

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 455**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2007 PCT/US2007/025969**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2008 WO08076452**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2007 E 07863131 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2130047**

54 Título: **Medio cromogénico para detección e identificación de enterococos resistentes a vancomicina y procedimiento asociado**

30 Prioridad:

19.12.2006 US 875669 P

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

05.12.2017

73 Titular/es:

**BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
ONE BECTON DRIVE
FRANKLIN LAKES, NJ 07417, US**

72 Inventor/es:

**KIRCHER, SUSAN;
SALOMON, JON E. y
DOUGLAS-MCKAY, SHERYL**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 645 455 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 cromogénico para detección e identificación de enterococos resistentes a vancomicina y procedimiento asociado

Antecedentes de la invención

- 5 La invención se refiere, en general, a un medio adecuado para la detección e identificación de enterococos resistentes a vancomicina.

Los enterococos son habitantes normales del tracto gastrointestinal (GI) de seres humanos y de la mayoría de los animales. Están esparcidos en la naturaleza y pueden encontrarse en suelo, agua y vegetación. Dependiendo de la localización geográfica, la especie predominante que habita el tracto GI es o bien *Enterococcus faecalis* o *E. faecium*. La colonización con estos organismos frecuentemente precede a una infección, incluyendo una infección del tracto urinario, de la cavidad intraabdominal y el revestimiento del corazón (es decir, endocarditis).

Los enterococos son resistentes a muchos antibióticos y el tratamiento actual de elección es frecuentemente vancomicina. Sin embargo, los enterococos también han comenzado a desarrollar resistencia a esta. Estas cepas de enterococos resistentes a vancomicina (VRE) han sido asociadas con mortalidad incrementada.

15 Hay dos tipos de resistencia a vancomicina. Una es intrínseca, la otra es adquirida. La resistencia intrínseca se codifica por los genes *vanC*, y no es transferible. La resistencia intrínseca se ve de la manera más común en *E. casseliflavus* y *E. gallinarum*. Por contraste, la resistencia adquirida, codificada por los genes *vanA* o *vanB*, puede transferirse y se ve comúnmente en *E. faecium* y *E. faecalis*. Las especies de enterococos asociadas con resistencia adquirida son una causa de preocupación.

20 VRE fueron reportados por primera vez en Europa 1988 y en los Estados Unidos en 1989. Ha habido un rápido incremento en la incidencia de infección y colonización de VRE. La detección de VRE en el ámbito de la atención médica es un reto principal. Los actuales lineamientos de CDC recomiendan el cribado de muestras de heces o de frotis rectal en el ámbito de la atención médica con el fin de identificar pacientes que son positivos para VRE. Además, una vez se identifica VRE, se recomienda que el paciente afectado se coloque en aislamiento. Esta práctica permite la contención de los genes de resistencia transferibles. Poner en aislamiento todos los pacientes positivos para VRE tan pronto como sea posible reduce el riesgo de transferencia de genes *vanA* y *vanB*. Sin embargo, no todas las especies de enterococos que tienen concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) elevadas a la vancomicina poseen un gen de resistencia transferible. Por lo tanto, ser capaz de distinguir entre las especies impedirá el aislamiento no garantizado y los costes asociados de aquellos pacientes que dan positivo para *E. casseliflavus* o *E. gallinarum* (éstos poseen típicamente la resistencia intrínseca conferida por el gen *vanC*) versus *E. faecium* o *E. faecalis* (éstos poseen típicamente la resistencia transferible conferida por los genes *vanA* y/o *vanB*). *E. casseliflavus* y *E. gallinarum* no son epidemiológicamente significativos en comparación con *E. faecium* o *E. faecalis*.

En la actualidad, se encuentran disponibles varios procedimientos para detectar VRE. Algunos procedimientos permiten la identificación de VRE al nivel de especie mientras que otros detectan solamente el género o grupos de especies dentro del género. Algunos procedimientos utilizan muestras biológicas obtenidas directamente de la fuente (por ejemplo, heces de un paciente), mientras que otros requieren un aislado puro de la muestra inicial antes que pueda hacerse cualquier identificación. Por ejemplo, para obtener un aislado puro de un paciente, puede ser necesario un tratamiento adicional de espécimen de paciente, tal como el aislamiento a un medio secundario. Una vez ha sido obtenido un aislado puro, puede realizarse la prueba de identificación y/o de susceptibilidad. Para aquellos con habilidad en la técnica son bien conocidos los procedimientos para obtener aislados puros a partir de las muestras que, se cree, contienen cualquier cantidad de microorganismos, y no se describen adicionalmente en la presente.

Los procedimientos básicos para confirmar un aislado bacteriano como resistente a la vancomicina son bien conocidos por aquellos con habilidad en la técnica y no se describen adicionalmente aquí. (Véanse, por ejemplo, las recomendaciones proporcionadas por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)). Estos procedimientos de susceptibilidad requieren un aislado puro y, por lo tanto, no pueden realizarse directamente en una muestra clínica (biológica).

Mientras que los procedimientos básicos para cribar una muestra clínica para VRE proporcionan poca o ninguna identificación al nivel del género o de la especie, la incorporación de esculina al medio base que contiene vancomicina puede proporcionar una identificación probable al nivel del género (es decir, *Enterococcus*) debido a que todos los enterococos hidrolizan esculina y, en presencia de citrato férrico, producen una colonia marrón a negra. Estos tipos de medios se encuentran comercialmente disponibles (por ejemplo, en BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) e incluyen Agar Enterococcal con vancomicina y agar de azida de esculina biliar con vancomicina.

También se han usado medios de caldo que contienen esculina para cribar para VRE. Igual que las placas de cribado, estos medios también se encuentran comercialmente disponibles (por ejemplo, caldo de enterococos y caldo de VRE), y ofrecen solamente una identificación probable a nivel del género.

Otro procedimiento para detectar VRE utiliza CHROMagar Orientation (CHROMagar Company, París). CHROMagar Orientation no modificado contiene dos sustratos cromogénicos, beta-D-glucopiranosido y beta-D-galactopiranosido. Con el fin de hacerlo útil en el cribado para VRE, CHROMagar Orientation fue modificado adicionando azida de sodio y vancomicina. Beta-D-glucopiranosido es un sustrato que se hidroliza por parte de casi todas las especies de enterococos. Beta-D-galactopiranosido, mientras en algunos ambientes se hidroliza específicamente por *E. faecium*, no se hidroliza o se hidroliza de modo mínimo en presencia de beta-D-glucopiranosido. Aunque CHROMagar Orientation modificada puede distinguir entre diversos géneros bacterianos (por ejemplo, *Enterococcus* de *Escherichia*), no puede diferenciar entre las especies de enterococos, y por lo tanto, no puede diferenciar entre las especies clínicamente significativas que contienen los genes *vanA* y *vanB*. Algo similar se encuentra en la publicación WO2006/085027.

Chen et al. (patentes estadounidenses 5,620,865, 6,355,449 y 7,018,807) describen un medio para la detección de VRE utilizando un medio básico para la detección de resistencia a la vancomicina al cual han sido adicionados indicadores nutrientes específicos para enterococos. Sin embargo, los indicadores nutrientes sugeridos en las patentes de Chen son universales para enterococo y de esta manera proporcionan solamente la detección a nivel del género y no a nivel de especie.

Otros medios que no están dirigidos a cribado directo de especímenes también han sido evaluados (por ejemplo, agar de campilobacter y agar de cribado de cancomicina). No obstante, estos medios son selectivos y facilitan la recuperación de VRE; no pueden ofrecer identificación a nivel del género ni a nivel de la especie. Con el fin de hacer esto, con frecuencia se usan ensayos adicionales que incluyen tinturado de Gram y pirrolidonilo arilamidasa (el ensayo PIR). Además, una vez el organismo ha sido probablemente identificado como una especie de enterococo, se necesitan ensayos adicionales tales como aquellos para motilidad o acidificación para distinguir *E. casseliflavus* y *E. gallinarum* de *E. faecium* y *E. faecalis*.

Procedimientos moleculares tales como reacción de cadena de polimerasa (PCR) y tecnología de sonda de ciclo se encuentran disponibles para la detección de genes de resistencia a vancomicina. Estos procedimientos ofrecen un alto grado de sensibilidad y especificidad así como también un plazo reducido en comparación con el cultivo de rutina. Sin embargo, con frecuencia solamente detectan los genes *van* y no proporcionan una identificación a nivel de especie. Además, muchos laboratorios no tienen las instalaciones, el entrenamiento o el volumen para justificar la realización de tales procedimientos costosos, complejos.

La identificación (ID) al nivel de especie puede llevarse a cabo usando un sistema de ID comercialmente disponible, automatizado o manual, aunque se ha notado que algunos de los sistemas comerciales pueden no siempre identificar *E. faecium* de manera exacta. Todos estos sistemas requieren un aislado puro y pueden durar hasta 24 horas para obtener una identificación definitiva. Los sistemas automatizados tales como Phoenix (BD Diagnostic Systems), Vitek (bioMérieux) y Microscan (Dade) proporcionan una identificación a nivel de especie en 2-24 horas. Los sistemas manuales tales como Crystal (BD Diagnostic Systems) y API/ATB (bioMérieux) también proporcionarán una identificación definitiva a nivel de especie en 4-24 horas.

Otros procedimientos incluyen un ensayo de vancomicina por quimioluminiscencia y concentración inhibidora mínima (MIC) (Eiken Chemicals). De acuerdo con un estudio de Nagasawa, et al., este ensayo de quimioluminiscencia puede diferenciar aislados de *vanA*, *vanB* y *vanC*, con base en sus MICs, en 2-4 horas. Otro procedimiento de MIC que emplea resazurina como un indicador de crecimiento debe usarse para determinar rápidamente las susceptibilidades a vancomicina. Sin embargo, estos dos procedimientos de ensayo de susceptibilidad requieren un aislado puro y, por lo tanto, no son adecuados para usar con la muestra original del paciente.

Tal como se ha discutido previamente, los procedimientos actuales para detectar e identificar VRE al nivel de especies requieren un aislado puro y/o ensayos múltiples. Por lo tanto, se desea un procedimiento para especiación de enterococos más que proporcionar una identificación a nivel de género del espécimen original del paciente.

45 Sumario de la invención

La presente invención proporciona un medio para identificar y distinguir especies de enterococos colocadas en el medio. El medio (es decir un sólido o un líquido y los componentes de crecimiento) comprende (a) un primer sustrato conjugado con una primera fracción de formación de imágenes, en el que el primer sustrato se selecciona para interactuar preferencialmente con una primera enzima que se produce por una primera especie de enterococos en comparación con una segunda enzima que se produce por una segunda especie de enterococos; y (b) un segundo sustrato conjugado con una segunda fracción de formación de imágenes, en el que el segundo sustrato se selecciona para interactuar preferencialmente con la segunda enzima que se produce por la segunda especie de enterococos en comparación con la primera enzima que se produce por la primera especie de enterococos, en el que la primera fracción de formación de imágenes que forma la imagen de un primer indicador cuando el primer sustrato interactúa con la primera enzima y la segunda fracción de formación de imágenes forma la imagen de un segundo indicador cuando el segundo sustrato interactúa con la segunda enzima y el primer indicador es diferente, por percepción, del segundo indicador; y (c) o bien un tercer sustrato, o bien un tercer sustrato y cefalosporina, en el que el tercer sustrato induce la producción de la primera enzima por parte de al menos una tercera especie de enterococos, y la presencia combinada de la primera fracción de formación de imágenes y la segunda fracción de

5 formación de imágenes forman imágenes de un tercer indicador en la presencia combinada de la primera enzima y la segunda enzima producidas por al menos una tercera especie de enterococos, en el que el primero, el segundo y el tercer indicador son diferentes unos de otros por percepción, y en el que el tercer sustrato no tiene un cromógeno adherido al mismo; o (c') un inhibidor de enterococos no resistentes a vancomicina que comprende vancomicina y al menos una cefalosporina, en el cual la cefalosporina inhibe el crecimiento de la tercera especie de enterococos pero no el crecimiento de la primera o de la segunda especie de enterococos, y la presencia combinada de la primera fracción de formación de imágenes y la segunda fracción de formación de imágenes forman imágenes de un tercer indicador en la presencia combinada de la primera enzima y la segunda enzima producidas por al menos una tercera especie de enterococos, en el que el primero, el segundo y el tercer indicador son diferentes unos de otros por percepción.

10 "Imágenes", tal como se usa en la presente memoria, significa un efecto observable. Ejemplos de efectos observables incluyen la emisión de un color o una fluorescencia. En formas de realización preferidas en la presente memoria, las fracciones son cromóforos.

15 La presente invención proporciona además un procedimiento para la detección de VRE directamente a partir de una mezcla biológica, el cual comprende combinar una muestra biológica con un medio, como es definido antes, y detectar la presencia o ausencia de al menos la primera y la segunda especies del enterococo resistente a vancomicina directamente del medio. La detección puede durar tan poco como 24 horas. El medio facilita la identificación y diferenciación directas entre dos o más especies de VRE (por ejemplo, *E. faecium* de *E. faecalis*) dentro de la muestra sin recurrir a procedimientos de ensayo adicionales. El medio proporciona un vehículo para detectar VRE en términos generales y ciertas especies de VRE específicamente (por ejemplo, *E. faecium*, *E. faecalis*, y *E. gallinarum* / *E. casseliflavus*) a partir de una muestra biológica usando un solo procedimiento de ensayo.

25 El medio puede comprender además componentes de crecimiento tales como aminoácidos, vitaminas, sal y elementos en forma de trazas, en cantidades suficientes para permitir la viabilidad y la reproducción de enterococos en presencia de una pluralidad de sustratos. Un primer sustrato es específico para una enzima producida por una primera especie de enterococos. Un segundo sustrato es específico para una enzima producida por una segunda especie de enterococos. Es ventajoso si al menos dos de los sustratos se conjugan con una especie cromogénica. El sustrato conjugado con la especie cromogénica se denomina sustrato cromogénico en la presente. Los sustratos cromogénicos son proporcionados en una cantidad suficiente para permitir una señal característica detectable que va a producirse en el medio por el crecimiento de la especie de enterococo que es específica para el sustrato cromogénico. El medio puede contener además un inhibidor de enterococos no resistentes a vancomicina, el cual comprende vancomicina y al menos una cefalosporina. En una forma de realización, el inhibidor de enterococo no resistente a vancomicina es una combinación de vancomicina y cefoxitina. En otras modalidades, el inhibidor de enterococos no resistente a vancomicina comprende además otros inhibidores (agentes selectivos) que seleccionarán organismos que no son dianas, que pueden "abrirse camino" de otra manera y crecer y producir un falso positivo. En una forma de realización, el agente selectivo es eritromicina. La eritromicina impide a los lactobacilos crecer en los medios. Dejada sin seleccionar, una colonia de lactobacilos podría crecer y producir una falsa indicación de que VRE está presente en la muestra. La invención contempla muchos agentes selectivos diferentes.

40 El procedimiento de la invención puede llevarse a cabo en un contenedor en un solo paso. En el procedimiento, una muestra biológica se combina con el medio de la invención. Para VRE, esa muestra es frecuentemente un frotis rectal. En esta forma de realización, se emplea un medio selectivo de VRE. Como tal, vancomicina es un componente del medio. En una forma de realización, el medio es agar con nutrientes para apoyar tal crecimiento y agentes selectivos para suprimir el crecimiento de organismos que no son VRE. El medio contiene antibióticos adicionales para suprimir o eliminar el crecimiento de organismos que no son dianas que pueden crecer en presencia de vancomicina. El medio también contiene al menos dos sustratos que se seleccionan para enzimas producidas por los organismos que son dianas, tal como se ha descrito antes. El medio se expone luego a condiciones que causan el crecimiento de los organismos diana. El medio se inspecciona luego directamente para una indicación de la presencia de una o más especies de VRE, sin someter el medio a ensayos adicionales.

50 **Breve descripción de las figuras**

La figura 1 representa una placa de agar en la cual se visualizan dos colores distintos de colonia que identifican dos especies diferentes de VRE.

La figura 2 representa una placa de agar en la cual se visualizan tres colores distintos de colonia que identifican tres especies diferentes de VRE.

55 **La figura 3** un diagrama de flujo que representa una forma de realización de la presente invención que forma imagen y diferencia claramente tres especies de VRE.

La figura 4 compara colonias que forman imagen en placas de agar que tienen diferentes formulaciones que seleccionan para VRE.

Descripción detallada

Las siguientes definiciones son empleadas para propósitos de esta divulgación.

- 5 Tal como se usa en la presente memoria, el término "medio" (plural "medios") se refiere a una mezcla sólida, semisólida, en polvo o líquida, que contiene todos o sustancialmente todos los componentes necesarios para permitir que un microbio crezca y se reproduzca. El medio puede ser estéril o no estéril tal como requiere generalmente la práctica aceptada.
- 10 Tal como se usa en la presente memoria, el término "muestra biológica" se refiere a cualquier muestra tomada o proveniente de una sustancia que, se espera, puede contener bacterias y/u otros microorganismos, e incluye muestras del ambiente (por ejemplo, suelo o agua), o muestras de humanos (por ejemplo, muestras clínicas tales como heces, frotis rectal, orina, sangre, heridas).
- Tal como se usa en la presente memoria, el término microorganismos se refiere a organismos microscópicos e incluye bacterias, hongos, levaduras, mohos y virus.
- 15 Tal como se usa en la presente memoria, el término "infiltración" se refiere al acto de introducir una muestra a la superficie de una placa de agar rozando una herramienta adecuada (tal como un bucle de inoculación) a través de la superficie de la placa de agar.
- Tal como se usa en la presente memoria, el término "cantidad efectiva de nutriente" se refiere a una cantidad dentro del intervalo que permite o promueve el crecimiento de la reproducción de un microorganismo diana. Es decir, una cantidad que permite que los microbios u otros organismos se adapten al medio, sinteticen los componentes necesarios para reproducción y a continuación se reproduzcan.
- 20 Tal como se usa en la presente memoria, el término "cantidad efectiva de sustrato" se refiere a la cantidad de sustrato requerido para lograr el efecto deseado sin interferir con la actividad deseada de otros sustratos que pueden estar presentes en el medio.
- 25 Los términos "vitaminas", "aminoácidos", "elementos de trazas" y "sales" pretenden incluir todas las moléculas, compuestos y sustancias (en lo sucesivo sustancias), clasificados en cada categoría por aquellos con habilidad en la técnica, ya sean orgánicos o inorgánicos, y las categorías no se refieren a si tales sustancias son necesarias o propicias o no para mantener vida.
- Tal como se usa en la presente memoria, el término "fracción que forma imagen" se refiere a una fracción que al activarse proporciona una señal detectable tal como un cambio de color, fluorescencia o un cambio en el pH.
- 30 Tal como se usa en la presente memoria, el término sustrato cromogénico o cromógeno se refiere a un sustrato conjugado con un cromóforo. Al disociarse de un sustrato, el cromóforo se oxida y produce un color visible. De manera similar, un sustrato fluorogénico o fluorogeno se refiere a un sustrato acoplado a un fluoróforo. Un fluoróforo, como el nombre lo indica, proporciona una señal fluorescente. El uso de sustratos fluorogénicos en la presente invención también es contemplado como adecuado.
- 35 Tal como se usa en la presente memoria, el término "sustrato inductor" se refiere a un sustrato capaz de inducir la expresión de una enzima o enzimas que de otra manera permanecerían no expresadas.
- Tal como se usa en la presente memoria, el término "señal característica detectable" se refiere a cualquier cambio en una muestra que puede ser detectada por uno o más de los sentidos humanos. El término incluye tales ejemplos como cambio de color en los intervalos de longitud de onda visible o invisible, un cambio en el estado tal como entre sólido, líquido, gas, una emisión de gases o un cambio en el olor.
- 40 Tal como se usa en la presente memoria, el término "microbio diana" se refiere al microorganismo cuya presencia o ausencia busca ser detectada.
- 45 El medio descrito en la presente permite la detección y la identificación de VRE a nivel de especie proporcionando sustratos cromogénicos en un medio capaz de soportar el crecimiento de una pluralidad de especies de VRE. El medio inhibe el crecimiento de organismos que no son VRE y, opcionalmente, algunas especies de organismos VRE.
- 50 En general, un medio capaz de soportar el crecimiento de microbios contiene una variedad de componentes. En un mínimo, tales medios deben incluir aminoácidos, sales, vitaminas, una fuente de carbono y otras fracciones inorgánicas. Los aminoácidos se encuentran disponibles a partir de una variedad de fuentes que incluyen fuentes naturales (por ejemplo, digeridos de tejido animal). Pueden proporcionarse como mezclas o en forma purificada. Las mezclas de aminoácidos obtenidos a partir de fuentes naturales contienen con frecuencia cantidades variables de cada aminoácido. No todos los aminoácidos tienen que ser proporcionados y la cantidad relativa puede variar. A continuación se proporciona un listado de componentes del medio y sus cantidades, que se ofrecen como una guía y no como una limitación.

ES 2 645 455 T3

El medio puede contener al menos los siguientes aminoácidos en aproximadamente las siguientes cantidades (gramos por litro de medio {g/l}): alanina (0,1 a 0,3 g/l), arginina (0,1 a 0,3 g/l), ácido aspártico (0,4 a 0,7 g/l), cistina (0,01 a 0,015 g/l), ácido glutámico (1,0 a 1,6 g/l), glicina (0,12 a 0,17 g/l), histidina (0,116 a 0,17 g/l), isoleucina (0,25 a 0,37 g/l), leucina (0,4 a 0,6 g/l), lisina (0,37 a 0,56 g/l), metionina (0,13 a 0,19 g/l), fenilalanina (0,2 a 0,3 g/l), prolina (0,4 a 0,6 g/l), serina (0,18 a 0,26 g/l), treonina (0,19 a 0,28 g/l), tritófano (0,05 a 0,07 g/l), tirosina (0,12 a 0,18 g/l), y valina (0,29 a 0,44 g/l).

Pueden proporcionarse sales al medio como una fuente de iones después de disociación. Tales sales pueden incluir (por 1 de medio): cloruro de potasio (0,5 a 1,5 g), sulfato de cobre (40 a 50 microgramos (µg)), sulfato de amonio (4,0 a 6,0 g), yoduro de potasio (50 a 150 µg), sulfato de manganeso (300 a 500 µg), molibdato de sodio (150 a 250 µg), sulfato de zinc (300 a 500 µg), y cloruro de sodio (0,05 a 0,15 g).

También deben proporcionarse vitaminas requeridas para el crecimiento y la reproducción del microorganismo cuya detección se busca. Éstas pueden proporcionarse en forma purificada o como mezclas. Tales vitaminas pueden incluir (por 1 de medio): biotina (220 a 330 µg), ácido pantoténico (44 a 66 µg), piridoxina (9 a 14 miligramos (mg)), riboflavina (11 a 17 mg), ácido fólico (6 a 8 mg), tiamina (16 a 24 mg), niacina (15 a 23 mg), y elementos de trazas (menos de aproximadamente 10 µg) de cianocobalamina.

Una fuente de carbono también puede proporcionarse. Puede proporcionarse azúcar como la fuente de carbono, ejemplos de los cuales incluyen (g/l): dextrosa (0,1 a 10), sacarosa (0,1 a 10), maltosa (0,1 a 10), lactosa (0,1 a 10), xilosa (0,1 a 10), galactosa (0,1 a 10) y almidón (0,1 a 10). Otros nutrientes incluyen peptonas tales como peptonas de caseína, peptonas de soja y peptonas de carne.

Los medios pueden incluir opcionalmente otras sustancias inorgánicas para ayudar en el crecimiento microbiano. Estas incluyen (en la medida que no se proporcionen en las fuentes anteriores, por 1 de medio): fósforo (0,5 mg), potasio (0,4 mg), sodio (30 a 60 mg), y cantidades de trazas (menos de 10 µg) de calcio, magnesio, aluminio, bario, cloruro, cobalto, cobre, hierro, plomo, manganeso, sulfato, azufre, estaño y zinc.

Además de los componentes que promueven el crecimiento de microbios diana, también pueden incluirse en componentes que inhiben el crecimiento de microbios no diana (y que causan por lo tanto que los medios se seleccionen para VRE). Estos componentes se diferencian entre los organismos diana (por ejemplo enterococos que contienen *vanA* y *vanB*) y organismos que no son diana (es decir, organismos que no son VRE). Por ejemplo, y no a manera de limitación, (en g/l), colistina (0,005 a 0,04), ácido nalidíxico (0,003 a 0,01), y anfotericina B (0,006 a 0,02) pueden adicionarse además a la vancomicina que se encuentra presente en una concentración ejemplar de 0,004 a 0,016 g/l para inhibir o impedir el crecimiento de no enterococos y enterococos sensibles a vancomicina en el medio. Preferiblemente, el medio tiene una concentración de vancomicina de 0,006 a 0,01 g/l. Los microbios que no son diana que pueden interactuar con los sustratos en el medio para producir un efecto observable (tal como un color) que es similar al color producido por la interacción de VRE con los sustratos cromogénicos en los medios son de interés particular. Los lactobacilos, si están presentes, interactuarán con los sustratos en los medios y la colonia tendrá un color similar al color de una especie VRE diana. Por lo tanto, es ventajoso si el medio contiene una cantidad de eritromicina (0,0001 a 0,01 g/l) que suprime el crecimiento de lactobacilos pero no afecta adversamente el crecimiento de los organismos diana o la diferenciación de especie de los organismos diana en los medios.

La tabla 1 dada a continuación también incluye una cefalosporina (por ejemplo cefoxitina). La cefoxitina, en combinación con la vancomicina, inhibirá selectivamente las cepas que contienen *vanC*, dejando las cepas que contienen *vanA* y *vanB* a distinguirse una de otra con base en la interacción selectiva de cada una con su sustrato cromogénico respectivo. En determinadas configuraciones, se prefiere suprimir el crecimiento de las cepas que contienen *vanC*, antes que permitir que crezcan las cepas que contienen *vanC* en un ambiente en el cual puedan distinguirse de las cepas que contienen *vanA* y *vanB*. Cefoxitina se encuentra presente en una cantidad de 0,002 g/l a 0,04 g/l para llevar a cabo este objetivo. Preferiblemente, la cefoxitina se encuentra presente en una cantidad de 0,004 g/l a 0,02 g/l para llevar a cabo este objetivo.

Pueden proporcionarse medios en varias formas que incluyen, por ejemplo, sólidos, polvos (Ray hidratados antes de usarse), semisólidos (por ejemplo, medio a base de agar) o líquidos (por ejemplo caldo).

Un medio semisólido, adecuado para promover el crecimiento de VRE mientras se suprime el crecimiento de no VRE (incluyendo géneros distintos de *Enterococcus*) se describe en la Tabla 1 dada a continuación.

50

TABLA 1

Componente	Cantidad (g/l)
A. Soporte del crecimiento de VRE	
Peptona de caseína	5 a 30
Sulfato de magnesio	aproximadamente 0,4

Componente	Cantidad (g/l)
Cloruro de sodio	aproximadamente 3,95
Agar	aproximadamente 13,45
Dextrosa	aproximadamente 1,05
Extracto de carne de vacuno	aproximadamente 0,25
Peptona de soja	5 a 25
Almidón soluble	aproximadamente 0,5
Extracto de levadura	aproximadamente 0,075
Piruvato de sodio	aproximadamente
Peptona de carne	10 a 25
Fosfato de sodio dibásico	aproximadamente 1,3
B. Inhibición del crecimiento de organismos que no son VRE	
Vancomicina	0,004 a 0,016
Colistina	0,005 a 0,04
Ácido nalidíxico	0,003 a 0,01
Anfotericina B	0,006 a 0,02
Cefoxitina	0,004 a 0,02

- La formulación descrita antes se proporciona para propósitos ilustrativos. Alguien hábil en la técnica reconocerá que hay muchas alternativas adecuadas para los componentes específicos enumerados en la tabla anterior. Por ejemplo, polimixina B (en una concentración de 0,012 a 0,075 g/l) y aztreonam (en una concentración de 0,005 a 0,1 g/l), son contemplados como ejemplos de alternativas a la colistina y ácido nalidíxico, respectivamente, en el medio. Sin embargo, en determinadas formas de realización preferidas aztreonam se encuentra presente además de colistina, ácido nalidíxico y los otros componentes que inhiben el crecimiento de organismos que no son VRE. Polimixina B y aztreonam son capaces de realizar la misma función (es decir, suprimir barras gramnegativas) en el medio que la colistina y el ácido nalidíxico. Sin embargo, la polimixina B como una alternativa en la actualidad es, en cierto modo, menos preferida, desde una perspectiva de fabricación y de estabilidad, que la colistina y el ácido nalidíxico. Otro antibiótico contemplado para suprimir el crecimiento de organismos que no son VRE (por ejemplo *Lactobacillus*) es eritromicina. Mientras que muchos antibióticos son conocidos por suprimir el crecimiento de *Lactobacillus*, (por ejemplo clindamicina), eritromicina lo hace sin inhibir o afectar de alguna otra manera el crecimiento de VRE en los medios.
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- Mientras que el medio descrito en la tabla 1 es capaz de detectar la presencia de VRE, no puede identificar qué organismo se encuentra presente. A fin de diferenciar entre especies de VRE en una muestra biológica, tienen que añadirse sustratos cromogénicos específicos y únicos para las bacterias diana. Por lo tanto, el medio descrito en la presente tiene sustratos cromogénicos específicos adicionados al mismo. Los sustratos cromogénicos son bien conocidos por aquellos con habilidad en la técnica y se encuentran comercialmente disponibles.
- Los sustratos cromogénicos, como se describen en la presente memoria, tienen dos componentes básicos: i) el sustrato (por ejemplo, nominalmente alfa-D-glucopiranosido); y ii) un cromóforo conjugado con el sustrato. Los sustratos descritos en la presente son ejemplos específicos de una gran clase de sustratos cromogénicos conocidos, generalmente denominados sustratos de indolilo). Alguien hábil en la técnica está consciente de que tales sustratos de indolilo se encuentran comercialmente disponibles. Un cromógeno, tal como se usa en la presente es una sustancia que es capaz de conversión en un pigmento. Enzimas específicas hidrolizan sustratos específicos. Después de hidrólisis, el cromóforo se libera del sustrato y produce una señal característica (por ejemplo, presenta un color distinto). Como se ha notado previamente, el hecho de si se hidrolizará o no un sustrato cromogénico y de si el cromóforo liberado, se ve afectado por varios factores. Un factores la presencia de otros sustratos, por ejemplo

beta-D-galactopiranosido no se hidroliza o se hidroliza menos por especies de enterococos cuando está presente beta-D-glucopiranosido. Asimismo, no todos los cromógenos presentarán su señal característica en presencia de otros cromógenos (por ejemplo, determinados cromóforos fluorescentes apagarán la fluorescencia de otros cromóforos cuando ambos se expresen simultáneamente). Muchos sustratos no son específicos para una especie pero en lugar de esto son específicos para un género, por ejemplo esculina y PIR son específicos para género para *Enterococcus* pero no hacen especiación dentro del género. Por lo tanto, la selección y la cantidad de cualquier sustrato cromogénicos de este tipo es crítico para la identificación última de VRE al nivel de especie.

Aunque no desea vincularse a una teoría particular, la solicitante cree que la identificación de dos o más especies de VRE se lleva a cabo con el medio inventivo debido a que VRE específicos producen enzimas específicas para la especie, ya sea naturalmente o de manera inducida. Cada enzima asociada a la especie es específica para un sustrato en los medios. Dichos sustratos se conjugan con diferentes cromóforos, seleccionados por su capacidad de percibirse visualmente de manera simultánea. Cuando la enzima producida por VRE interactúa selectivamente con su sustrato específico, se emite el cromóforo conjugado con dicho sustrato y se produce su señal característica detectable visualmente. Como se ha notado previamente, la señal característica es discernible incluso si otros cromógenos forman imágenes simultáneamente.

En una forma de realización de la presente invención, los medios contienen dos sustratos cromogénicos. El primer sustrato es específico para un enzima que se produce por una especie de enterococos y el segundo sustrato es específico para una enzima producida por una especie diferente de enterococos. En esta forma de realización, ambas especies de enterococos son colectivamente los microbios diana. La alfa-D-glucosidasa y la beta-D-galactosidasa son las enzimas producidas por estos microbios. Cada microbio diana hidroliza selectivamente el respectivo sustrato cromogénicos en el medio para producir una señal detectable, distintiva.

Alguien versado en la materia apreciará que el efecto observado (es decir, el cambio de color) asociado con la hidrólisis, específica para la enzima, del sustrato cromogénico es local. Por local se quiere decir que el cambio de color ocurrirá en esa región del sustrato donde se encuentra localizada la especie de microbio que produce la enzima. Si se encuentran localizadas cerca dos especies juntas, ambas formarán imágenes debido a que los sustratos cromogénicos se seleccionan para asegurar que cada cromógeno formará imágenes independientemente incluso si la formación de imágenes es próxima a la del otro cromógeno. Como se ha notado previamente, el cambio de color puede ser dentro del intervalo visible de longitud de ondas. Para fluorógenos, las señales fluorescente y, por lo tanto, es visible en un intervalo de longitudes de onda después de exposición a una fuente de luz de excitación.

En una forma ejemplar de realización para producir imágenes selectivamente de las especies de *E. faecium* y *E. faecalis* de enterococos, los sustratos cromogénicos proporcionados en los medios son un indolilo-beta D-galactopiranosido y un indolilo-alfa D-glucopiranosido (los sustratos cromogénicos se encuentran comercialmente disponibles por parte de una variedad de proveedores). El medio resultante no sólo indicará la presencia de VRE, sino también distinguirá visualmente entre *E. faecalis* y *E. faecium* si ambas presencias se encuentran presentes. Si solamente una de *E. faecalis* o *E. faecium* se encuentra presente, el color exhibido por el medio y/o la colonia, se hay alguna, indicarán cuál de *E. faecalis* o *E. faecium* se encuentra presente.

En otra forma de realización, dos sustratos cromogénicos y un tercer sustrato se adicionan al medio específico de VRE. En referencia a la FIG. 3, en esta forma de realización cada sustrato (nominalmente sustrato A (30), sustrato B (31) e inductor (32)) interactúa específicamente con determinadas enzimas (enzima A (41), enzima B (42) producidas por diferentes especies de enterococos (*E. faecalis*, *E. faecium*, y *E. gallinarum*/*E. casseliflavus* en FIG. 3), de modo que la visualización de las fracciones cromogénicas no interfiere unas con otras. En esta forma de realización, el tercer sustrato (inductor) (32) induce la producción de una enzima (enzima A (41)) en una tercera especie de enterococos (por ejemplo, *E. gallinarum* o *E. casseliflavus*). El tercer sustrato (32) no tiene un cromógeno adherido al mismo. Es por esta razón que el tercer sustrato, en esta forma de realización, se denomina sustrato inductor.

En una forma ejemplar de realización, la especie de enterococos que los sustratos identifican son las especies previamente mencionadas de enterococos resistentes a vancomicina (es decir, que distinguen *E. faecalis* de *E. faecium* de *E. gallinarum*/*E. casseliflavus*). Los sustratos cromogénicos son indolilo-beta D-galactopiranosido (Mag B gal) e indolilo-alfa D-glucopiranosido (X-alfa glu). Como previamente se ha notado, estos sustratos de indolilo se encuentran comercialmente disponibles. El sustrato inductor es metil-alfa-D-glucopiranosido (MGP). El sustrato inductor (32) causa que las especies *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* produzcan la enzima A (41) además de la enzima B (42). La enzima A hidroliza indolilo-alfa D-glucopiranosido para producir el color A (50). Puesto que *E. casseliflavus* y *E. gallinarum* ya producen la enzima, beta-D-galactopiranosidasa, la enzima B (42) también se hidroliza. Por consiguiente, si se encuentra presente *E. faecalis* en esta forma de realización, los medios formarán imágenes de un primer color (50) de colonias de *E. faecalis*. Si se encuentra presente *E. faecium*, los medios formarán imágenes de un segundo color (51) de las colonias de *E. faecium*. Si se encuentran presentes *E. gallinarum* y/o *E. casseliflavus*, los medios formarán la imagen de un tercer color (52) de las colonias de *E. gallinarum* y/o de *E. casseliflavus*. El tercer color (52) es una combinación del primer color (50) y del segundo color (51). En referencia a la FIG. 2, se ilustran los diferentes colores (50, 51, y 52) para las tres colonias (*E. faecalis*, *E. faecium* y *E. gallinarum* y/o *E. casseliflavus*).

El medio resultante permitirá la detección de VRE y la identificación de al menos tres especies diferentes, específicas de VRE utilizando una muestra y un ensayo.

5 En otra forma de realización, dos sustratos cromogénicos y cefalosporina (una clase de una clase de antibióticos de β -lactama) se adicionan al medio específico de VRE. En esta modalidad, la combinación de cefalosporina con vancomicina inhiben selectivamente cepas que contienen *vanC*, dejando que se distingan una de otra las cepas que contienen *vanA* y *vanB* después de la interacción selectiva de cada una con su sustrato cromogénico respectivo.

10 En una forma de realización ejemplar, la especie de enterococos para cuya identificación se seleccionan los sustratos cromogénicos son las especies previamente mencionadas de enterococos resistentes a vancomicina (es decir, *E. faecalis* y *E. faecium*). Los sustratos cromogénicos son indolilo-beta D-galactopiranosido e indolilo-alfa D-glucopiranosido. La cefalosporina es cefoxitina. Cefoxitina se encuentra comercialmente disponible a partir de una variedad de fuentes. Si se encuentra presente *E. faecium*, los medios forman imágenes de un primer color de las colonias de *E. faecium*. Si se encuentra presente *E. faecalis*, los medios formarán imagen de un segundo color de las colonias de *E. faecalis*. El crecimiento de organismos que contienen *vanC* (*E. gallinarum* y/o *E. casseliflavus*) es inhibido por la presencia de la cefalosporina (por ejemplo cefoxitina) en combinación con la vancomicina.

15 La invención, tal como se ha descrito antes en términos de determinadas formas de realización, se entiende aún más con referencia a los siguientes ejemplos.

20 La figura 1 representa una placa de aplicación por rozamiento en la cual pueden verse dos colores de colonia distintos. Una muestra mezclada que contiene *E. faecium* y *E. faecalis* fue rayada sobre una placa de cribado que comprendía el medio descrito en la tabla 1 al cual se adicionaron los sustratos cromogénicos (indolilo- beta-D-galactopiranosido e indolilo-alfa-D-glucopiranosido) (0,2 y 0,1 g/l, respectivamente). Las colonias de color malva que fueron obtenidas indicaron la hidrólisis de indolilo- beta-D-galactopiranosido por parte de *E. faecium* mientras que las colonias verdes que fueron obtenidas indicaron la hidrólisis de indolilo-alfa-D-glucopiranosido por parte de *E. faecalis*.

25 La figura 2 representa una placa de aplicación por rozamiento en la cual se observaron tres colores de colonia distintos. Una muestra mezclada que contiene *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. gallinarum*/*E. casseliflavus* fue aplicada rozando sobre una placa de cribado que comprendía el medio descrito en la tabla 1 a la cual se habían adicionado los sustratos cromogénicos, indolilo-beta-D-galactopiranosido e indolilo-alfa-D-glucopiranosido, el sustrato inductor MGP ((0,2, 0,1 y 5,0 g/l, respectivamente). Como en la figura 1, las colonias de color malva indican la hidrólisis de indolilo- beta-D-galactopiranosido por parte de *E. faecium* mientras que las colonias verdes indican la hidrólisis de indolilo-alfa-D-glucopiranosido por parte de *E. faecalis*. Las colonias coloreadas de azul indican la hidrólisis tanto de indolilo- beta-D-galactopiranosido como de indolilo-alfa-D-glucopiranosido por parte de *E. casseliflavus* y *E. gallinarum*. La figura 2 demuestra cómo pueden distinguirse las especies de enterococos epidemiológicamente importantes, *E. faecium* y *E. faecalis*, de las especies de enterococos epidemiológicamente insignificantes, *E. casseliflavus* y *E. gallinarum*.

35 Un medio semi-sólido, adecuado para promover el crecimiento de VRE mientras se suprime el crecimiento de no-VRE (incluyendo géneros distintos de *Enterococcus*) se describe en la tabla 2 dada a continuación.

TABLA 2

Componente	Cantidad (g/l)
A. Soporte del crecimiento de VRE	
Peptona de caseína	5 a 30
Sulfato de magnesio	aproximadamente 0,4
Cloruro de sodio	aproximadamente 3,95
Agar de sexetam	13,45
Dextrosa	1,05
Extracto de carne de vacuno	0,25
Peptona de soja	5 a 25
Almidón soluble	aproximadamente 0,5
Extracto de levadura	aproximadamente

Componente	Cantidad (g/l)
	0,075
Piruvato de sodio	aproximadamente 0,25
peptona de carne	10 a 25
Fosfato de sodio dibásico	aproximadamente 1,3
B. Inhibición del crecimiento de organismos que no son VRE	
Vancomicina	0,004 a 0,016
Aztreonam	0,001 a 0,01
Colistina	0,0005 a 0,04
Ácido nalidíxico	0,003 a 0,01
Anfotericina B	0,006 a 0,2
Eritromicina	0,0001 a 0,01
Cefoxitina	0,004 a 0,02

Esta formulación contiene los antibióticos aztreonam y eritromicina además de los inhibidores listados en la tabla 1.

Ejemplo 1: Titulación de vancomicina y adición con cefoxitina

- 5 Se prepararon medios para evaluar el efecto de incrementar la concentración de vancomicina sobre la sensibilidad de las especies de enterococos que contienen *vanA*, *vanB* (es decir *E. faecium* y *E. faecalis*), y *vanC* (es decir *E. casseliflavus* / *E. gallinarum*). Fueron obtenidos aislados de los organismos diana de interés (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus* y *E. gallinarum*). Se preparó una suspensión para cada aislado que era equivalente a una McFarland 0,5 (10^8). Las suspensiones fueron diluidas de acuerdo con los lineamientos en el documento M22-A3 del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).
- 10 Fueron preparados medios tal como se describen en la tabla 3 dada a continuación. Para aislamiento de las muestras se usó un procedimiento de aplicación por rozamiento estándar para inoculación. Cada aislado fue inoculado a cada formulación de medios. Las placas fueron luego incubadas en aire ambiente (35°C) y observadas después de 24 h de incubación.

TABLA 3

Componente	Cantidad (g)							
	A	B	C	D	E	F	G	H
A. Soporte del crecimiento de VRE								
peptona de caseína	30	30	30	30	30	30	30	30
Sulfato de magnesio	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Cloruro de sodio	5	5	5	5	5	5	5	5
Peptona de carne	10	10	10	10	10	10	10	10
Agar de sexetam	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5
peptona de soja	6	6	6	6	6	6	6	6
Almidón soluble	5	5	5	5	5	5	5	5
Extracto de levadura	2	2	2	2	2	2	2	2
Piruvato de sodio	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Componente	Cantidad (g)							
Infusión de cerebro corazón (BHI)	5	5	5	5	5	5	5	5
Fosfato de sodio dibásico	5	5	5	5	5	5	5	5
B. Inhibición del crecimiento de organismos que no son VRE								
Vancomicina	0,005	0,0055	0,006	0,01	0,013	0,016	0,005	0,005
Colistina	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Ácido nalidíxico	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,006
Anfotericina B	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Cefoxitina	0	0	0	0	0	0	0,006	0
Aztreonam	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Sustratos de C.								
MGP	3	3	3	3	3	3	3	3
X-alfa glu	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
Mag B gal	3	3	3	3	3	3	3	3
D. Otros								
Agua (ml)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Fueron preparados diversos antibióticos como soluciones madre. Fueron hechas diluciones apropiadas a partir de cada solución madre para lograr las concentraciones especificadas en la tabla anterior.

5 Se observó que la formulación A, que contenía 5 µg de vancomicina tenía el color más distintivo (azul) para los aislados que contenían *vanC*. Sin embargo, las colonias de dos cepas de *E. gallinarum* tenían un color verde. Hubo alguna dificultad al distinguir el color verde producido por estas dos cepas de las especies *E. faecalis* en esta formulación. Incrementar la concentración de vancomicina causó que el medio perdiera sensibilidad en la recuperación de aislados de *vanA* y *vanB*.

10 La muestra G produjo un resultado sorprendente. Mientras que los aislados de *E. faecalis* y *E. faecium* fueron recuperados sobre los medios, 8 de los 10 aislados de las especies que contenían *vanC* fueron suprimidos. La muestra G era la única muestra que contenía el antibiótico cefoxitina.

Ejemplo 2: Ensayo de sinergia de vancomicina-cefalosporina

15 Con el fin de entender mejor el efecto de cefoxitina en los aislados de *vanC*, fueron evaluados los medios que tenían diferentes cefalosporinas con y sin vancomicina. Las cefalosporinas ensayadas representaron cada una de las cuatro generaciones: cefalotin (1ª gen.), cefoxitina (2ª gen.), cefotaxima (3ª gen.), y cefipima (4ª gen.). También se evaluaron los medios que contenían penicilina con y sin vancomicina.

20 Las formulaciones para los medios evaluados se presentan en la tabla 4 dada a continuación. Fueron obtenidos aislados de interés (principalmente enterococos que contienen *vanA*, *vanB*, y *vanC*). Cada aislado fue inoculado en cada formulación de medio punto las placas fueron incubadas luego en aire ambiente (35°C) y observadas después de 24 h de incubación.

TABLA 4

Componentes	Cantidades (g/L)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Peptona de caseína	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
BHI	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Peptona de carne	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Componentes	Cantidades (g/L)											
Extracto de levadura	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Peptona de soja	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Agar de sexetam	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5
Almidón soluble	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Fosfato de potasio	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Sulfato de magnesio	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Cloruro de sodio	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Piruvato de sodio	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
MGP	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
X-alfa-glu	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
Mag-B-Gal	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Vancomicina	0,006							0,006	0,006	0,006	0,006	0,006
Anfotericina B	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Ácido nalidíxico	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006
Colistina	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Cefoxitina		0,02						0,02				
Cefotaxima			0,02						0,02			
Cefipima				0,02						0,02		
Cefalotin					0,02						0,02	
Penicillina						0,02						0,02
Agua (cant. en ml)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Los diversos antibióticos fueron preparados como soluciones madre. Fueron hechas diluciones apropiadas a partir de cada solución madre con el fin de lograr la concentración final tal como se especifica en la formulación.

- 5 Los medios, después de incubación en placas de Petri tal como se ha descrito antes, fueron observados para determinar qué colonias se desarrollaron y el color de aquellas colonias. Algunos resultados son ilustrados en la FIG.4. Específicamente, la placa 100, que contenía la formulación 1 anterior (sólo vancomicina), tenía colonias de color azul brillante (indicadas mediante sombreado horizontal cruzado). Esto indica que las especies de enterococos que contienen *vanC* no fueron inhibidas por la vancomicina en la formulación 1. Fueron observados resultados similares en la placa de Petri 110 para la formulación 2 (que no contenía vancomicina pero sí contenía cefoxitina).
- 10 Esta formulación no inhibía las especies de enterococos que contenían *vanC*. La placa 120 contenía la formulación 7 (vancomicina y cefoxitina). La completa ausencia de colonias azules indicó que la formulación 7 (la combinación de vancomicina y cefoxitina sin otros inhibidores de VRE) inhibió completamente los enterococos que contenían *vanC*.

15 El efecto de las formulaciones 1, 2, y 7 en aislados que contenían *vanA* y *vanB* se ilustra en las placas 130-150. Específicamente, ninguna de las formulaciones inhibió el crecimiento de las especies que contenían *vanA* y *vanB*. Las colonias de *E. faecium* se indican por medio del color malva (sombreado vertical cruzado). Las colonias de *E. faecalis* son indicadas por el color verde (sombreado diagonal cruzado). Por consiguiente, no se observó que las formulaciones ensayadas con vancomicina sola, cefoxitina sola y una combinación de cefoxitina y vancomicina suprimieran coincidieran el crecimiento de enterococos que contenían *vanA* y *vanB*.

20 Las otras cefalosporinas ensayadas, con vancomicina, no produjeron el mismo efecto que cefoxitina (inhibición de aislados que contenían *vanC* mientras que permitieron la recuperación de aislados de *vanA* y *vanB*). Mientras que

se observó (para la mayor parte) que inhibían los aislados de *vanC*, también se observó que inhibían muchos de los aislados de *vanA* y *vanB*.

En referencia a las formulaciones 6 y 11 (sin y con vancomicina, respectivamente), se encontró que los medios que contenían en histidina eran demasiado inhibidores, que suprimieran casi todos los aislados.

- 5 Aunque cefoxitina fue la única cefalosporina que produjo los resultados deseados en este experimento, otras cefalosporinas además de cefoxitina, distintas de aquellas ensayadas, son contempladas con probabilidad de producir inhibición aceptable de aislados de *vanC* sin inhibir aislados de *vanA* y *vanB*.

REIVINDICACIONES

1. Un medio de identificar y distinguir especies de enterococos colocadas en el medio que comprende:

(a) un primer sustrato conjugado con una primera fracción para formación de imágenes, en el que el primer sustrato se selecciona para interactuar preferencialmente con una primera enzima que se produce por una primera especie de enterococos en comparación con una segunda enzima que se produce por una segunda especie de enterococos; y

(b) un segundo sustrato conjugado con una segunda fracción para formación de imágenes, en el que el segundo sustrato se selecciona para interactuar preferencialmente con la segunda enzima que se produce por la segunda especie de enterococos en comparación con la primera enzima que se produce por la primera especie de enterococos;

en el que la primera fracción para formación de imágenes produce la imagen de un primer indicador cuando el primer sustrato interactúa con la primera enzima y la segunda fracción para formación de imágenes produce la imagen de un segundo indicador cuando el segundo sustrato interactúa con la segunda enzima y el primer indicador es diferente, por percepción, del segundo indicador; y

(c) o bien un tercer sustrato, o bien un tercer sustrato y una cefalosporina, en el que el tercer sustrato induce la producción de la primera enzima por parte de al menos una tercera especie de enterococos, y la presencia combinada de la primera fracción para formación de imágenes y la segunda fracción para formación de imágenes produce una imagen de un tercer indicador en la presencia combinada de la primera enzima y la segunda enzima producidas por parte de al menos la tercera especie de enterococos, en el que el primero, el segundo y el tercer indicador son diferentes unos de otros, por percepción, y el tercer sustrato no tiene un cromógeno adherido al mismo; o

(c') un inhibidor de enterococos no resistente a vancomicina que comprende vancomicina y al menos una cefalosporina, en el que la cefalosporina inhibe el crecimiento de la tercera especie de enterococos pero no el crecimiento de la primera o de la segunda especie de enterococos, y la presencia combinada de la primera fracción para formación de imágenes y la segunda fracción para formación de imágenes forman la imagen de un tercer indicador en la presencia combinada de la primera enzima y la segunda enzima producidas por la al menos tercera especie de enterococos, en el que el primero, el segundo y el tercer indicadores son diferentes unos de otros, por percepción.

2. El medio de la reivindicación 1, en el cual la primera fracción para formación de imágenes es un primer cromóforo y la segunda fracción para formación de imágenes es un segundo cromóforo, y el medio comprende además un tercer sustrato que interactúa con al menos una tercera especie de enterococos para formar la imagen de un tercer indicador que es diferente por percepción del primer indicador o del segundo indicador.

3. El medio de la reivindicación 2, en el cual la tercera especie de enterococos produce una enzima normalmente reprimida en respuesta a la interacción con el tercer sustrato, en el que la enzima reprimida normalmente interactúa de forma preferencial con el primer sustrato para formar la imagen del primer indicador.

4. El medio de la reivindicación 3 en el cual

(i) la tercera especie de enterococos produce una enzima que es la misma o diferente de la segunda enzima y que interactúa preferencialmente por el segundo sustrato para formar la imagen del segundo indicador y en el que el primer indicador y el segundo indicador conjuntamente son el tercer indicador; o

(ii) el tercer sustrato induce la tercera especie para producir la primera enzima, en el que la primera enzima es alfa-D-glucopiranosidasa, y en el que la al menos tercera especie de enterococos se selecciona de *E. casseliflavus* y *E. gallinarum*.

5. El medio de la reivindicación 1 que comprende además inhibidores de enterococos no resistentes a vancomicina.

6. El medio de la reivindicación 5 en el cual los inhibidores comprenden vancomicina.

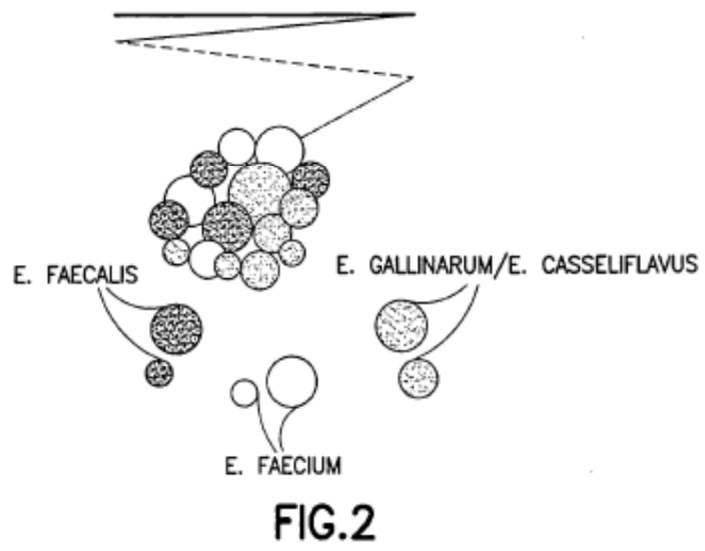
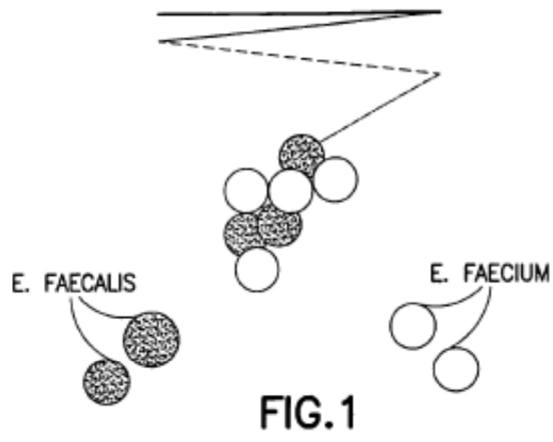
7. El medio de la reivindicación 6 en el cual

(i) la vancomicina está presente en una cantidad efectiva para inhibir el crecimiento de al menos algunos enterococos que no son resistentes a vancomicina y de manera no significativa inhiben el crecimiento de enterococos resistentes a vancomicina; o

(ii) los inhibidores comprenden además eritromicina; los inhibidores comprenden preferiblemente además al menos un inhibidor seleccionado del grupo que consiste en colistina, ácido nalidíxico, aztreonam, y anfotericina B y combinaciones de los mismos.

8. El medio de la reivindicación 6 que comprende además un inhibidor de enterococos que contienen *vanC* en el cual el inhibidor de los enterococos que contienen *vanC* comprende una cefalosporina, preferiblemente
- 5 (i) la cefalosporina es cefoxitina, más preferiblemente la cefoxitina se encuentra presente en una cantidad efectiva para suprimir el crecimiento de los enterococos que contienen *vanC*, de la manera más preferible la cantidad de cefoxitina no suprime significativamente el crecimiento de un enterococo resistente a vancomicina seleccionado de enterococos resistentes a vancomicina que contienen un gen *vanA* y enterococos resistentes a vancomicina que contienen un gen *vanB*; o
- (ii) los inhibidores comprenden además eritromicina; o
- 10 (iii) el segundo sustrato es beta-D-galactopiranosido y la segunda enzima es beta-D-galactopiranosidasa, más preferiblemente el segundo microorganismo es una segunda especie de enterococos resistentes a vancomicina, de la manera más preferible la segunda especie de enterococos resistentes a vancomicina es *E. faecium*.
9. El medio de la reivindicación 1, en el cual el primer sustrato es alfa-D-glucopiranosido y la primera enzima es alfa-D-glucopiranosidasa, preferiblemente el primer microorganismo es una primer especie de enterococos resistentes a vancomicina, del modo más preferible la primera especie de enterococos resistentes a vancomicina es *E. faecalis*.
- 15 10. El medio de la reivindicación 1 que comprende:
- un inhibidor de enterococos no resistentes a vancomicina que comprende vancomicina y en el que la cefalosporina inhibe el crecimiento de la tercera especie de enterococos pero no el crecimiento de la primera o de la segunda especie de enterococos.
11. El medio de la reivindicación 10 en el cual
- 20 (i) la primera y la segunda fracción de formación de imágenes se seleccionan de cromóforos y fluoróforos, preferiblemente la primera fracción de formación de imágenes conjugada con el primer sustrato es un primer cromógeno y la segunda fracción de formación de imágenes conjugada con el segundo sustrato es un segundo cromógeno; o
- (ii) el primer sustrato es alfa-D-glucopiranosido y la primera enzima es alfa-D-glucopiranosidasa; o
- 25 (iii) el segundo sustrato es beta-D-galactopiranosido y la segunda enzima es beta-D-galactopiranosidasa; o
- (iv) el tercer sustrato es metil-alfa-D-glucopiranosido.
12. El medio de la reivindicación 10 en el cual
- (i) la primera especie de microorganismo es una primer especie de enterococos resistente a vancomicina, preferiblemente la primera especie de enterococo resistente a vancomicina es *E. faecalis*; o
- 30 (ii) la segunda especie de microorganismo es una segunda especie de enterococos resistentes vancomicina, preferiblemente la segunda especie de enterococos resistente a vancomicina es *E. faecium*; o
- (iii) la al menos tercera especie de microorganismo es una tercera especie de enterococos resistentes a vancomicina seleccionada de *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* y combinaciones de los mismos.
13. El medio de la reivindicación 10 en el cual el inhibidor de enterococos no resistentes a vancomicina comprende además un inhibidor seleccionado de colistina, ácido nalidíxico, aztreonam, anfotericina B, y combinaciones de los mismos, preferiblemente la cefalosporina es cefoxitina, de la manera más preferible el inhibidor de enterococos no resistentes a vancomicina comprende además eritromicina.
- 35 14. Un procedimiento para detectar la presencia de una especie de enterococos resistentes a vancomicina, el cual comprende:
- 40 combinar una muestra biológica con un medio tal como se ha definido en la reivindicación 1, y detectar la presencia o la ausencia de al menos la primera y la segunda especie de los enterococos resistentes a vancomicina directamente del medio.
15. El procedimiento de la reivindicación 14 en el cual
- (i) la primera y la segunda fracción para formación de imágenes se seleccionan de cromóforos y fluoróforos; o
- 45 (ii) la primera fracción para formación de imágenes conjugada con el primer sustrato es un primer cromógeno y la segunda fracción para formación de imágenes conjugada con el segundo sustrato es un segundo cromógeno; o
- (iii) el primer sustrato es alfa-D-glucopiranosido y la primera enzima es alfa-D-glucopiranosidasa; o

- (iv) el segundo sustrato es beta-D-galactopiranosido y la segunda enzima es beta-D-galactopiranosidasa; o
 - (v) el tercer sustrato es metil-alfa-D-glucopiranosido; o
 - (vi) la primera especie de enterococos resistentes a vancomicina es *E. faecalis*; o
 - (vii) la segunda especie de enterococos resistentes a vancomicina es *E. faecium*; o
- 5 (viii) la tercera especie de enterococos resistentes a vancomicina se selecciona del grupo que consiste en *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* y combinaciones de los mismos; o
- (ix) el inhibidor de enterococos no resistentes a vancomicina comprende además un inhibidor seleccionado de colistina, ácido nalidíxico, aztreonam, eritromicina, anfotericina B, y combinaciones de los mismos, preferiblemente la cefalosporina es cefoxitina; o
- 10 (x) el inhibidor de enterococos no resistentes a vancomicina comprende además eritromicina.



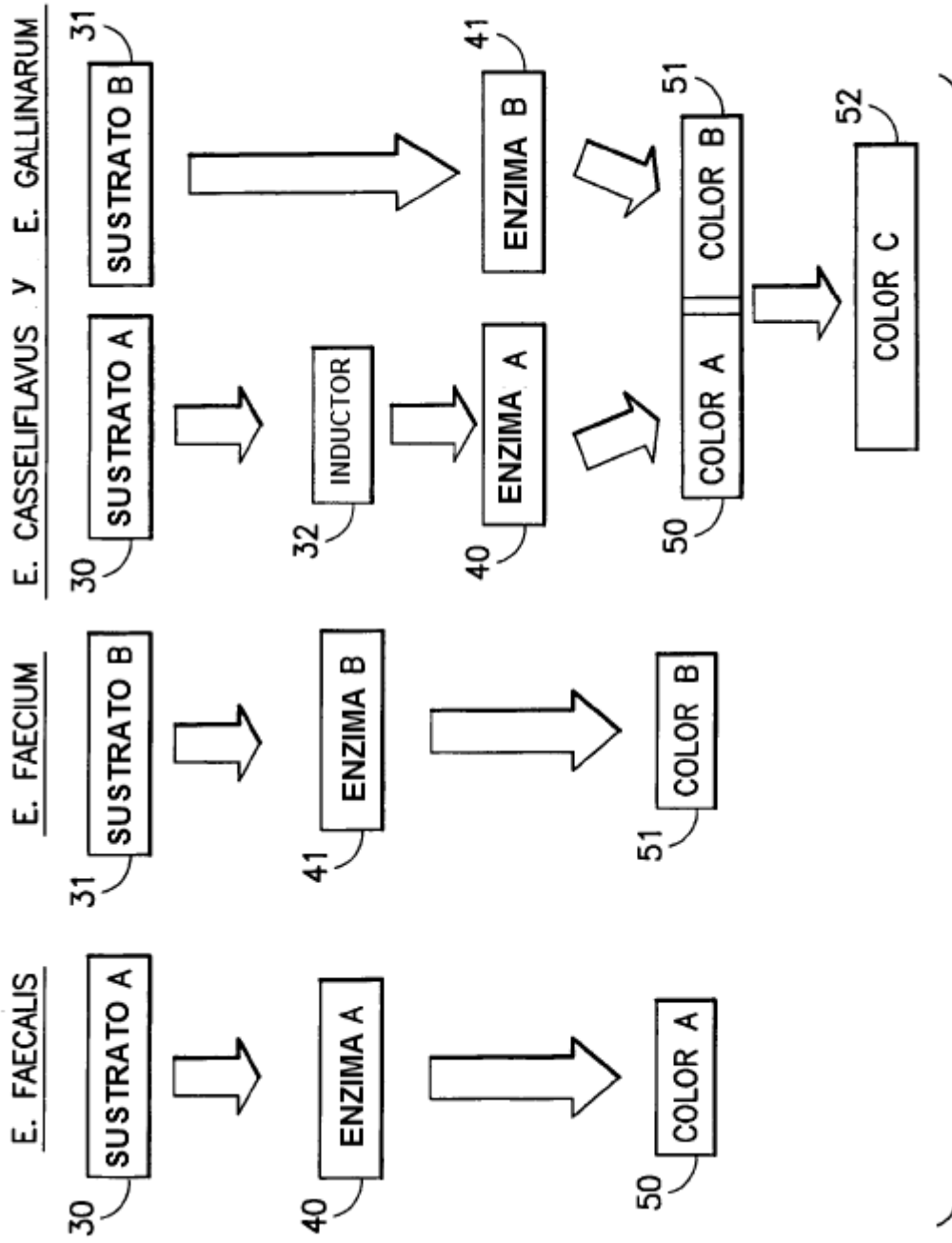


FIG.3

