoróforo.

Tradicionalmente, el sustrato puede comprender una primera parte específica de la actividad metabólica a revelar y una segunda parte que actúa como marcador fluorescente.

Alternativamente, el sustrato puede comprender una primera parte específica de la actividad metabólica a revelar y una segunda parte que actúa como marcador cromógeno.

Un segundo objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento de detección de microorganismos diana susceptibles de estar presentes en una muestra, que comprende las etapas que consisten en:

- a) poner en contacto dicha muestra con un medio de cultivo según la invención,
 b) incubar dicho medio de cultivo en unas condiciones aptas para la multiplicación celular de microorganismos,
 c) detectar la presencia de dichos microorganismos diana.

La etapa c) del procedimiento según la invención puede consistir en medir la variación del nivel de fluorescencia en el medio de cultivo con la ayuda de un lector de fluorescencia, correspondiendo esta variación por ejemplo a una variación del pH en dicho medio de cultivo.

Alternativamente, la etapa c) puede consistir en identificar las colonias. En este caso, el medio de cultivo según la invención se presenta típicamente en forma sólida, en particular en forma de medio de agar en cajas de Petri. Al retrasarse la germinación de las esporas, las bacterias de interés crecen en prioridad y previamente en el medio de cultivo, en comparación con otras bacterias. Así, en el caso de una lectura precoz de cajas de Petri (16 horas después de la inoculación por ejemplo), sólo las colonias de bacterias de interés pueden ser visibles. En el caso de una lectura más tardía (24 horas después de la inoculación por ejemplo), ésta consiste en diferenciar las colonias de grandes tamaños, de las colonias de pequeños tamaños. Las colonias de bacterias obtenidas por germinación de las esporas son de menor tamaño que las de las bacterias diana que se desarrollan normalmente. Es entonces fácil diferenciar entre las bacterias diana y las otras bacterias.

Según un modo particular de realización, el procedimiento según la invención puede comprender una etapa suplementaria de recuento de microorganismos diana. Tal etapa de recuento se realiza preferentemente según el método del Número Más Probable (NMP). Este método se explica en la patente EP 1 105 457 a nombre de la solicitante.

Otro objeto de la presente invención se refiere a la utilización de al menos un compuesto retardador o inhibidor de la germinación de esporas de microorganismos para la preparación del medio de cultivo de la invención.

Otro objeto de la presente invención se refiere a la utilización de la D-alanina para la preparación del medio de cultivo de la invención destinado a la identificación de los estafilococos de coagulasa positiva tal como *Staphylococcus aureus*.

Un último objeto de la invención se refiere a la utilización del medio de cultivo de la invención para la detección, la identificación, incluso el recuento de los estafilococos de coagulasa positiva.

La realización del medio de cultivo según la invención presenta la ventaja de ser totalmente compatible con las condiciones tradicionales de los procedimientos de fabricación de los medios de cultivo, dado que los compuestos inhibidor o retardador de la germinación de esporas son generalmente estables en un intervalo importante de valores de temperatura, al contrario que los agentes antibióticos. Por otro lado, estos compuestos son frecuentemente de un coste de fabricación reducido.

Los objetivos y ventajas de la presente invención se entenderán mejor a la luz del ejemplo siguiente, en relación con el dibujo, en el que:

La figura 1 es un gráfico en histogramas que muestra la distribución de CV en relación al nivel de fluorescencia obtenidos después de la incubación con muestras ensayadas en medio de cultivo con y sin D-alanina.

Ejemplo:

El ejemplo descrito a continuación ilustra el efecto inhibidor de la D-alanina en la esporulación de gérmenes de tipo *Bacillus* (tales como *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thuringiensis/cereus*).

Para hacer esto, se han ensayado 59 muestras de productos de polvos de leche, susceptibles de contener gérmenes de *Bacillus*, no contaminados además por *Staphylococcus aureus*.

Para estudiar el efecto inhibidor de la D-alanina, se han ensayado dos medios de cultivo:

- medio 1: medio de cultivo sin D-alanina,
- medio 2: medio de cultivo en presencia de D-alanina a una concentración final en el medio comprendida entre 0,05 y 0,1 mol/l (concentración final en el medio).

La composición de dicho medio de cultivo es la siguiente (en g/l, concentración final en el medio con o sin D-alanina):

Peptonas animales (bovinas y porcinas) y vegetales	12,5
Azúcares y suplementos de crecimiento	11
Sistema tampón	10
Agentes selectivos (antibióticos, sales)	10,25
Indicador de pH fluorescente	0,06
antiespuma	0,4

Las muestras se han preparado conforme a la norma ISO 8261: 2001 (que se refiere a la leche y a los productos lácteos y relativa a las "líneas directivas generales para la preparación de muestras para ensayo, de la suspensión madre y de las diluciones decimales para el examen microbiológico") según las etapas siguientes:

- a) pesado de 10 gramos de la muestras y colocación en una bolsa Stomacher[®],
- b) adición de 90 ml de diluyente de sal de triptona previamente calentada a 45°C para obtener una dilución inicial de 1/10 de la muestra,
- c) trituración con la ayuda de un aparato Stomacher[®] durante un minuto,
- d) colocación y agitación de la bolsa Stomacher[®] durante 5 minutos a 45°C al baño maría,
- e) extracción de 1 ml de muestra (diluida a la décima) en 3 ml de medio de cultivo para obtener una dilución de 1/40,
- f) incubación durante un tiempo comprendido entre 24 y 27 horas a una temperatura de 37°C,
- g) lectura del medio de cultivo por fluorescencia y determinación del nivel de contaminación de la muestra por gérmenes mediante la técnica del número más probable.

La lectura consiste en una medición de la fluorescencia del medio de cultivo obtenido después de la incubación. Una variación importante de los valores de fluorescencia demuestra una acidificación del medio resultante del crecimiento de uno o varios gérmenes.

Los CV de fluorescencia se calcularon a partir de las muestras ensayadas (no contaminadas por *Staphylococcus aureus*).

Cuando más elevado sea el CV, más elevada será la acidificación del medio. Lo que demuestra un crecimiento de los gérmenes presentes en el medio de cultivo. A la inversa, cuanto menos elevado sea el CV, menos elevada será la acidificación, lo que refleja un crecimiento menor de los gérmenes. La especificidad del medio es por lo tanto mejor y el riesgo de falsos positivos es por lo tanto menor (resultado falso positivo relacionado con la acidificación del medio por una bacteria de otro germen que *Staphylococcus aureus*).

Al no estar en este ejemplo contaminadas las muestras ensayadas por *Staphylococcus aureus*, las acidificaciones observadas están relacionadas con el crecimiento no específico de diferentes gérmenes diferentes de *Staphylococcus aureus* identificados como pertenecientes por pertenecer a *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thuringiensis/cereus*.

Los perfiles obtenidos y presentados en forma de histogramas, tales como se representan en la figura 1, muestran una diferencia importante en la distribución de los CV entre los dos medios de cultivo:

Los CV obtenidos con el medio 1 (sin D-alanina) se distribuyen en valores comprendidos entre 0 y 24, mientras que el conjunto de los valores obtenidos con el medio 2 (con D-alanina) son inferiores a 6 y en su gran mayoría inferiores a 3 (muy ligera acidificación).

El uso de D-alanina en el medio de cultivo permite disminuir en gran medida los valores de CV obtenidos después de la incubación del medio. Los CV están, en el caso estudiado, relacionados con las acidificaciones no específicas, por lo tanto la adición de D-alanina en el medio le confiere una mejor especificidad frente a *Bacillus* presentes en este tipo de muestra en forma esporulada.

La tabla 1 siguiente resume los recuentos obtenidos con o son D-alanina en el medio de cultivo.

Tabla 1

Recuento NMP	D-Alanina ensayada			
	Medio 1		Medio 2	
	%	N	%	N
< 10	50,85	30	89,83	53
10 < Num <50	42,37	25	10,17	6
50 < Num <100	6,78	4	0,00	0
Todos	100,00	59	100,00	59

Con NMP: número más probable

- 5 Se constata que entre las 59 muestras ensayadas, el medio 1 ha conservado una buena especificidad en el 50,85% de los resultados de recuento obtenidos (NMP<10).

Se han obtenido el 49,15% de los resultados falsamente positivos y relacionados con el crecimiento de *Bacillus*, de los cuales 6,78% dan unos resultados de recuento superior a 50 UFC/g.

- 10 La adición de D-alanina en el medio ha permitido mejorar el porcentaje de resultados <10 del 50,85% al 89,83%. El porcentaje de resultados falsos positivos se ha reducido entonces del 49,15% al 10,17%, y ningún resultado de falso positivo obtenido excede 50 UFC/gramo con el uso de D-alanina.

15

REIVINDICACIONES

1. Medio de cultivo y de detección de estafilococos de coagulasa positiva, que comprende:

5 * al menos un sustrato específico, natural o sintético, que permite la detección de al menos una actividad metabólica de dichos estafilococos de coagulasa positiva, cuyo producto de degradación hace variar el pH,

* un indicador de pH que permite revelar el consumo de dicho sustrato,

10 * al menos un compuesto inhibidor o retardador de la germinación de esporas de *Bacillus* susceptible de interferir con el cultivo y la detección de dichos estafilococos de coagulasa positiva, siendo dicho compuesto inhibidor o retardador de germinación de esporas seleccionado del grupo que comprende la D-alanina, la difenilamina, los alcoholes de fórmula $C_nH_{2n+2}OH$ en la que n varía de 6 a 12, preferentemente el octanol, el nonanol, el decanol, los inhibidores de enzimas de tipo tripsina y/o sus mezclas.

15 2. Medio de cultivo según la reivindicación 1, en el que la cantidad del compuesto inhibidor o retardador de la germinación de esporas, en dicho medio, está comprendida entre 0,01 y 1 mol/l, preferiblemente 0,05 y 0,1 mol/l.

20 3. Medio de cultivo según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el indicador de pH que permite revelar el consumo del sustrato es un cromóforo o un fluoróforo.

4. Medio de cultivo según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el sustrato comprende una primera parte específica de la actividad metabólica a revelar y una segunda parte que actúa como marcador cromógeno.

25 5. Medio de cultivo según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el sustrato comprende una primera parte específica de la actividad metabólica a revelar y una segunda parte que actúa como marcador fluorescente.

30 6. Medio de cultivo según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que los estafilococos de coagulasa positiva son unos *Staphylococcus aureus*.

7. Procedimiento de detección de estafilococos de coagulasa positiva susceptible de estar presentes en una muestra, que comprende las etapas que consisten en:

35 a) poner en contacto dicha muestra con un medio de cultivo según una de las reivindicaciones 1 a 6,

b) incubar dicho medio de cultivo en condiciones aptas para la multiplicación celular de microorganismos,

c) detectar la presencia de dichos estafilococos de coagulasa positiva.

40 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la etapa c) consiste en medir la variación del nivel de fluorescencia en el medio de cultivo con la ayuda de un lector de fluorescencia, correspondiendo esta variación a una variación del pH en dicho medio de cultivo.

45 9. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la etapa c) consiste en identificar las colonias.

10. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la etapa c) consiste en diferenciar las colonias de grandes tamaños, de las colonias de pequeños tamaños.

50 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 7 a 10, en el que la muestra es una muestra alimenticia o medioambiental.

12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 7 a 11, que comprende una etapa suplementaria de recuento de microorganismos diana.

55 13. Utilización de al menos un compuesto que retarda o que inhibe la germinación de esporas de microorganismos para la preparación de un medio de cultivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

14. Utilización de D-alanina para la preparación de un medio de cultivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 destinado a la identificación de los estafilococos de coagulasa positiva tal como *Staphylococcus aureus*.

60 15. Utilización de un medio de cultivo según una de las reivindicaciones 1 a 6, para la detección, la identificación, incluso el recuento de los estafilococos de coagulasa positiva tal como *Staphylococcus aureus*.

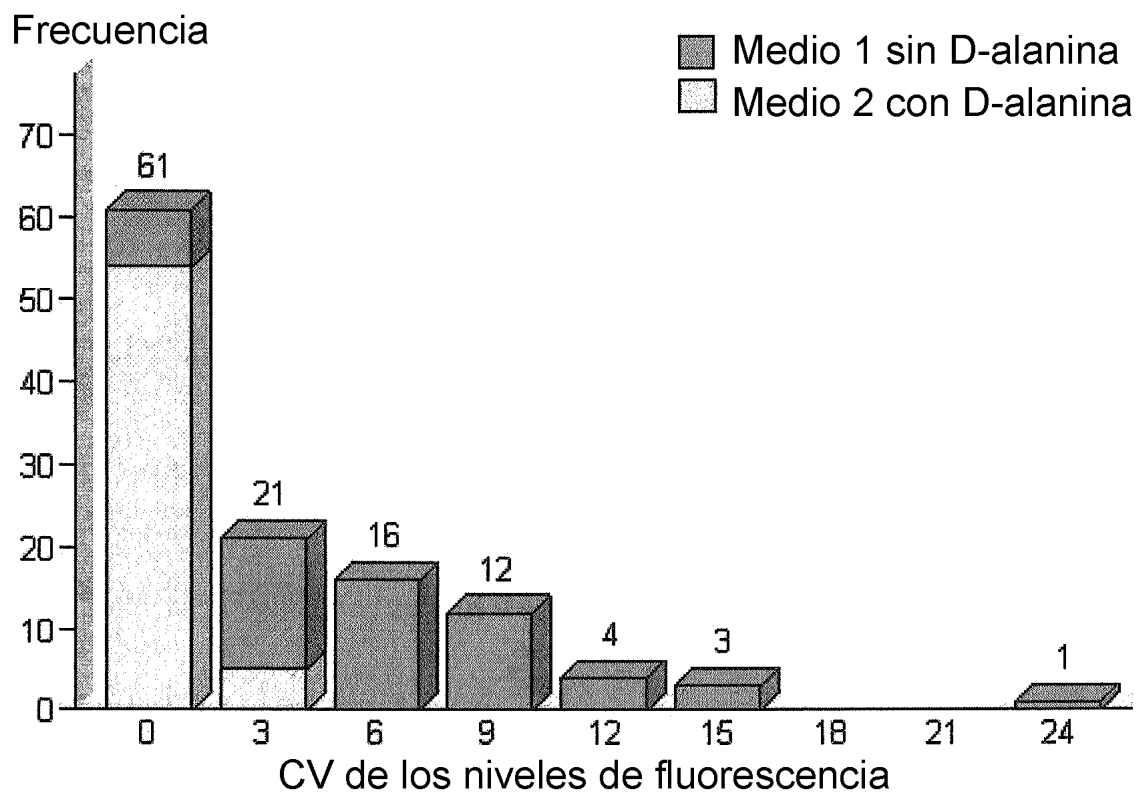


Fig.1