

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 076**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.10.2009 PCT/FR2009/051908**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.04.2010 WO2010040951**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2009 E 09755979 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2344662**

54 Título: **Medio de reacción para las bacterias Staphylococcus aureus resistentes a la metilina (MRSA)**

30 Prioridad:

08.10.2008 FR 0856814

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

20.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ORENGA, SYLVAIN;
ROBICHON, DENIS y
ZAMBARDI, GILLES**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 618 076 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 reacción para las bacterias *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA)

5 La presente invención se refiere a un medio de cultivo para la detección de las bacterias *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (SARM o MRSA). La invención se refiere también a la utilización de este medio, así como a un método para identificar unas bacterias MRSA.

10 Los *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina son unas cepas de *Staphylococcus aureus*, caracterizadas por su resistencia a un antibiótico, la meticilina, y a los antibióticos relacionados, tal como la oxacilina. Generalmente, esta resistencia está conferida por la expresión de un gen, *mecA*, que conlleva la producción de una proteína modificada, PLP2a (también denominada PBP 2a o PBP 2').

15 Las bacterias MRSA representan un alto porcentaje de las infecciones nosocomiales, y son a menudo el origen de problemas de salud graves y potencialmente mortales. Las MRSA, transmitidas generalmente de manera cruzada entre los pacientes a través el personal sanitario, son muy contagiosas y responsables de infecciones endémicas muy difíciles de controlar.

20 Además de un tratamiento adecuado, el diagnóstico de los portadores de MRSA y el aislamiento de los pacientes colonizados constituye el método más eficaz, actualmente recomendado por los organismos oficiales tales como la Society for Healthcare Epidemiology of America (Sociedad americana para la epidemiología hospitalaria). Un diagnóstico precoz y sistemático es, por lo tanto, esencial. La detección de las MRSA puede llevarse a cabo mediante diferentes técnicas.

25 Por lo tanto, así posible detectar las MRSA mediante técnicas de biología molecular. A este respecto, se puede citar en particular la patente europea EP 0 887 424. Sin embargo, tales métodos siguen siendo costosos en las pruebas de rutina, y requieren un personal cualificado. Es asimismo posible utilizar unos medios de cultivo convencionales para detectar los *Staphylococcus aureus*, tal como el medio descrito en la patente europea EP 1 390 524. La detección de MRSA se lleva a cabo entonces en una etapa suplementaria, mediante un ensayo de aglutinación específico, (Slidex MRSA, bioMérieux) o por un método de difusión sobre agar-agar en presencia de un disco de oxacilina (recomendaciones del Comité de Antibiograma de la Sociedad Francesa de Microbiología).

35 Es asimismo posible poner en cultivo las bacterias susceptibles de ser unas MRSA en medios agar-agar en presencia de antibióticos. Tales medios pueden también ser cromógenos, lo que facilita la lectura y la detección de las MRSA. Se puede citar en particular el medio descrito en la patente europea EP 1 543 147. Sin embargo, al ser poco específica la detección de una actividad fosfatasa en las condiciones descritas, es necesario combinarla con la detección de varias otras actividades enzimáticas, lo que reduce la fertilidad del medio y aumenta su coste.

40 Además, el documento WO 2004/063391 describe unos métodos de detección de microorganismos resistentes a antibióticos (por ejemplo MRSA) que comprenden el cultivo de dichos microorganismos en o sobre agar cromógeno previamente suplementado por al menos un antibiótico β -lactamina, por ejemplo cualquier combinación de cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación. En particular, D1 considera la combinación Cefoxitina-Cefotaxima y menciona también la utilización de carbapenemas y monobactamas. X-gal y X-glu son citados como agentes cromógenos.

45 Wertheim H. *et al.*, J. Clin. Microbiol., vol. 39, nº 7, julio de 2001: 2660-2662 describe un método de detección de MRSA basado en la creación de un nuevo medio selectivo que contiene rojo fenol, manitol, aztreonam (monobactama) y ceftizoxima (cefalosporina de tercera generación).

50 La invención propone resolver las lagunas del estado de la técnica presentando un nuevo medio de detección sensible, específico, y rápido para aislar e identificar unos *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA).

55 De manera sorprendente, los inventores han puesto en evidencia que la utilización de una combinación de antibióticos, a una concentración baja y predeterminada, permitía obtener un excelente medio de detección para aislar e identificar unos *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA). Este efecto es tanto más sorprendente cuando los antibióticos, utilizados por separado, no permiten de ninguna manera diferenciar unas MRSA a las concentraciones según la invención.

60 Antes de seguir, las definiciones siguientes, de ninguna manera limitativas, permitirán comprender mejor la invención.

En el sentido de la presente invención, se entiende por medio de reacción, un medio que comprende todos los elementos necesarios para la supervivencia y/o el crecimiento de microorganismos, tales como los *Staphylococcus aureus*.

65 Este medio de reacción puede servir únicamente o bien 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 inoculación y, en el segundo caso, el medio de reacción constituye también el medio de cultivo.

El medio de reacción puede ser sólido, semi-sólido o líquido. Por medio sólido, se entiende por ejemplo un medio gelificado. Preferiblemente, el medio según la invención es 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. Un cierto número de preparaciones están disponibles en el mercado, como por ejemplo el agar Columbia, el agar tripcasa-soja, el agar Mac Conkey, el agar Sabouraud o más generalmente los descritos en el Handbook of Microbiological Media (CRC Press).

El medio de reacción según la invención puede contener otros aditivos eventuales, como por ejemplo: peptonas, uno o varios factores de crecimiento, hidratos de carbono, uno o varios agentes selectivos, soluciones tampón, uno o varios gelificantes, etc. Este medio de reacción puede presentarse en forma de líquido, de gel listo para el uso, es decir listo para la inoculación en un tubo, frasco o sobre placa de Petri. Cuando la presentación está en forma de gel en frasco, se realiza preferiblemente una regeneración (paso a 100°C) previa del medio antes de verter en placa de Petri.

Preferiblemente, el medio según la invención es un medio selectivo, es decir un medio que comprende unos inhibidores que favorecen el crecimiento de las bacterias *Staphylococcus aureus*. Se puede citar en particular el cloruro de litio (LiCl), la azida de sodio (NaN₃), la colistina, la anfotericina, el aztreonam, la colimicina, el cloruro de sodio (NaCl), la deferroxamina, o el compuesto vibriostático O/129.

En el sentido de la presente invención, el sustrato de una actividad enzimática o metabólica se selecciona entre cualquier sustrato que puede ser hidrolizado en un producto que permite la detección, directa o indirecta, de una actividad enzimática o de un metabolismo, tal como en particular una actividad osidasa, preferiblemente una actividad alfa glucosidasa, esterasa, preferiblemente una actividad fosfatasa, peptidasa, preferiblemente una actividad coagulasa, o metabolismo de un hidrato de carbono, preferiblemente el manitol.

Puede tratarse de un sustrato natural o sintético. El metabolismo del sustrato provoca una variación de las propiedades físico-químicas del medio de reacción o de las células de organismos. Esta variación se puede detectar mediante métodos físico-químicos, en particular unos métodos ópticos para el ojo del operario o con la ayuda de instrumentos, espectrométricos, eléctricos, magnéticos, etc. Preferiblemente, se trata de una variación de las propiedades ópticas, tales como una modificación de absorción, de fluorescencia o de luminiscencia.

Como sustrato cromógeno, se pueden citar en particular los sustratos a base de indoxilo, flavona, alizarina, acridina, fenoxazina, nitrofenol, nitroanalina, naftol, catecol, hidroxiquinolina o cumarina. Preferiblemente, el o los sustratos utilizados en la presente invención son a base de indoxilo.

Como sustrato fluorescente, se pueden citar en particular los sustratos a base de umbeliferona o de cumarina, a base de resorufina, fenoxazina, naftol, naftilamina, 2'-hidroxifenil-heterociclo o 2'-aminofenil-heterociclo o también a base de fluoresceína.

Como sustrato de actividad enzimática alfa-glucosidasa, se pueden citar más particularmente los sustratos 5-bromo-6-cloro-3-indoxil-alfa-glucósido; dihidroxiflavona-alfa-glucósido; 3,4-ciclohexenoesculetina-alfa-glucósido; 8-hidroxiquinolina-alfa-glucósido; 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-alfa-glucósido; 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-N-metil-alfa-glucósido; 6-cloro-3-indoxil-alfa-glucósido; 5-bromo-3-indoxil-alfa-glucósido; 5-yodo-3-indoxil-alfa-glucósido; 6-fluoro-3-indoxil-alfa-glucósido; alizarina-alfa-glucósido; nitrofenil-alfa-glucósido; 4-Metilumbeliferil-alfa-glucósido; naftolbenzein-alfa-glucósido; indoxil-N-metil-alfa-glucósido; naftil-alfa-glucósido; aminofenil-alfa-glucósido; dicloroaminofenil-alfa-glucósido.

Preferiblemente, el sustrato utilizado en la presente invención es el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-alfa-glucósido, preferiblemente en combinación con el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-N-metil-alfa-glucósido.

Como sustrato de actividad enzimática fosfatasa, se pueden citar más particularmente los sustratos 5-bromo-6-cloro-3-indoxil-fosfato; 3,4-ciclohexenoesculetina-fosfato; 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-fosfato; 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-N-metil-fosfato; 6-Cloro-3-indoxil-fosfato; 5-Bromo-3-indoxil-fosfato; 5-yodo-3-indoxil-fosfato; 6-Fluoro-3-indoxil-fosfato; Nitrofenil-fosfato; 4-Metilumbeliferil-fosfato, Indoxil-N-metil-fosfato; Naftil-fosfato.

Como sustrato de coagulasa, se pueden citar más particularmente los sustratos Boc-Val-Pro-Arg-7-amido-4-metilcumarina, Bz-Phe-Val-Arg-p-nitroanilida, Z-Gly-Pro-Arg-4-Metoxi-beta-naftilamida, Plasminógeno. En general estos sustratos son utilizados en combinación con una fuente de protrombina tal como la protrombina purificada o el plasma sanguíneo.

El sustrato utilizado en la presente invención puede estar en combinación con otros sustratos, tales como un sustrato de osidasa y en particular beta-glucosidasa o beta-ribosidasa, esterasa y en particular fosfatasa o fosfolipasa, peptidasa y en particular coagulasa.

5 Los sustratos de la invención son utilizables en un amplio intervalo de pH, en particular entre pH 5,5 y 10, preferiblemente entre 6,5 y 10. Cuando el medio según la invención comprende un sustrato o varios sustratos de actividad enzimática alfa glucosidasa, la concentración en sustrato(s) está preferiblemente comprendida entre 0,01 y 2 g/l, aún más preferiblemente entre 0,02 y 0,2 g/l y, ventajosamente, es de 0,1 g/l. En efecto, a esta concentración de sustrato, se obtiene un mejor contraste de coloración.

10 El sustrato puede también ser un sustrato metabólico, tal como una fuente de carbono, acoplada a un indicador que produce una coloración en presencia de uno de los productos del metabolismo. En el caso del metabolismo de un hidrato de carbono, es preferiblemente el manitol acoplado a un indicador de pH.

En el sentido de la presente invención, un antibiótico que pertenece a la familia de las cefalosporinas es un antibiótico preferiblemente seleccionado entre.

15 ○ Una cefalosporina de primera generación, tal como: Cefalexina, Cefaloridina, Cefalotina, Cefazolina, Cefadroxilo, Cefazedona, Cefatrizina, Cefapirina, Cefradina, Cefacetrilo, Cefrodaxina, Ceftezol

20 ○ Una cefalosporina de segunda generación tal como: Cefoxitina, Cefuroxima, Cefamandol, Cefaclor, Cefotetán, Cefonicido, Cefotiam, Loracarbef, Cefmetazol, Cefprozil, Ceforanida

○ Una cefalosporina de tercera generación, tal como: Cefotaxima, Ceftazidima, Cefsulodina, Ceftriaxona, Cefmenoxima, Latamoxef, Ceftizoxima, Cefixima, Cefodizima, Cefetamet, Cefpiramida, Cefoperazona, Cefpodoxima, Cefibuten, Cefdinir, Cefditoren, Ceftriaxona, Cefoperazona, Cefbuperazona

25 ○ Una cefalosporina de cuarta generación, tal como Cefepima, Cefpiroma.

Las cefamicinas tales como Cefoxitina, Cefotetán, Cefmetazol, Cefbuperazona, Latamoxef son unas sub-familia de las cefalosporinas.

30 En el ámbito de la presente invención, el antibiótico que pertenece a la familia de las cefalosporinas es preferiblemente la Cefoxitina, y puede estar en combinación con la Cefotaxima.

35 En el sentido de la presente invención, un antibiótico que pertenece a la familia de los carbapenemas es un antibiótico preferiblemente seleccionado entre Meropenema, Ertapenema, Imipenema, Doreipenema, Faropenema.

En el ámbito de la presente invención, el antibiótico que pertenece a la familia de los carbapenemas es preferiblemente la Ertapenema.

40 En el sentido de la presente invención, un antibiótico que pertenece a la familia de los aminósidos es un antibiótico preferiblemente seleccionado entre Amikacina, Gentamicina, Isepamicina, Kanamicina, Betilmicina, Estreptomocina, Tobramicina.

45 Por concentración infra-inhibidora, se entiende una concentración inferior a la concentración en antibiótico necesaria para la inhibición de MSSA, en medio de cultivo apto para la búsqueda de *S. aureus* a partir de una muestra biológica, tal como el medio cromID™ *S. aureus* (bioMerieux). Esta concentración es inferior a aproximadamente 3 mg/l en el caso de la Cefoxitina, aproximadamente 2 mg/l en el caso de Cefotaxima, aproximadamente 1 mg/l en el caso de Ertapenema, aproximadamente 2 mg/l en el caso de Cefoperazona, aproximadamente 2 mg/l en el caso de Cefpodoxima, aproximadamente 1 mg/l en el caso de Cefdinir.

50 Por asociación predeterminada de dos antibióticos, se entiende una asociación de dos antibióticos particulares, estando cada uno de los 2 a una concentración infra-inhibidora particular. Tal asociación se puede determinar en particular mediante en ensayo del ejemplo A.

55 Por muestra biológica, se entiende una muestra clínica, procedente de una extracción de aspiración bronquial, traqueal o pulmonar, de líquido pleural, de un lavado broncoalveolar, de expectoraciones, de la sangre o de una biopsia pulmonar, de líquido articular o pericárdico; líquido biológico o una muestra alimenticia, procedente de cualquier alimento. Esta muestra puede así ser líquida o sólida y se puede citar, de manera no limitativa, una muestra clínica de sangre, de plasma, de orina, de heces, de extracciones de la nariz, del perineo, de la garganta, de piel, de heridas, de líquido céfalo-raquídeo o una muestra alimenticia.

60 A este respecto, la invención se refiere a un medio de reacción para la detección y/o la identificación de bacterias *Staphylococcus aureus* resistentes a la metilina (MRSA) que comprende una asociación predeterminada de dos antibióticos, un primer antibiótico que pertenece a la familia de las cefalosporinas y un segundo antibiótico, estando dicho primer y segundo antibiótico cada uno a una concentración infra-inhibidora.

65 Según un modo preferido de realización de la invención, dicho primer antibiótico pertenece a la sub-familia de las

cefamicinas. Según un modo aún más preferido de realización de la invención, dicho primer antibiótico es la Cefoxitina.

5 Según un modo preferido de realización de la invención, dicho segundo antibiótico pertenece a la familia de los carbapenemas.

Según un modo preferido de realización de la invención, dicho segundo antibiótico pertenece a la familia de las cefalosporinas.

10 Según un modo preferido de realización de la invención, dicho segundo antibiótico pertenece a la familia de los aminósidos.

15 Según un modo preferido de realización de la invención, el medio comprende además un sustrato que permite la detección de una actividad enzimática, preferiblemente una actividad osidasa, esterasa o peptidasa, o metabólica, preferiblemente el metabolismo de un hidrato de carbono.

20 En el caso de una actividad osidasa, es preferiblemente una actividad alfa-glucosidasa. En el caso de una actividad esterasa, es preferiblemente una actividad fosfatasa. En el caso de una actividad peptidasa, es preferiblemente una actividad coagulasa. En el caso del metabolismo de un hidrato de carbono, es preferiblemente el manitol acoplado a un indicador de pH.

Según un modo de realización de la invención, el sustrato es un sustrato que permite la detección de una actividad enzimática osidasa, preferiblemente alfa-glucosidasa.

25 Dicho sustrato de una actividad enzimática alfa-glucosidasa es preferiblemente un indoxil-alfa-glucósido. Preferiblemente, el sustrato utilizado es el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-N-metil-alfa-glucósido (X-N-metil-alfa-glucósido). Preferiblemente, este sustrato está presente en el medio a una concentración comprendida entre 0,01 y 2 g/l, preferiblemente entre 0,02 y 0,3 g/l.

30 Según un modo particular de realización de la invención, dicho medio comprende un segundo sustrato enzimático o metabólico. Este sustrato puede ser un sustrato de alfa-glucosidasa u otro sustrato. Preferiblemente, este segundo sustrato es un sustrato de alfa-glucosidasa. Cuando dicho medio comprende un segundo sustrato de alfa-glucosidasa, este sustrato es preferiblemente el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-alfa-glucósido (X-alfa-glucósido). Preferiblemente, este segundo sustrato está presente en el medio a una concentración comprendida entre 0,01 y 2 g/l, preferiblemente entre 0,02 y 0,3 g/l.

35 Según un modo preferido de realización de la invención, dicho primer y/o segundo antibiótico que pertenece a la familia de las cefalosporinas se selecciona entre

40 ○ Una cefalosporina de primera generación, tal como: Cefalexina, Cefaloridina, Cefalotina, Cefazolina, Cefadroxilo, Cefazedona, Cefatrizina, Cefapirina, Cefradina, Cefacetrilo, Cefrodaxina, Ceftezol

45 ○ Una cefalosporina de segunda generación tal como: Cefoxitina, Cefuroxima, Cefamandol, Cefaclor, Cefotetán, Cefonicida, Cefotiam, Loracarbef, Cefmetazol, Cefprozil, Ceforanida

○ Una cefalosporina de tercera generación, tal como: Cefotaxima, Ceftazidima, Cefsulodina, Ceftriaxona, Cefmenoxima, Latamoxef, Ceftizoxima, Cefixima, Cefodizima, Cefetamet, Cefpiramida, Cefoperazona, Cefpodoxima, Ceftibuten, Cefdinir, Cefditoren, Ceftriaxona, Cefoperazona, Cefbuperazona

50 ○ Una cefalosporina de cuarta generación, tal como Cefepima, Cefpiroma.

Según un modo preferido de realización de la invención, dicho segundo antibiótico que pertenece a la familia de los carbapenemas se selecciona entre Meropenema, Ertapenema, Imipenema.

55 Según un modo preferido de realización de la invención, la combinación de dos antibióticos se selecciona entre las combinaciones Cefoxitina – Cefotaxima o Cefoxitina – Ertapenema.

60 Según un modo preferido de realización de la invención, el medio puede comprender, además, al menos un inhibidor que favorece el crecimiento de las bacterias *Staphylococcus aureus*, tal como el cloruro de litio (LiCl), la azida de sodio (NaN₃), la colistina, la anfotericina, el aztreonam, la colimicina, el cloruro de sodio (NaCl) y la deferoxamina.

Según un modo preferido de realización de la invención, el medio comprende, además, una mezcla de inhibidores, que comprende cuatro inhibidores, que favorece el crecimiento de las bacterias del género *Staphylococcus*, que son LiCl, compuesto vibriostático O/129, aztreonam y anfotericina.

65 Según un modo preferido de realización de la invención, la asociación de dos antibióticos comprende la Cefoxitina y

la Cefotaxima. Preferiblemente, dicha concentración infra inhibidora en Cefoxitina está comprendida entre 0,25 y 1,5 mg/l, preferiblemente entre 0,5 y 1 mg/l. Preferiblemente, dicha concentración infra-inhibidora en Cefotaxima está comprendida entre 0,25 y 1,5 mg/l, preferiblemente entre 0,5 y 1 mg/l.

5 Según un modo preferido de realización de la invención, la asociación de dos antibióticos comprende la Cefoxitina y la ceftriaxona. Preferiblemente, dicha concentración infra inhibidora en Cefoxitina está comprendida entre 0,25 y 1,5 mg/l, preferiblemente entre 0,5 y 1 mg/l. Preferiblemente, dicha concentración infra-inhibidora en ceftriaxona está comprendida entre 0,25 y 1,5 mg/l, preferiblemente entre 0,5 y 1 mg/l.

10 Según un modo de realización de la invención, la asociación de dos antibióticos comprende la Cefoxitina y el Ertapenema. Preferiblemente, dicha concentración infra-inhibidora en Cefoxitina está comprendida entre 0,25 y 1,5 mg/l, preferiblemente entre 0,5 y 1 mg. Preferiblemente, dicha concentración infra-inhibidora en Ertapenema está comprendida entre 0,5 y 0,75 mg/l.

15 Según un modo preferido de realización de la invención, la asociación de dos antibióticos comprende Cefoxitina y Cefpodoxima. Preferiblemente, dicha concentración infra-inhibidora en Cefoxitina está comprendida entre 0,25 y 1,5 mg/l, preferiblemente entre 0,5 y 1 mg/l. Preferiblemente, dicha concentración infra-inhibidora en Cefpodoxima está comprendida entre 0,75 y 1 mg/l, preferiblemente entre 0,5 y 1 mg/l.

20 Según un modo preferido de realización de la invención, la asociación de dos antibióticos comprende Cefoxitina y Cefoperazona. Preferiblemente, dicha concentración infra-inhibidora en Cefoxitina está comprendida entre 0,25 y 1,5 mg/l, preferiblemente entre 0,5 y 1 mg/l. Preferiblemente, dicha concentración infra-inhibidora en Cefoperazona está comprendida entre 0,5 y 0,75 mg/l, preferiblemente entre 0,75 y 1 mg/l.

25 Según un modo preferido de realización de la invención, la asociación de dos antibióticos comprende Cefoxitina y Cefdinir. Preferiblemente, dicha concentración infra-inhibidora en Cefoxitina está comprendida entre 0,25 y 1,5 mg/l, preferiblemente entre 0,25 y 0,75 mg/l. Preferiblemente, dicha concentración infra-inhibidora en Cefdinir está comprendida entre 0,05 y 0,5 mg/l, preferiblemente entre 0,1 y 0,25 mg/l.

30 La invención se refiere también a la utilización *in vitro* de un medio de reacción tal como se ha definido anteriormente para aislar e identificar unas bacterias *Staphylococcus aureus* resistentes a la metilina (MRSA).

35 Durante la utilización de este medio, las MRSA son preferiblemente detectadas por una actividad α -glucosidasa específica que permite obtener unas colonias coloreadas o fluorescentes. Las otras especies de *Staphylococcus aureus* aparecen incoloras o de un color o fluorescencia diferente de la de las colonias de *S. aureus*.

La invención se refiere finalmente a un procedimiento de detección y/o de identificación de bacterias *Staphylococcus aureus* resistentes a la metilina (MRSA) en una muestra biológica según la cual

40 a) se inocula la muestra biológica susceptible de contener unas bacterias de *Staphylococcus aureus* resistentes a la metilina (MRSA) en un medio de reacción tal como se ha definido anteriormente

b) se incuba

45 c) se identifican las colonias de MRSA.

50 La incubación se realiza preferiblemente a una temperatura comprendida entre 30°C y 42°C. Las MRSA se detectan preferiblemente por una actividad α -glucosidasa específica que permite obtener unas colonias coloreadas o fluorescentes. Las otras especies de *Staphylococcus aureus* aparecen incoloras o de un color o fluorescencia diferente de la de las colonias de *S. aureus*.

Los ejemplos siguientes se dan a título ilustrativo y no tienen ningún carácter limitativo. Permitirán comprender mejor la invención.

55 Ejemplo A – Ensayo para determinar la asociación predeterminada de dos antibióticos según la invención

El ensayo siguiente se puede llevar a cabo para definir la asociación predeterminada de dos antibióticos según la invención, que depende de los antibióticos empleados y más generalmente de la formulación del medio de reacción.

60 Para ayudar a su comprensión, este ensayo se lleva a cabo a continuación en el caso de una combinación Cefoxitina y Cefotaxima, a partir de un kit de cepas de microorganismos, que comprende MSSA y MRSA, pero este ensayo se puede llevar a cabo, por supuesto, para otros antibióticos.

65 Se utilizan diez medios de reacción aptos para la búsqueda de *S. aureus* en una muestra biológica (tal como un medio cromID™ *S. aureus*, bioMérieux) y diferentes concentraciones en Cefoxitina (entre 0 y 3 mg/l) y Cefotaxima (entre 0 y 2 mg/l) para obtener unas concentraciones en antibióticos comprendidas entre 0 y 5 mg/l. Las diferentes

concentraciones son espaciadas de manera regular, por ejemplo según una distribución aritmética o geométrica.

Cada uno de los medios se alícuota de manera que cada cepa de microorganismo pueda ser inoculada en cultivo puro sobre cada uno de los medios. Después de un tiempo de incubación adecuado, preferiblemente 18 a 24 horas, a una temperatura apropiada, preferiblemente 30 a 37°C, los medios se examinan con el fin de seleccionar el medio que comprende una asociación en Cefoxitina y Cefotaxima que permita revelar el mayor número de MRSA diferenciándolos al mismo tiempo del mayor número de cepas MSSA.

Puede ser necesario repetir el experimento adaptando las concentraciones en cada uno de los antibióticos.

Ejemplo B – Medio según la invención que comprende un sustrato alfa-glucosidasa

1. Preparación del medio según la invención

Los medios ensayados en los experimentos siguientes eran unos medios que comprendían como medio de base el medio cromID MRSA (bioMérieux ref. 43 451), y que comprendían los elementos siguientes

Medio T: medio control chromID MRSA (ref. 43 451), que comprende en particular un sustrato X-N-metil-alfa-glucósido a una concentración de 0,1 g/l y Cefoxitina a 4 mg/l.

Medio S: medio T, que comprende además un sustrato X-alfa-Glucósido, a una concentración de 25, 37, 45 o 50 mg/l

Medio A: medio S (concentración X-alfa-glucósido: 45 mg/l siendo la Cefoxitina sustituida por Ceftriaxona, a una concentración de 1; 2; 4; 8; 16; 32 mg/l

Medio B: medio S (concentración X-alfa-glucósido: 45 mg/l siendo la Cefoxitina sustituida por Cefotaxima a una concentración de 1; 2; 4; 8; 16; 32 mg/l

Medio C: medio S (concentración X-alfa-glucósido: 45 mg/l), siendo la Cefoxitina sustituida por Ertapenema a una concentración de 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1 mg/l

Medio D: medio S (concentración X-alfa-glucósido: 45 mg/l), siendo la Cefoxitina sustituida por Cefoperazona a una concentración de 0,5; 1; 1,5; 2 mg/l

Medio E: medio S (concentración X-alfa-glucósido: 45 mg/l), siendo la Cefoxitina sustituida por Cefpodoxima a una concentración de 0,5; 1; 1,5; 2 mg/l

Medio F: medio S (concentración X-alfa-glucósido: 45 mg/l), siendo la Cefoxitina sustituida por una combinación Cefoxitina/Cefotaxima en las concentraciones siguientes

[Cefoxitina] en mg/l	0,5	0,5	1	1
[Cefotaxima] en mg/l	0,5	1	0,5	1

Medio G: medio S (concentración X-alfa-glucósido: 45 mg/l), siendo la Cefoxitina sustituida por una combinación Cefoxitina/Ceftriaxona a las concentraciones siguientes

[Cefoxitina] en mg/l	0,5	0,5	1	1
[Ceftriaxona] en mg/l	0,5	1	0,5	1

Medio H: medio S (concentración X-alfa-glucósido: 45 mg/l), siendo la Cefoxitina sustituida por una combinación Cefoxitina/Ertapenema a las concentraciones siguientes

[Cefoxitina] en mg/l	0,5	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	0,75
[Ertapenema] en mg/l	0,25	0,5	0,75	1	0,25	0,5	0,75	1

Medio I: medio S (concentración X-alfa-glucósido: 45 mg/l), siendo la Cefoxitina sustituida por una combinación Cefoxitina/Cefpodoxima a las concentraciones siguientes

[Cefoxitina] en mg/l	0,5	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	0,75
[Cefpodoxima] en mg/l	0,5	1	1,5	2	0,5	1	1,5	2

Medio J: medio S (concentración X-alfa-glucósido: 45 mg/l), siendo la Cefoxitina sustituida por una combinación Cefoxitina/Cefoperazona a las concentraciones siguientes

[Cefoxitina] en mg/l	0,5	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	0,75
[Cefoperazona] en mg/l	0,5	0,75	1	1,5	0,5	0,75	1	1,5

Medio K: medio S (concentración X-alfa-glucósido: 45 mg/l), siendo la Cefoxitina sustituida por una combinación Cefoxitina/Cefotaxima, a las concentraciones siguientes, que comprende además una mezcla de inhibidores que favorece el crecimiento de los *Staphylococcus aureus*.

5

[Cefoxitina] en mg/l	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
[Cefotaxima] en mg/l	0,5	0,55	0,6	0,65	0,7	0,75

Medio L: medio S (concentración X-alfa-glucósido: 45 mg/l), siendo la Cefoxitina sustituida por Cefdinir a una concentración de 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 mg/l

10 Medio M: medio S (concentración X-alfa-glucósido: 45 mg/l), siendo la Cefoxitina sustituida por una combinación Cefoxitina/Cefdinir, a las concentraciones siguientes

[Cefoxitina] en mg/l	0,25	0,5	0,75	0,25	0,5	0,75	0,25	0,5	0,75
[Cefdinir] en mg/l	0,1	0,1	0,1	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5

2. Inoculación y lectura de los medios

15

Diferentes juegos de cepas de bacterias, todas procedentes de la colección de la solicitante, puestas en suspensión en agua fisiológica, se han inoculado para dar unas colonias aisladas en el medio. Las placas se han inoculado a 37°C durante 48 horas. Las colonias formadas se han examinado visualmente después de 18h o 24 horas de incubación. Se ha observado también la intensidad de coloración según una escala de 0 a 4 (0: ausencia de coloración, 4: coloración muy intensa).

20

Las cepas detectadas corresponden a las cepas que forman unas colonias coloreadas en el medio.

3. Resultados:

25

3.1 Medio para detectar MRSA que comprenden 2 sustratos de alfa-glucosidasa

Los resultados obtenidos durante la utilización de uno o dos sustratos de alfa-glucosidasa se presentan en la tabla 1.

30 *Tabla 1 – Intensidad de coloración de las colonias durante la utilización de 2 sustratos de alfa-glucosidasa*

Cepas	Incubación	Medio T	Medio S [X α Glu] = 25 mg/l	Medio [X α Glu] = 37 mg/l	Medio [X α Glu] = 50 mg/l
		Intensidad de coloración verde			
MRSA	18h	2	2	2,5	3
	24h	2	2	3	3
	> 40h	2	2,5	3	3
MRSA	18h	0	0	0	0
	24h	2	2	2,5	3
	> 40h	3	3	4	4
MRSA	18h	1,5	1,5	2	3
	24h	2	2	4	4
	> 40h	2	3	4	4
MRSA	18h	2	2	3	3
	24h	2	2	4	4
	> 40h	2,5	2,5	4	4
MRSA	18h	0,5	0,5	0	0
	24h	1	0,5	1,5	2,5
	> 40h	2,5	3	4	4
MRSA	18h	2	2	2,5	3
	24h	2,5	2,5	2,5	2,5
	> 40h	2,5	3	4	4
MRSA	18h	0	0	0	0
	24h	1	1	3	4
	> 40h	2	3	4	4
MRSA	18h	0	0	0	0
	24h	0	0	0	0

Cepas	Incubación	Medio T	Medio S [X α Glu] = 25 mg/l	Medio [X α Glu] = 37 mg/l	Medio [X α Glu] = 50 mg/l
		Intensidad de coloración verde			
	> 40h	3	3	4	4
MRSA	18h	1,5	1,5	3	2,5
	24h	2	2	4	4
	> 40h	2,5	3	4	4
MRSA	18h	0	0	0	0
	24h	0	0	2	3
	> 40h	2,5	3	4	4

La adición de un segundo sustrato de alfa-glucosidasa permitía intensificar fuertemente la coloración de las colonias, permitiendo así localizar mejor las colonias de MRSA.

- 5 3.2 Medio para detectar unas MRSA que comprenden un antibiótico seleccionado entre la Ceftriaxona, la Cefotaxima, el Ertapenema, la Cefoperazona, la Cefpodoxima o el Cefdinir

Los resultados obtenidos durante la sustitución de la Cefoxitina por otro antibiótico se presentan en las tablas 2a a 2f.

10

Tabla 2a - Sustitución de la Cefoxitina por la Ceftriaxona

	Medio	T	A					
	Antibiótico	Cefoxitina	Ceftriaxona					
	Concentración (mg/l)	4	1	2	4	8	16	32
MRSA (Nº de cepas detectadas / Nº de cepas)	Lectura 18h	7/10	9/10	8/10	3/10			
	Lectura 24h	8/10	10/10	10/10	6/10	3/10		
MSSA (Nº de cepas detectadas / Nº de cepas)	Lectura 18h	3/10	9/10	7/10	3/10			
	Lectura 24h	3/10	9/10	7/10	3/10			

15

Tabla 2b - Sustitución de la Cefoxitina por la Cefotaxima

	Medio	T	B					
	Antibiótico	Cefoxitina	Cefotaxima					
	Concentración (mg/l)	4	1	2	4	8	16	32
MRSA (Nº de cepas detectadas / Nb de cepas)	Lectura 18h	7/10	6/10	3/10	1/10			
	Lectura 24h	9/10	9/10	5/10	3/10			
MSSA (Nº de cepas detectadas / Nº de cepas)	Lectura 18h	3/10	7/10	3/10				
	Lectura 24h	3/10	7/10	3/10				

Tabla 2c - Sustitución de la Cefoxitina por Ertapenema

	Medio	T	C				
	Antibiótico	Cefoxitina	Ertapenema				
	Concentración (mg/l)	4	0,1	0,25	0,5	0,75	1
MRSA (Nº de cepas detectadas / Nº de cepas)	Lectura 18h	7/10	9/10	9/10	8/10	8/10	5/10
	Lectura 24h	7/10	10/10	10/10	10/10	9/10	9/10
MSSA (Nº de cepas detectadas / Nº de cepas)	Lectura 18h		10/10	10/10	10/10	8/10	4/10
	Lectura 24h		10/10	10/10	10/10	9/10	6/10

20

Tabla 2d - Sustitución de la Cefoxitina por la Cefoperazona

	Medio	T	D			
	Antibiótico	Cefoxitina	Cefoperazona			
	Concentración (mg/l)	4	0,5	1	1,5	2
MRSA (Nº de cepas detectadas / Nº de cepas)	Lectura 18h	5/10	8/10	8/10	5/10	4/10
	Lectura 24h	5/10	10/10	8/10	6/10	5/10
MSSA (Nº de cepas detectadas / Nº de cepas)	Lectura 18h		10/10	9/10	5/10	4/10
	Lectura 24h		10/10	9/10	6/10	4/10

Tabla 2e - Sustitución de la Cefoxitina por la Cefpodoxima

	Medio	T	E			
	Antibiótico	Cefoxitina	Cefpodoxima			
	Concentración (mg/l)	4	0,5	1	1,5	2
MRSA (Nº de cepas detectadas / Nº de cepas)	Lectura 18h	5/10	9/10	8/10	8/10	5/10
	Lectura 24h	5/10	10/10	9/10	8/10	7/10
MSSA (Nº de cepas detectadas / Nº de cepas)	Lectura 18h		10/10	10/10	8/10	6/10
	Lectura 24h		10/10	10/10	8/10	6/10

Tabla 2f - Sustitución de la Cefoxitina por Cefdinir

	Medio	T	L					
	Antibiótico	Cefoxitina	Cefdinir					
	(Concentración (mg/l))	4	0,25	0,5	1	2	4	8
MRSA (Nº de cepas detectadas / Nº de cepas)	Lectura 18h	5/10	3/10	3/10	2/10			
	Lectura 24h	6/10	4/10	4/10	4/10	1/10		
MSSA (Nº de cepas detectadas / Nº de cepas)	Lectura 18h							
	Lectura 24h		5/10	1/10				

Los antibióticos Cefoxitina, Ceftriaxona, Ertapenema, Cefpodoxima, Cefoperazona y Cefdinir no permitían obtener solos una sensibilidad y una especificidad que permitiera la discriminación de MRSA y de MSSA.

3.3 - Medio para detectar unas MRSA que comprenden una combinación de antibióticos seleccionada entre Cefoxitina/Ceftriaxona, Cefoxitina/Cefotaxima, Cefoxitina/Ertapenema, Cefoxitina/Cefoperazona o Cefoxitina/Cefpodoxima

Los resultados obtenidos durante la utilización de combinaciones de antibióticos se presentan en la tabla 3.

Tabla 3 – Detección de colonias MRSA durante la utilización de una combinación de antibióticos (detección expresada en número de cepas detectadas por número de cepas totales)

Medio	T	F				T	G				T	H								
Antibiótico 1	Cefoxitina	Cefoxitina				Cefoxitina	Cefoxitina				Cefoxitina	Cefoxitina								
Concentración antibiótico 1 (mg/l)	4	0,5	1	0,5	1	4	0,5	1	0,5	1	4	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	0,75
Antibiótico 2	Ninguno	Cefotaxima				Ninguno	Ceftriaxona				Ninguno	Ertapenema								
Concentración antibiótico 2 (mg/l)	0	0,5	0,5	1	1	0	0,5	0,5	1	1	0	1	0,25	0,5	0,75	1	0,25	0,5	0,75	1
Lectura 18h	6/10	9/10	8/10	6/10	5/10	6/10	9/10	8/10	9/10	8/10	6/10	7/10	8/10	7/10	7/10	6/10	7/10	7/10	7/10	2/10
Lectura 24h	8/10	10/10	8/10	6/10	6/10	8/10	10/10	10/10	10/10	8/10	6/10	8/10	8/10	8/10	8/10	7/10	8/10	8/10	8/10	4/10
Lectura 18h		4/10	1/10	1/10			6/10	4/10	4/10	3/10		3/10	9/10	6/10	2/10		7/10	3/10	10/10	
Lectura 24h		5/10	2/10	1/10			6/10	5/10	4/10	4/10		5/10	9/10	8/10	5/10		10/10	6/10	10/10	

Medio	T	I								T	J									
Antibiótico 1	Cefoxitina	Cefoxitina								Cefoxitina	Cefoxitina									
Concentración Antibiótico 1 (mg/l)	4	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	0,75	4	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75	0,75	0,75
Antibiótico 2	Ninguno	Cefpodoxima								Ninguno	Cefoperazona									
Concentración Antibiótico 2 (mg/l)	0	2	0,5	1	1,5	2	0,5	1	1,5	2	0	1,5	0,5	0,75	1	1,5	0,5	0,75	1	1,5
Lectura 18h	5/10	5/10	8/10	5/10	5/10	1/10	6/10	5/10	4/10	1/10	5/10	5/10	6/10	5/10	5/10	2/10	5/10	5/10	5/10	1/10
Lectura 24h	5/10	5/10	8/10	5/10	5/10	5/10	7/10	5/10	5/10	3/10	5/10	7/10	9/10	5/10	5/10	4/10	6/10	6/10	5/10	2/10
Lectura 18h		4/10	6/10				2/10					6/10	4/10	3/10	2/10		4/10	3/10	1/10	
Lectura 24h		4/10	7/10	1/10			5/10					7/10	5/10	4/10	3/10	1/10	4/10	4/10	2/10	1/10

	Medio	T	M								
	Antibiótico 1	Cefoxitina	Cefoxitina								
	Concentración 1 (mg/l)	4	0,25	0,5	0,75	0,25	0,5	0,75	0,25	0,5	0,75
MRSA	Lectura 18h	6/10	7/10	6/10	6/10	4/10	4/10	5/10	4/10	3/10	2/10
	Lectura 24h	7/10	8/10	7/10	7/10	4/10	5/10	5/10	4/10	4/10	
MSSA	Lectura 18h		4/10	1/10					1/10	1/10	
	Lectura 24h		5/10	1/10	1/10				1/10	1/10	

Las asociaciones de antibióticos anteriores permitían obtener una especificidad y una sensibilidad superior a las obtenidas durante la utilización de un único antibiótico.

3.4 – Medio para detectar unas MRSA que comprende una combinación de antibióticos Cefoxitina/Cefotaxima y una mezcla de inhibidores que favorece el crecimiento de los *Staphylococcus aureus*.

Los resultados obtenidos durante la utilización de combinaciones de antibióticos se presentan en la tabla 4.

5

Tabla 4 – Detección de colonias MRSA durante la utilización de una combinación de antibióticos Cefoxitina/Cefotaxima y una mezcla de inhibidores (detección expresada en número de cepas detectadas por número de cepas totales)

Medio		T	K					
Antibiótico 1		Cefoxitina	Cefoxitina					
Concentración antibiótico 1 (mg/l)		4	0,5	0,55	0,6	0,65	0,7	0,75
Antibiótico 2		ninguno	Cefotaxima					
Concentración antibiótico 2 (mg/l)		0	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
MRSA	Lectura 18h	5/10	5/10	5/10	5/10	5/10	5/10	5/10
	Lectura 24h	9/10	8/10	9/10	8/10	8/10	8/10	9/10
MSSA	Lectura 18h	-	-	-	-	-	-	-
	Lectura 24h	-	3/10	2/10	1/10	-	-	-

10

La combinación de antibióticos Cefoxitina/Cefotaxima asociada a una mezcla de inhibidores que favorece el crecimiento de los *Staphylococcus aureus* permitía obtener una excelente especificidad y sensibilidad.

Ejemplo C – Medio según la invención que comprende un sustrato fosfatasa

15

Se han realizado los experimentos similares a los presentados en el ejemplo B, siendo el sustrato alfa-glucosidasa sustituido por un sustrato de fosfatasa 6-cloro-3-indoxilfosfato (Fosfato Rosa), siendo la asociación en antibióticos Cefoxitina y Cefotaxima

20

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 5.

Tabla 5 – Detección de colonias MRSA durante la utilización de un sustrato de fosfatasa y de una combinación de antibióticos Cefoxitina/Cefotaxima

Medio		T	M					
Antibiótico 1		Cefoxitina	Cefoxitina					
Concentración antibiótico 1 (mg/l)		4	0,75	0,75	0,75	0,75	1	1
Antibiótico 2		Ninguno	Cefotaxima					
Concentración antibiótico 2 (mg/l)		0	0	0,5	0,75	1	0,5	0,75
MRSA	Lectura 18h	10/10	10/10	9/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	Lectura 24h	10/10	10/10	9/10	10/10	10/10	10/10	10/10
MSSA	Lectura 18h	-	10/10	-	-	-	-	-
	Lectura 24h	-	10/10	2/10	-	-	-	-

25

La combinación de antibióticos Cefoxitina/Cefotaxima asociada al sustrato 6-cloro-3-indoxilfosfato (Fosfato Rosa) permitía obtener una excelente especificidad y sensibilidad.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Medio de reacción para la detección y/o la identificación de bacterias *Staphylococcus aureus* resistentes a la metilicina (MRSA) que comprende una asociación predeterminada de dos antibióticos, un primer antibiótico que pertenece a la familia de las cefalosporinas y un segundo antibiótico, estando dicho primer y segundo antibiótico cada uno a una concentración infra-inhibidora.
- 10 2. Medio de reacción según la reivindicación 1, según el cual dicho primer antibiótico pertenece a la sub-familia de las cefamicinas.
3. Medio de reacción según la reivindicación 1 o 2, según el cual dicho segundo antibiótico pertenece a la familia de los carbapenemas.
- 15 4. Medio de reacción según la reivindicación 1 o 2, según el cual dicho segundo antibiótico pertenece a la familia de las cefalosporinas.
5. Medio de reacción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, según el cual comprende además un sustrato que permite la detección de una actividad enzimática o metabólica.
- 20 6. Medio de reacción según la reivindicación 5, según el cual dicha actividad enzimática es una actividad osidasa, esterasa o peptidasa.
7. Medio de reacción según la reivindicación 6, según el cual dicha actividad enzimática osidasa es una actividad alfa-glucosidasa.
- 25 8. Medio de reacción según la reivindicación 5, según el cual dicha actividad metabólica es el metabolismo de un hidrato de carbono.
9. Medio de reacción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, según el cual comprende, además, un segundo sustrato de una actividad enzimática o metabólica.
- 30 10. Medio de reacción según la reivindicación 9, según el cual dicho segundo sustrato es un sustrato de una actividad enzimática alfa-glucosidasa.
- 35 11. Medio de reacción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, según el cual dicho primer y/o segundo antibiótico que pertenece a la familia de las cefalosporinas se selecciona entre:
- 40
 - Una cefalosporina de primera generación, preferiblemente seleccionada entre Cefalexina, Cefaloridina, Cefalotina, Cefazolina, Cefadroxilo, Cefazedona, Cefatrizina, Cefapirina, Cefradina, Cefacetrilo, Cefrodaxina, Ceftezol;
 - Una cefalosporina de segunda generación, preferiblemente seleccionada entre Cefoxitina, Cefuroxima, Cefamandol, Cefaclor, Cefotetán, Cefonicida, Cefotiam, Loracarbef, Cefmetazol, Cefprozil, Ceforanida;
 - Una cefalosporina de tercera generación, preferiblemente seleccionada entre Cefotaxima, Ceftazidima, Cefsulodina, Ceftriaxona, Cefmenoxima, Latamoxef, Ceftizoxima, Cefixima, Cefodizima, Cefetamet, Cefpiramida, Cefoperazona, Cefpodoxima, Ceftributen, Cefdinir, Cefditoren, Ceftriaxona, Cefoperazona, Cefbuperazona;
 - Una cefalosporina de cuarta generación, preferiblemente seleccionada entre Cefepima, Cefpiroma.
- 50 12. Medio de reacción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, según el cual dicho segundo antibiótico que pertenece a la familia de los carbapenemas se selecciona entre Meropenema, Ertapenema, Imipenema.
13. Medio de reacción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, según el cual la combinación de dos antibióticos se selecciona entre la combinación Cefoxitina – Cefotaxima o Cefoxitina – Ertapenema.
- 55 14. Utilización *in vitro* de un medio de reacción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para aislar e identificar unas bacterias *Staphylococcus aureus* resistentes a la metilicina (MRSA).
- 60 15. Procedimiento de detección y/o de identificación de bacterias *Staphylococcus aureus* resistentes a la metilicina (MRSA) en una muestra biológica según el cual
- a) se inocula la muestra biológica susceptible de contener unas bacterias de *Staphylococcus aureus* resistentes a la metilicina (MRSA) en un medio de reacción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13
- 65 b) se incuba

c) se identifican las colonias como unas colonias de MRSA.