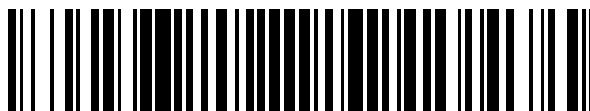


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 243**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/14

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.08.2010** **PCT/FR2010/051705**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.02.2011** **WO11018589**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2010** **E 10761051 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017** **EP 2464742**

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

30 Prioridad:

13.08.2009 FR 0903944

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

06.02.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ZAMBARDI, GILLES y
ROCHE, JEAN-MARC**

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 2 653 243 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 reacción 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 procedimiento para identificar unas bacterias MRSA.

10 Los *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) son unas cepas de *Staphylococcus aureus*, caracterizadas por su resistencia a un antibiótico, la meticilina, y a los antibióticos relacionados, tales como la oxacilina. 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. Transmitidas generalmente de manera cruzada entre los pacientes a través del personal sanitario, las MRSA son responsables de infecciones endémicas muy difíciles de controlar. Además de un tratamiento adaptado, 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 (Compañía americana para la epidemiología hospitalaria). Un diagnóstico precoz y sistemático es, por lo tanto, esencial.

20 La detección de las MRSA puede llevarse a cabo mediante diferentes técnicas.

Es así posible detectar las MRSA mediante técnicas de biología molecular. A este respecto, se puede citar, en particular, la solicitud EP887424. Tales métodos siguen siendo, sin embargo, costosos en las pruebas de rutina, y requieren un personal cualificado.

25 Es asimismo posible utilizar unos medios de cultivo convencionales para detectar los *Staphylococcus aureus*, tal como el medio descrito en la solicitud EP1390524. La detección de MRSA se lleva a cabo entonces durante una etapa suplementaria, mediante un ensayo de aglutinación específico, (Slidex MRSA, bioMérieux) o mediante un método de difusión sobre gelosa en presencia de un disco Oxacilina de Cefoxitina o de Latamoxef (recomendaciones del Comité de Antibiógramas de la compañía francesa de microbiología y del Clinical Laboratory Standard Institute).

30 Es asimismo posible poner en cultivo las bacterias susceptibles de ser unas MRSA sobre medios gelosados en presencia de antibióticos. Tales medios pueden también ser cromogénicos, lo que facilita la lectura y la detección de MRSA. Se puede citar también el medio descrito en la solicitud EP1543147. Sin embargo, al ser poco específica la detección de una actividad fosfatasa en las condiciones descritas, es necesario combinarla con la detección de otras diversas actividades enzimáticas, lo que reduce la fertilidad del medio e incrementa su coste. Asimismo, se puede citar también el documento WO 2004/027086 que divulga un método y un medio de reacción para aislar las MRSA. Dicho medio de reacción es un medio que comprende un sustrato cromogénico y, a título de agente selectivo, un antibiótico seleccionado del grupo de las cefalosporinas de segunda o tercera generación. Ahí también, la selectividad reducida es deplorable. En particular, se ha podido constatar la presencia de estafilococos de coagulasa negativa (SNC) que crece sobre tal medio de reacción.

45 La invención, tal como se define por la reivindicación 1, se propone resolver las lagunas del estado de la técnica presentando un nuevo medio de reacción, sensible, específico, y que permita un aislamiento y una identificación rápida de los *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA).

50 De manera sorprendente, los inventores han puesto en evidencia que la utilización de una combinación particular de antibióticos, que comprende una cefalosporina y un aminosido, permitía obtener un excelente medio de reacción para aislar e identificar unos *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA). En este caso, dicho aminosido es la Kanamicina a una concentración comprendida entre 0,2 y 1,5 mg/l o la Amikacina a una concentración comprendida entre 0,5 y 5 mg/l.

55 Antes de seguir más adelante, 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*.

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

65 El medio de reacción puede ser sólido, semisólido 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 otros agentes gelificantes

como, por ejemplo, la gelrita, la gelatina o la agarosa. Un cierto número de preparaciones están disponibles en el mercado, como por ejemplo el agar Columbia, la gelosa Tripcasa-soja, la gelosa Mac Conkey, la gelosa Chapman, la gelosa Sabouraud o más generalmente las descritas en el Handbook of Microbiological Media (CRC Press).

El medio de reacción según la invención puede contener eventualmente otros aditivos como, por ejemplo, unas peptonas, uno o varios factores de crecimiento, hidratos de carbono, o 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 tubo, frasco, o sobre caja 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 caja 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 glucuronidasa, glucosidasa o galactosidasa.

Puede tratarse de un sustrato natural o sintético. El metabolismo del sustrato provoca una variación de las propiedades fisicoquímicas del medio de reacción o de las células de organismos. Esta variación puede ser detectada mediante unos métodos fisicoquímicos, en particular unos métodos ópticos a simple vista 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.

En la presente solicitud, el término coloración se emplea para cubrir una coloración, absorción de luz en el espectro visible, o una fluorescencia, absorción a una longitud de onda (λ_{ex}) y emisión a una longitud de onda superior (λ_{em} , $\lambda_{em} > \lambda_{ex}$).

En el sentido de la presente invención, se entiende por sustrato cromogénico, cualquier sustrato que puede hidrolizarse en un producto que permite la detección, directa o indirecta de una actividad enzimática, tal como en particular una actividad osidasa, preferiblemente una actividad alfa glucosidasa, esterasa, preferiblemente una actividad fosfatasa, peptidasa, preferiblemente una actividad coagulasa.

Se pueden citar en particular los sustratos a base de indoxilo, flavona, alizarina, acridina, fenoxazina, nitroferol, nitroanalina, naftol, catecol, hidroxiquinolona, cumarina, hidroxifenil-quinoxazol-4-ona. Preferiblemente, el o los sustratos utilizados en la presente invención son a base de indoxilo.

Como sustrato de alfa glucosidasa, se pueden citar más particularmente los sustratos 5-bromo-6-cloro-3-indoxil-alfa-glucósido; dihidroxiflavona-alfa-glucósido; 3,4-ciclohexanoesculetina-alfa-glucósido; 8-hidroxiquinolin-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-metilumbelliferil-alfa-glucósido; naftolbenzein-alfa-glucósido; indoxil-N-metil-alfa-glucósido; naftil-alfa-glucósido; aminofenil-alfa-glucósido; dicloroaminofenil-alfa-glucósido. Preferiblemente, el sustrato de alfa glucosidasa utilizado es el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-alfa-glucósido o el 5-bromo-6-cloro-3-indoxil-alfa-glucósido.

Como sustrato de fosfatasa, se pueden citar más particularmente los sustratos 5-bromo-6-cloro-3-indoxil-fosfato; 3,4-ciclohexanoesculetin-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-metilumbelliferil-fosfato; indoxil-N-metil-fosfato; naftil-fosfato, ELF97-fosfato. Preferiblemente, el sustrato de fosfatasa utilizado es el 6-cloro-3-indoxil-fosfato.

El sustrato utilizado en la presente invención puede estar en combinación con otros sustratos, tales como un sustrato de osidasa, esterasa y en particular fosfatasa o fosfolipasa, peptidasa y en particular coagulasa. En particular, el medio puede comprender dos sustratos de alfa glucosidasa.

Los sustratos de la invención son utilizables en una amplia gama de pH, en particular entre pH 5,5 y 10, preferiblemente entre 6,5 y 9.

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

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

○ Una Cefalosporina de segunda generación, tal como: Cefoxitina, Cefuroxima, Cefamandol, Cefaclor, Cefotetan, Cefonicida, Cefotiam, Loracarbef, Cefinetazol, Cefprozil, Ceforanida, Cefminox

○ 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, Cefdinir

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

En el ámbito de la presente invención, el antibiótico que pertenece a la familia de las cefalosporinas es preferiblemente el Cefminox o el Cefdinir.

En el sentido de la presente invención, un antibiótico que pertenece a la familia de las aminosidinas es un antibiótico preferiblemente seleccionado entre Amikacina, gentamicina, isepamicina, Kanamicina, netilmicina, estreptomycin, tobramicina.

En el ámbito de la presente invención, el antibiótico que pertenece a la familia de las aminosidinas es preferiblemente la Amikacina o la Kanamicina.

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 tipo de alimento, o una extracción de superficie. Esta muestra puede así ser líquida o sólida y se puede citar de manera, no limitativa, una muestra clínica de sangre, de plasma, de orinas, de heces, de extracciones de la nariz, del perineo, de la garganta, de piel, de heridas, de líquido cefalorraquídeo, o una muestra alimenticia.

Por muestra, se entiende por lo tanto la extracción en sí (hisopo, heces, alimentos, etc.) tanto como colonias de microorganismos procedentes de dicha extracción (por ejemplo después del aislamiento sobre un medio de cultivo gelificado, o en un caldo de enriquecimiento inoculado con dicha extracción).

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 meticilina (MRSA) que comprende un sustrato cromogénico, un primer antibiótico que pertenece a la familia de las cefalosporinas y un segundo antibiótico que pertenece a la familia de las aminosidinas. Conforme a la invención reivindicada, dicho segundo antibiótico es la Kanamicina o la Amikacina. La concentración en Kanamicina está comprendida entre 0,2 y 1,5 mg/l, preferiblemente entre 0,5 y 1,25 mg/l. La concentración en Amikacina está comprendida entre 0,5 y 5 mg/l, preferiblemente entre 1 y 2 mg/l.

Según un modo preferido de realización de la invención, la combinación de dos antibióticos comprende el Cefminox y la Kanamicina.

Según otro modo preferido de realización de la invención, la combinación de dos antibióticos comprende el Cefminox y la Amikacina.

Según otro modo preferido de realización de la invención, la combinación de dos antibióticos comprende el Cefdinir y la Kanamicina.

Según otro modo preferido de realización de la invención, la combinación de dos antibióticos comprende el Cefdinir y la Amikacina.

Según un modo preferido de realización de la invención, dicho sustrato cromogénico permite la detección de una actividad osidasa, esterasa o peptidasa.

Según un modo preferido de realización de la invención, dicha actividad osidasa es una actividad alfa-glucosidasa.

Dicho sustrato de una actividad alfa-glucosidasa es preferiblemente un indoxil-alfa-glucósido. Preferiblemente, el sustrato utilizado es el 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-alfa-glucósido (X-alfa-glucósido) o el 5-Bromo-4-cloro-3-indoxil-N-metil-alfa-glucósido (GreenA-alfa-glucósido). Preferiblemente, este sustrato está presente en el medio a una concentración comprendida entre 0,01 y 0,2 g/l, preferiblemente entre 0,03 y 0,15 g/l. En efecto, a esta concentración de sustrato, se obtiene un mejor contraste de coloración.

Según un modo preferido de realización de la invención, dicha actividad esterasa es una actividad fosfatasa. Preferiblemente, el sustrato utilizado es el 6-cloro-3-indoxil-fosfato (rose-fosfato). Preferiblemente, este sustrato está presente en el medio a una concentración comprendida entre 0,05 y 0,5 g/l, preferiblemente entre 0,1 y 0,4 g/l. En

efecto, a esta concentración de sustrato, se obtiene un mejor contraste de coloración.

Según un modo particular de realización de la invención, dicho medio de reacción comprende, además, un segundo sustrato enzimático. Preferiblemente, dicho segundo sustrato es un sustrato de alfa-glucosidasa. Preferiblemente, dicho primer sustrato es un sustrato de alfa-glucosidasa, preferiblemente el X-alfa-glucósido (5-bromo-4-cloro-3-indoxil-alfa-glucósido) y dicho segundo sustrato es un sustrato de alfa-glucosidasa, preferiblemente el GreenA-alfa-glucósido (5-bromo-4-cloro-3-indoxil-N-metil-alfa-glucósido).

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

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

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

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

a) se inocula la muestra biológica susceptible de contener unas bacterias *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina MRSA en un medio de reacción tal como se ha definido antes,

b) se incuba

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

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

La etapa a) puede ir precedida de una etapa de pre-enriquecimiento en medio selectivo o no selectivo.

La invención se refiere también a un medio de reacción para la detección y/o la identificación de bacterias *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) que comprende un sustrato de una actividad enzimática o metabólica, un primer antibiótico seleccionado entre Cefdinir y Cefminox, y un segundo antibiótico que pertenece a la familia de las aminosidinas.

Preferiblemente, la concentración en Cefminox está comprendida entre 10 y 35 mg/l, preferiblemente entre 12 y 28 mg/l. Preferentemente, la concentración en Cefdinir está comprendida entre 0,1 y 1 mg/l, preferiblemente entre 0,2 y 0,6 mg/l.

Según un modo preferido de realización de la invención, dicho segundo antibiótico es la Kanamicina o la Amikacina.

Preferiblemente, la concentración en Kanamicina está comprendida entre 0,2 y 1,5 mg/l, preferiblemente entre 0,5 y 1,25 mg/l. Preferiblemente, la concentración en Amikacina está comprendida entre 0,5 y 5 mg/l, preferiblemente entre 1 y 2 mg/l).

Según un modo preferido de realización de la invención, la combinación de dos antibióticos comprende el Cefminox y la Kanamicina.

Según otro modo preferido de realización de la invención, la combinación de dos antibióticos comprende el Cefminox y la Amikacina.

Según otro modo preferido de realización de la invención, la combinación de dos antibióticos comprende el Cefdinir y la Kanamicina.

Según otro modo preferido de realización de la invención, la combinación de dos antibióticos comprende el Cefdinir y la Amikacina.

Según un modo preferido de realización de la invención, dicho sustrato de una actividad enzimática o metabólica permite la detección de una actividad osidasa, esterasa o peptidasa.

Según un modo preferido de realización de la invención, dicha actividad osidasa es una actividad alfa-glucosidasa.

Dicho sustrato de una actividad alfa-glucosidasa es preferiblemente un indoxil-alfa-glucósido. Preferiblemente, el sustrato utilizado es el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-alfa-glucósido (X-alfa-glucósido) o el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-N-metil-alfa-glucósido (GreenA-apha-glucoside). Preferiblemente, este sustrato está presente en el medio a una concentración comprendida entre 0,01 y 0,2 g/l, preferiblemente entre 0,03 y 0,15 g/l. En efecto, a esta concentración de sustrato, se obtiene un mejor contraste de coloración.

Según un modo preferido de realización de la invención, dicha actividad esterasa es una actividad fosfatasa. Preferiblemente, el sustrato utilizado es el 6-cloro-3-indoxil-fosfato (Rose-Phosphate). Preferiblemente, este sustrato está presente en el medio a una concentración comprendida entre 0,05 y 0,5 g/l, preferiblemente entre 0,1 y 0,4 g/l. En efecto, a esta concentración de sustrato, se obtiene un mejor contraste de coloración.

Según un modo particular de realización de la invención, dicho medio de reacción comprende, además, un segundo sustrato enzimático. Preferiblemente, dicho segundo sustrato es un sustrato de alfa-glucosidasa. Preferiblemente, dicho primer sustrato es un sustrato de alfa-glucosidasa, preferiblemente el X-alfa-glucósido (5-bromo-4-cloro-3-indoxil-alfa-glucósido) y dicho segundo sustrato es un sustrato de alfa-glucosidasa, preferiblemente el greenA-alfa-glucósido (5-bromo-4-cloro-3-indoxil-N-metil-alfa-glucósido).

Según un modo preferido de realización de la invención, el medio comprende además, al menos un inhibidor que privilegia el crecimiento de las bacterias *Staphylococcus aureus*, tal como el cloruro de litio (LiCl), azida de sodio (NaN₃), colistina, anfotericina, aztreonam, polimixinas, cloruro de sodio (NaCl) y deferroxamina.

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

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 meticilina (MRSA).

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

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

b) se incuba

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

La incubación se realiza preferiblemente a una temperatura comprendida entre 30°C y 42°C. Las MRSA son preferiblemente detectadas por una o dos actividades alfa-glucosidasa o una actividad fosfatasa que permite obtener unas colonias coloreadas o fluorescentes. Las otras especies de *Staphylococcus* aparecen incoloras o de un color o fluorescencia diferente del de las colonias de *S. aureus*.

La etapa a) puede ir precedida de una etapa de pre-enriquecimiento en medio selectivo o no selectivo.

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

EJEMPLO 1 – MEDIO MRSA QUE COMPRENDE UNA COMBINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS CEFMINOX – KANAMICINA Y DIFERENTES SUSTRATOS CROMOGÉNICOS

1. Preparación del medio según la invención

Los medios ensayados en los experimentos eran los siguientes:

Medio T: medio control chromID™ MRSA (ref. 43 451).

Medio A: medio T, siendo la cefoxitina sustituida por una combinación de antibióticos Cefminox (Daewoo Chemical, A8060902; 16 mg/l) / Kanamicina (Sigma, ref. K4000; 1 mg/l), siendo el sustrato cromogénico el Rose-phosphate (Biosynth, ref. C-5100; 0,25 g/l)

Medio B: medio T, siendo la cefoxitina sustituida por una combinación de antibióticos Cefminox (16 mg/l)/Kanamicina (0,75 mg/l), siendo el sustrato cromogénico el X-alfa-glucósido (Biosynth, B7230; 0,045 g/l) y el Green A-alfa-glucósido (Inalco, ref. 1758-0730)

Medio C: medio T, siendo la cefoxitina sustituida por una combinación de antibióticos Cefminox (16 mg/l) / Kanamicina (0,75 mg/l), siendo los sustratos cromogénico el X-alfa-glucósido (Biosynth, B7230; 0,045 g/l) y el Green A-alfa-glucósido (Inalco, ref. 1758-0730, 0,08 g/l)

2. Inoculación y lectura de los medios

Diferentes cepas de bacterias *S. aureus*, resistentes (MRSA) o no resistentes a la meticilina (MSSA) y unas cepas de estafilococos con coagulasa negativa (SCN), todas procedentes de la colección de la solicitante, se han puesto en suspensión en agua fisiológica, después inoculadas en el medio, según la técnica de los cuatro cuadrantes. Las cajas se han incubado a 37°C durante 24 horas. Las colonias formadas se examinaron visualmente después de 18h y 24 horas de incubación.

3. Resultados:

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 1.

Medio	MRSA detectadas / MRSA ensayadas	MSSA + SCN detectadas / MSSA + SCN ensayadas
T	18/20	1/15
A	20/20	5/18
B	19/20	4/15
C	29/35	4/24

Estos resultados muestran una excelente sensibilidad de los medios según la invención. En particular, el medio A permitía detectar el conjunto de MRSA.

EJEMPLO 2 – MEDIO MRSA QUE COMPRENDE CEFMINOX Y KANAMICINA A DIFERENTES CONCENTRACIONES

1. Preparación del medio según la invención

Los medios ensayados en los experimentos eran los siguientes:

Medio T: medio control chromID™ MRSA (ref. 43 451)

Medio D: medio T, siendo la cefoxitina sustituida por una combinación de anticuerpos Cefminox (antibiótico idéntico al utilizado en el ejemplo 1) / Kanamicina (antibiótico idéntico al utilizado en el ejemplo 1), a diferentes concentraciones, siendo los sustratos cromogénicos el X-alfa-glucósido (sustrato idéntico al utilizado en el ejemplo 1; 0,045 g/l) y el Green A-alfa-glucósido (sustrato idéntico al utilizado en el ejemplo 1; 0,08 g/l)

	[Cefminox] en mg/l	[kanamicine] en mg/l
D1	16	0,75
D2	16	1
D3	14	0,75
D4	14	1

2. Inoculación y lectura de los medios

Esta etapa se ha realizado como en el ejemplo 1.

3. Resultados:

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 2 siguiente

Medio	MRSA detectadas / MRSA ensayadas	MSSA + SCN detectadas / MSSA + SCN ensayadas
T	18/20	1/15
D1	19/20	1/18
D2	15/18	0/18
D3	16/18	1/18
D4	16/18	1/18

Estos resultados muestran que una concentración en Cefminox de 16 mg/l y una concentración de Kanamicina de 0,75 mg/l permitían obtener una excelente especificidad y sensibilidad.

EJEMPLO 3 – MEDIO MRSA QUE COMPRENDE UNA COMBINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS CEFMINOX – AMIKACINA Y DIFERENTES SUSTRATOS CROMOGENICOS

1. Preparación del medio según la invención

Los medios ensayados en los experimentos eran los siguientes:

Medio T: medio control chromID™ MRSA (ref. 43 451)

Medio E: medio T, siendo la cefoxitina sustituida por una combinación de antibióticos Cefminox (antibiótico idéntico al utilizado en el ejemplo 1; 16 mg/l) / Amikacina (Sigma, ref. 2324; 2 mg/l), siendo el sustrato cromogénico el Rose-Phosphate (Biosynth, C-5100; 0,25 g/l)

Medio F: medio T, siendo la cefoxitina sustituida por una combinación de antibióticos Cefminox (16 mg/l) / Amikacina (2,5 mg/l), siendo los sustratos cromogénicos el X-alfa-glucósido (sustrato idéntico al utilizado en el ejemplo 1; 0,045 g/l) y el Green A-alfa-glucósido (sustrato idéntico al utilizado en el ejemplo 1; 0,08 g/l)

2. Inoculación y lectura de los medios

Esta etapa se ha realizado como en el ejemplo 1.

3. Resultados:

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 3 siguiente

Medio	MRSA detectadas / MRSA ensayadas	MSSA + SCN detectadas / MSSA + SCN ensayadas
T	18/20	1/15
E	20/20	3/15
F	19/20	6/24

Estos resultados muestran que la combinación de antibióticos según la invención permitía obtener una excelente sensibilidad, sea cual sea el sustrato utilizado.

EJEMPLO 4 – MEDIO MRSA QUE COMPRENDE CEFDINIR Y AMIKACINA

1. Preparación del medio según la invención

Los medios ensayados en los experimentos eran los siguientes:

Medio T: medio control chromID™ MRSA (Ref. 43 451)

Medio G: medio T, siendo la cefoxitina sustituida por una combinación de antibióticos Cefdinir (CDR 086007) / Amikacina (antibiótico idéntico al utilizado en el ejemplo 3) a diferentes concentraciones, siendo el sustrato cromogénico el Rose-fosfato (sustrato idéntico al utilizado en el ejemplo 3; 0,25 g/l)

	[Cefdinir] en mg/l	[Amikacina] en mg/l
G1	0,3	2
G2	0,2	2

Medio H: medio T, siendo la cefoxitina sustituida por una combinación de antibióticos Cefdinir / Amikacina, a diferentes concentraciones, siendo el sustrato cromogénico el X-alfa-glucósido (sustrato idéntico al utilizado en el ejemplo 1; 0,045 g/l) y el Green A-alfa-Glu (sustrato idéntico al utilizado en el ejemplo 1, 0,08 g/l)

	[Cefdinir] en mg/l	[Amikacina] en mg/l
H1	0,3	2
H2	0,2	2

2. Inoculación y lectura de los medios

Esta etapa se ha realizado como en el ejemplo 1

3. Resultados:

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 4 siguiente.

Medio	MRSA detectadas / MRSA ensayadas	MSSA + SCN detectadas / MSSA + SCN ensayadas
T	18/20	1/15
G1	20/20	0/15
G2	20/20	1/15
H1	18/20	1/15
H2	19/20	2/15

Estos resultados muestran que la combinación de antibióticos Cefdinir / Amikacina según la invención permitía obtener una excelente sensibilidad y especificidad, sea cual sea la concentración utilizada.

EJEMPLO 5 – ANÁLISIS DE EXTRACCIONES CLÍNICAS SOBRE MEDIOS MRSA SEGÚN LA INVENCION

1. Preparación del medio según la invención

Los medios ensayados en los experimentos eran los siguientes:

Medio T: medio control chromID™ MRSA (ref. 43 451)

Lote 1: Green A-alfa-Glu 0,08 g/l + X-alfa-Glu 0,045 g/l, Cefminox 16 mg/l + Kanamicina 0,75 mg/l

Lote 2: Green A-alfa-Glu 0,08 g/l + X-alfa-Glu 0,045 g/l, Cefdinir 0,3 mg/l + Amikacina 2 mg/l

Lote 3: Rose-Fosfato 0,25 g/l, Cefminox 16 mg/l + Amikacina 2 mg/l

Lote 4: Rose-Fosfato 0,25 g/l, Cefdinir 0,3 mg/l + Amikacina 2 mg/l

Los sustratos y antibióticos utilizados eran los mismos que los utilizados en los ejemplos anteriores.

2. Inoculación y lectura de los medios

Se han realizado dos estudios en paralelo a partir de diferentes extracciones clínicas (nariz, garganta, perineo, herida), que se pusieron en suspensión en agua fisiológica, e inoculados para dar unas colonias aisladas sobre el medio, según la técnica de los cuatro cuadrantes. Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Las colonias formadas se examinaron visualmente después de 18h y 24 horas de incubación.

3. Resultados:

Los resultados obtenidos se presentan en las tablas siguientes.

Primer estudio:

Parámetros	tiempo	Medio T	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
Sensibilidad de detección	18h	15/19	17/19	16/19	18/19	18/19
	24h	18/19	19/19	19/19	19/19	19/19
Especificidad	24h	97%	86%	88%	82%	80%

Segundo estudio:

Parámetros	tiempo	Medio T	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
Sensibilidad de detección	18h	48/60	49/60	31/60	47/60	54/60
	24h	56/60	54/60	42/60	48/60	57/60
Especificidad	24h	95%	93%	89%	99%	98%

Estos resultados muestran que las combinaciones de antibióticos según la invención presentaban una excelente sensibilidad de detección, a partir de 18h.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Medio de reacción para la detección y/o la identificación de bacterias *Staphylococcus aureus* resistentes a la metilicina (MRSA) que comprende un sustrato cromogénico, un primer antibiótico que pertenece a la familia de las cefalosporinas y un segundo antibiótico que pertenece a la familia de las aminosidasas y que se selecciona entre la Kanamicina a una concentración comprendida entre 0,2 y 1,5 mg/l, y la Amikacina a una concentración comprendida entre 0,5 y 5 mg/l.
- 10 2. Medio de reacción según la reivindicación 1, según el cual dicho primer antibiótico es el Cefminox o el Cefdinir.
3. Medio de reacción según la reivindicación 1 o 2, según el cual dicho sustrato cromogénico permite la detección de una actividad osidasa, esterasa o peptidasa.
- 15 4. Medio de reacción según la reivindicación 3, según el cual dicha actividad osidasa es una actividad alfa-glucosidasa.
5. Medio de reacción según la reivindicación 3, según el cual dicha actividad esterasa es una actividad fosfatasa.
- 20 6. Utilización *in vitro* de un medio de reacción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para aislar e identificar unas bacterias *Staphylococcus aureus* resistentes a la metilicina (MRSA).
7. Procedimiento de detección y/o de identificación de bacterias *Staphylococcus aureus* resistentes a la metilicina (MRSA) en una muestra biológica según el cual
- 25 a) se inocula la muestra biológica susceptible de contener unas bacterias *Staphylococcus aureus* resistentes a la metilicina MRSA sobre un medio de reacción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,
- b) se incuba,
- 30 c) se identifican las colonias como siendo unas colonias de MRSA.