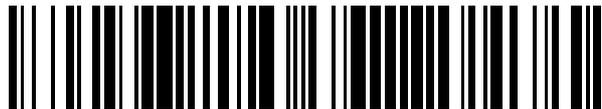


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 707**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2006 E 11189038 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2465940**

54 Título: **Medios para la detección específica de microorganismos resistentes**

30 Prioridad:

10.02.2005 FR 0550394
07.10.2005 FR 0553049

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.04.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ORENGA, SYLVAIN;
ROGER-DALBERT, CÉLINE;
PERRY, JOHN;
CHANTEPERDRIX, VANESSA;
ZAMBARDI, GILLES y
BAL, NATHALIE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 662 707 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

Medios para la detección específica de microorganismos resistentes

- 5 El campo de la invención es el del análisis microbiológico por vía bioquímica, y en particular de la detección y de la identificación de bacterias.

10 La resistencia de las bacterias a los antibióticos es un problema principal de salud pública. La resistencia de microorganismos infecciosos frente a un tratamiento se ha desarrollado al mismo tiempo que las moléculas anti-infecciosas y representa en la actualidad un obstáculo principal en terapéutica. Esta resistencia es fuente de problemas múltiples, que incluyen las dificultades de detección en laboratorio, las opciones de tratamiento limitadas y un impacto perjudicial sobre el resultado clínico.

15 En particular, el aumento rápido e irreprimible de la resistencia de las bacterias patógenas, durante los últimos 20 años, representa uno de los problemas actuales principales en la medicina. Las infecciones causadas por estos organismos son la causa del alargamiento de la duración de hospitalización y están asociadas a altas tasas de morbilidad y de mortalidad, después de fracasos terapéuticos.

20 Varios mecanismos de resistencia pueden estar implicados simultáneamente en una cepa bacteriana. Se clasifican en general en 3 categorías: deficiencia de la penetración del antibiótico en la bacteria, inactivación o excreción del antibiótico por sistemas enzimáticos bacterianos y falta de afinidad entre la diana bacteriana y el antibiótico.

25 La inactivación enzimática es el mecanismo más frecuente de resistencia adquirida en términos de número de especies y de antibióticos en cuestión. Así, las cefalosporinas cromosómicas de clase C constituyen en la actualidad uno de los mecanismos de resistencia predominantes de las bacterias gram-negativas, siendo las bacterias que expresan tales enzimas resistentes a las cefalosporinas. Asimismo, las β -lactamasas son unas enzimas expresadas por ciertas bacterias, capaces de hidrolizar el enlace C-N del núcleo β -lactámico, estructura de base de los antibióticos de la familia de las β -lactaminas, para dar un producto microbiológicamente inactivo. Varios inhibidores de β -lactamasas (IBL), tales como el ácido clavulánico (AC), el tazobactam y el sulbactam, se han desarrollado para aumentar la actividad antimicrobiana y ensanchar el espectro de las β -lactaminas que le están asociadas. Actuando como un sustrato suicida para las β -lactamasas, impiden la degradación enzimática de los antibióticos y les permiten volverse eficaces contra unas bacterias inicialmente resistentes. Sin embargo, debido a la exposición persistente de las cepas a la presión antibiótica, las bacterias expresan su capacidad de adaptación por la producción continua y dinámica de β -lactamasas, evolucionando al mismo tiempo que el desarrollo de nuevas moléculas.

35 Las bacterias gram-negativas productoras de cefalosporinas cromosómicas de clase C de alto nivel (se habla de bacterias Case HN) así como las bacterias gram-negativas productoras de β -lactamasas de amplio espectro (se habla entonces de bacterias BLSE) se han convertido así en una amenaza en aumento, en particular por que el número de especies bacterianas en cuestión aumenta. Las bacterias Case HN y BLSE son resistentes a tratamientos a base de penicilinas y cefalosporinas de 1ª y 2ª generación, pero también de cefalosporinas de 3ª generación (C3G) (cefotaxima CTX, ceftazidima CAZ, cefpodoxima CPD, ceftriazona CRO) y de los monobactams (aztreonam ATM). Por el contrario, las 7 α -metoxicefalosporinas (cefamicinas: cefoxitina, cefotetan) y los carbapenemos (imipenemo, meropenemo, ertapenemo) conservan generalmente su actividad. Los BLSE se inhiben por los inhibidores de β -lactamasas (IBL), lo que permite diferenciarlos de las otras cefalosporinas.

45 Estas bacterias expresan así generalmente de manera simultánea unas resistencias a varios tratamientos, lo que plantea unas dificultades para instalar un tratamiento pertinente y evitar los fracasos terapéuticos. Una bacteria *Escherichia coli* puede así ser Case HN y BLSE. Además, como las enterobacterias BLSE positivas tienden a diseminar la resistencia por transmisión clonal de las cepas o transferencia plasmídica conjugativa, éstas representan un problema para el control de las infecciones. En la mayoría de los estudios, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* siguen siendo las especies productoras de BLSE más comunes. Pero, desde hace algunos años, los BLSE han ampliado mucho su panel de especies hospedantes. En efecto, numerosas especies de enterobacterias y de bacilos gram-negativos no fermentadores (como *Pseudomonas aeruginosa*) también se han identificado como productores de BLSE.

50 Además de estas bacterias BLSE, también se pueden citar las bacterias *Staphylococcus aureus*, que son también unas bacterias patógenas que desarrollan numerosos mecanismos de resistencias, tales como una resistencia a la meticilina, la penicilina, la tetraciclina, la eritromicina, la vancomicina. *Enterococcus faecium* es otra bacteria multiresistente encontrada en entorno hospitalario, que puede ser resistente a la penicilina, la vancomicina y a la linezolid. *Mycobacterium tuberculosis* es habitualmente resistente a la isoniazida y a la rifampicina. Otros patógenos ofrecen ciertas resistencias como *Salmonella*, *Campylobacter* y *Streptococcus*.

65 Por lo tanto, se vuelve indispensable, desde un punto de vista de la salud pública, poder identificar lo más rápidamente posible tales microorganismos, y tales mecanismos de resistencias.

En general, la búsqueda de los microorganismos resistentes a un tratamiento se realiza según las etapas siguientes

1. extracción de una muestra biológica susceptible de contener dichos microorganismos,
2. siembra e incubación de un medio de cultivo (18 a 48h) para inducir un crecimiento exponencial de los microorganismos,
3. localización sobre los medios de cultivo de las colonias de microorganismos potencialmente significativos,
4. caracterización de la especie de microorganismo,
5. identificación de los mecanismos de resistencia de los microorganismos analizados, su significado biológico y eventualmente la terapia adaptada.

Esta sucesión de etapas implica una cantidad de tiempo importante entre la extracción de la muestra susceptible de contener unos microorganismos y la prescripción de un tratamiento adecuado para el paciente. Además, el usuario debe realizar generalmente de forma manual etapas de transferencia de microorganismos de un primer medio hacia un segundo medio, lo que puede inducir problemas, en particular de contaminación, pero también riesgos para la salud del manipulador.

A título de ejemplo, para detectar la presencia de beta-lactamasas de amplio espectro (BLSE) en cepas de *Escherichia coli* y de *Klebsiella pneumoniae*, se puede utilizar una técnica de difusión tal como se describe en la publicación de Jacoby & Han (J Clin Microbiol. 34(4): 908-11, 1996) que no da, sin embargo, ninguna información sobre la identificación de las cepas ensayadas: se puede determinar si la bacteria es una bacteria productora de BLSE o no, pero no se puede distinguir si tal bacteria es una *Escherichia coli* o una *Klebsiella pneumoniae*.

También se utilizan sustratos metabólicos para detectar la presencia de BLSE o Case HN. Para ello, los laboratorios AES proponen un medio en una bi-caja que asocia un medio Drigalski con cefotaxima y un medio MacConkey con Ceftazidima. Los medios Drigalski y MacConkey permiten revelar la acidificación de la lactosa, metabolismo presente en un gran número de especies de enterobacterias. Sin embargo, tal medio permite únicamente distinguir las bacterias resistentes de las bacterias no resistentes, pero no permite distinguir las bacterias que expresan una BLSE de las que expresan una Case HN. Este medio no permite tampoco la identificación de especies particulares de bacterias, y no permite, por ejemplo, distinguir las bacterias *E. coli*, de bacterias *K. pneumoniae*.

En el caso de la detección de mecanismos de resistencia distintos de BLSE, se puede citar la solicitud de patente EP0954560, que se refiere a la búsqueda de los enterococos resistentes a la Vancomicina, combinando la Vancomicina con un medio cromogénico que revela dos actividades enzimáticas (β -glucosidasa y pirrolidoni- arilamidasa). Sin embargo, este medio cromogénico permite determinar únicamente si las cepas resistentes a la Vancomicina pertenecen o no al género *Enterococcus*, pero no permite identificar la especie o los mecanismos de resistencia implicados, en particular si se trata de una resistencia adquirida o salvaje.

Así, la caracterización de una especie de microorganismo, y después la identificación de su resistencia a un tratamiento, es larga y fastidiosa. Si el laboratorio proporciona al clínico una detección positiva mientras que el aislado está en realidad desprovisto de microorganismos resistentes, esto puede conducir a un tratamiento inútil e inadecuado. A la inversa, no comunicar una detección positiva que se confirmará después retrasa la implantación del aislamiento del paciente (y eventualmente de una terapia adecuada) en un día. Esto muestra la necesidad de un ensayo de confirmación rápido y fiable.

La presente invención se propone por lo tanto mejorar el estado de la técnica presentando una nueva herramienta de diagnóstico que permita una ganancia de tiempo, de fiabilidad y de pertinencia en la terapia utilizada. Nuestra invención permite, en una sola etapa, identificar las especies de microorganismos presentes en una muestra, determinar su mecanismo de resistencia a fin de proponer un tratamiento adecuado para cada paciente. Esta invención es particularmente adecuada para discriminar diferentes especies de microorganismos, que presentan diferentes mecanismos de resistencia a diferentes tratamientos, pero todas susceptibles de estar presentes en una misma muestra.

Antes de ir más adelante en la descripción de la invención, se dan las definiciones siguientes a fin de facilitar la comprensión de la invención:

Por medio de cultivo se entiende un medio que comprende todos los elementos necesarios para la supervivencia y/o el crecimiento de microorganismos. El medio de cultivo según la invención puede contener otros eventuales aditivos, como por ejemplo: peptonas, uno o varios factores de crecimiento hidratos de carbono, uno o varios agentes selectivos, tampones, uno o varios gelificantes, etc. Este medio de cultivo 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.

En el sentido de la presente invención, el término microorganismo cubre las bacterias, gram positivas o gram negativas, las levaduras y, más generalmente, los organismos generalmente unicelulares, invisibles a simple vista, que pueden multiplicarse y manipularse en laboratorio.

5 A título de bacterias gram negativas, se pueden citar las bacterias de los géneros siguientes: *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Morganella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Acinetobacter*, *Branhamella*, *Neisseria*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Aeromonas*, *Moraxella*, *Pasteurella*, *Providencia*, y *Legionella*.

10 A título de bacterias gram positivas, se pueden citar las bacterias de los géneros siguientes: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Clostridium*, *Gardnerella*, *Kocuria*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Mycobacteria* y *Corynebacteria*. A título de levaduras, se pueden citar las levaduras de los géneros siguientes: *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces* y *Trichosporon*.

15 Por muestra biológica, se entiende una muestra clínica, procedente de una extracción de líquido biológico, o una muestra alimenticia, procedente de cualquier tipo de alimento. Esta muestra puede así ser líquida o sólida y se puede citar de manera no limitativa una muestra clínica de sangre, plasma, orinas, heces, extracciones de la nariz, de la garganta, pieles, heridas, líquido cefalo-raquídeo, una muestra alimenticia de agua, de bebidas tales como la leche, zumo de frutas; yogur, carne, huevos, hortalizas, mahonesa, queso; pescado, etc., una muestra alimenticia
20 procedente de una alimentación destinada a los animales, tal como en particular una muestra procedente de harinas animales.

Por mecanismos de resistencia, se entiende cualquier tipo de dispositivo que permite a un microorganismo hacer un
25 tratamiento parcial o totalmente inoperante sobre dicho microorganismo, garantizando su supervivencia. Los mecanismos de resistencia se clasifican en general en 3 categorías: deficiencia en la penetración del antibiótico en la bacteria, inactivación o excreción del antibiótico por sistemas enzimáticos bacterianos y deficiencia de afinidad entre la diana bacteriana y el antibiótico.

A título indicativo, se pueden citar en particular los mecanismos de resistencia relacionados con la expresión de una
30 enzima que pertenece al grupo de las β -lactamasas de amplio espectro; de una enzima que pertenece al grupo de las cefalosporinasas cromosómicas de clase C alto nivel; los mecanismos de resistencia a los glicopéptidos, preferiblemente desarrollados por unas bacterias que pertenecen al género *Enterococcus*.

35 Se citarán también los mecanismos de resistencia a la meticilina, la penicilina, la tetraciclina, la eritromicina, la vancomicina cuando el microorganismo es una bacteria *Staphylococcus aureus*.

Se citarán también los mecanismos de resistencia a la penicilina, la vancomicina y al linezodil cuando el
microorganismo es una bacteria *Enterococcus faecium*.

40 Se citarán también los mecanismos de resistencia a la anfotericina B o a los antifúngicos de la familia de los azolados cuando el microorganismo es una levadura.

Se citarán finalmente los mecanismos de resistencia a la isoniazida y a la rifampicina cuando el microorganismo es
45 una bacteria *Mycobacterium tuberculosis*.

Por tratamiento, se entiende un tratamiento susceptible de impedir o reducir el crecimiento de microorganismos
procedentes de un paciente. Este tratamiento puede comprender en particular unos compuestos antimicrobianos, tales como unos antibióticos, tales como penicilinas, cefalosporinas clásicas, cefalosporinas de amplio espectro, monobactams, glicopéptidos, aminosidos o tales como unos antifúngicos o unos compuestos inhibidores de la
50 resistencia. Se señala que este tratamiento puede comprender además el aislamiento del paciente, lo que impide la propagación del microorganismo en otros pacientes.

Por sustrato que permite la detección de una actividad enzimática o metabólica, se entiende cualquier molécula
55 susceptible de generar directa o indirectamente una señal detectable debido a una actividad enzimática o metabólica del microorganismo.

Cuando esta actividad es una actividad enzimática, se habla entonces de sustrato enzimático. Por sustrato
enzimático, se entiende cualquier sustrato que puede ser hidrolizado por una enzima en un producto que permite la
60 detección, directa o indirecta de un microorganismo. Este sustrato comprende en particular una primera parte específica de la actividad enzimática a revelar y una segunda parte que actúa como marcador, denominado en lo sucesivo parte de marcado. Esta parte de marcado puede ser cromogénica, fluorogénica, luminescente, etc. Como sustrato cromógeno, muy adecuado para los soportes sólidos (filtro, gelosa, gel de electroforesis), se pueden citar en particular los sustratos a base de indoxilo y sus derivados, y los sustratos a base de hidroxiquinolina o de esculetina y sus derivados, que permiten la detección de actividades osidasas y estererasas. Se pueden citar también los sustratos
65 a base de nitrofenol y nitroanalina y derivados, que permiten detectar las actividades osidasas y estererasas en el caso de sustratos a base de nitrofenol, y de las actividades peptidasas en el caso de sustratos a base de

- nitroanalina. Se pueden citar finalmente los sustratos a base de naftol y naftilamina y sus derivados, que permiten detectar las actividades osidasas y estererasas por medio del naftol, y las actividades peptidasas por medio de la naftilamina. Este sustrato puede permitir en particular, pero de manera no limitativa, la detección de una actividad enzimática tal como la actividad de una osidasa, peptidasa, esterasa, etc. El sustrato enzimático puede también ser un sustrato natural cuyo producto de hidrólisis se detecta directa o indirectamente. Como sustrato natural, se puede citar en particular el Triptofano para detectar una actividad triptofanasa o desaminasa, un aminoácido cíclico (triptófano, fenilalanina, histidina, tirosina) para detectar una actividad desaminasa, el fosfatidil inositol para detectar una actividad fosfolipasa, etc.
- 5
- 10 Cuando esta actividad es una actividad metabólica, el sustrato es entonces un sustrato metabólico, tal como una fuente de carbono o de nitrógeno, acoplada a un indicador que produce una coloración en presencia de uno de los productos del metabolismo.
- 15 Según un modo preferido de realización de la invención, dicha primera y/o segunda actividad enzimática o metabólica es una actividad enzimática, preferiblemente seleccionada entre las actividades enzimáticas: beta-glucosidasa, desaminasa, beta-glucuronidasa, beta-galactosidasa, alfa-glucosidasa, alfa-galactosidasa, hexosaminidasa, N-acetil-hexosaminidasa, fosfatasa, esterasa, aminopeptidasa.
- 20 Por ejemplo, para detectar *E. coli*, se utiliza preferiblemente la actividad beta-glucuronidasa o β -galactosidasa o triptofanasa o desaminasa; para detectar los *Proteus* se utiliza preferiblemente la actividad desaminasa, para detectar los enterococos, se utiliza preferiblemente la actividad beta-glucosidasa. Para los *Candida albicans* se prefiere la hexosaminidasa, para las *Listeria monocytogenes* la fosfolipasa, para las salmonelas, la esterasa, para las *Pseudomonas aeruginosa* la esterasa o la β -alanina aminopeptidasa, para los *Staphylococcus aureus* la fosfatasa o al alfa-glucosidasa.
- 25 Por marcador que permite la diferenciación de dos grupos de microorganismos, se entiende un compuesto que no tiene las mismas propiedades en un primer y en un segundo grupo. Este compuesto puede así ser:
- 30 * un sustrato específico
- * un inhibidor de mecanismo de resistencia, que permite entonces inhibir el crecimiento de los organismos que desarrollan una resistencia particular, sin discriminación de la especie de microorganismos.
- 35 En el caso de la utilización de un sustrato específico, se utiliza preferiblemente la actividad beta-glucuronidasa, o beta-galactosidasa o triptofanaseou desaminasa para detectar *E. coli*, para detectar los *Proteus* se utiliza preferiblemente la actividad desaminasa, para detectar los enterococos, se utiliza preferiblemente la actividad beta-glucosidasa. Para las *Candida albicans*, se prefiere la hexosaminidasa, para las *Listeria monocytogenes* la fosfolipasa, para las salmoneras la esterasa, para las *Pseudomonas aeruginosa* la esterasa o la β -alanina aminopeptidasa, para los *Staphylococcus aureus* la fosfatasa o la alfa-glucosidasa.
- 40 En el caso de la utilización de un inhibidor de mecanismo de resistencia, se utiliza preferiblemente
- 45 * el ácido clavulánico, el tazobactam o el sulbactam cuando el primer grupo y/o el segundo grupo comprende un mecanismo de resistencia inducido por la expresión de β -lactamasas. La concentración en ácido clavulánico en el medio está entonces preferiblemente comprendida entre 0,05 y 32 mg/l, preferiblemente entre 0,1 y 8 mg/l y aún más preferiblemente entre 0,25 y 6 mg/l.
- 50 * la cloxacilina o la dicloxacilina cuando el primer grupo y/o el segundo grupo comprende un mecanismo de resistencia inducido por la expresión de cefalosporinasas
- 55 Por taxón, se entiende un grupo de microorganismos que tienen una unidad taxonómica. Un taxón puede ser una familia, un género, un conjunto de géneros, una especie, un conjunto de especies, una sub-especie. A título indicativo, se pueden citar las enterobacterias, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*), *Proteeae*, *Proteus*, *Morganella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Candida*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, estafilococos a coagulasa negativa, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*.
- 60 Por antimicrobiano, se entiende cualquier compuesto susceptible de impedir o ralentizar el crecimiento de un microorganismo. Este compuesto puede ser un antibiótico o un antifúngico.
- 65 Por antibiótico, se entiende cualquier compuesto susceptible de impedir o ralentizar el crecimiento de una bacteria. A título indicativo, se pueden citar en particular los antibióticos cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxon, cefpodoxima, aztreonam, vancomicina, tobramicina, ciprofloxacina.
- Por antifúngico, se entiende cualquier compuesto susceptible de impedir o ralentizar el crecimiento de una levadura

o de un moho. A título indicativo, se puede citar en particular la amfotericina B, el fluconazol, el itraconazol, el voriconazol, la cicloheximida.

Según un modo preferido de realización de la invención, cuando el antibiótico es

5 * la cefotaxima, la concentración en cefotaxima en el medio está preferiblemente comprendida entre 0,25 y 8 mg/l, preferiblemente entre 1 y 2 mg/l.

10 * la ceftazidima, la concentración en ceftazidima en el medio está preferiblemente comprendida entre 0,25 y 8 mg/l, preferiblemente entre 2 y 2,5 mg/l.

* la ceftriaxona, la concentración en ceftriaxona en el medio está preferiblemente comprendida entre 0,25 y 8 mg/l, preferiblemente entre 1 y 2,5 mg/l.

15 * la cefpodoxima, la concentración en cefpodoxima en el medio está preferiblemente comprendida entre 0,1 y 32 mg/l, preferiblemente entre 0,75 y 10 mg/l y aún más preferiblemente entre 1 y 6 mg/l.

20 * el aztreonam, la concentración en aztreonam en el medio está preferiblemente comprendida entre 0,1 y 8 mg/l, preferiblemente entre 0,75 y 1,5 mg/l.

Según un modo particular de realización de la invención, el medio comprende una combinación de al menos dos antibióticos. Preferiblemente, la combinación de al menos dos antibióticos comprende cefotaxima y ceftazidima.

25 Sea cual sea el modo de realización de la invención, el medio puede comprender además un colorante. A título indicativo, se puede citar como colorante el azul de Evans, el rojo neutro, la sangre de oveja, la sangre de caballo, un opacificante tal como el óxido de titanio, nitroanilina, verde malaquita, verde brillante, etc.

Todos los medios pueden comprender, además, con el fin de aumentar su sensibilidad

30 * al menos un antimicrobiano activo contra las bacterias gram-positivas, tal como en particular el linezolid o la vancomicina,

* a menos un antimicrobiano activo contra las levaduras, tal como en particular el voriconazol o la anfotericina B.

35 La invención se refiere a la utilización de un medio de cultivo para distinguir al menos 3 grupos de microorganismos en una muestra biológica que comprende:

40 * un primer grupo de microorganismos, que pertenece a un primer taxón de microorganismos y que comprende al menos un mecanismo de resistencia a un tratamiento,

* un segundo grupo de microorganismos, que pertenece a un segundo taxón de microorganismos, diferente de dicho primer taxón, pero que comprende al menos un mecanismo de resistencia a un tratamiento, idéntico al del primer grupo

45 * un tercer grupo de microorganismos, no resistentes a dicho tratamiento

comprendiendo dicho medio de cultivo

50 a. al menos un primer sustrato que permite la detección de al menos una primera actividad enzimática o metabólica de dicho primer grupo de microorganismos

55 b. al menos un marcador que permite la diferenciación del primer grupo de microorganismos y del segundo grupo de microorganismos, siendo dicho marcador un sustrato que permite la detección de al menos una actividad enzimática o metabólica de dicho segundo grupo de microorganismos

c. al menos un antimicrobiano, activo sobre dicho tercer grupo de microorganismos

60 Este modo de realización de la invención permite distinguir en una misma muestra un primer y un segundo grupo que comprende diferentes especies o diferentes taxones de microorganismos, pero siendo cada uno de los dos grupos resistentes a un mismo tratamiento.

La invención se refiere a un medio de cultivo que comprende:

65 * al menos un primer sustrato que permite la detección del metabolismo de los aflu-glucósidos, preferiblemente el metil- α -glucósido a una concentración comprendida entre 1 y 50 g/l, preferiblemente entre 5 y 20 g/l o el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-glucósido a una concentración comprendida entre 25 y 500 mg/l, preferiblemente entre 40 y 250

mg/l o el 5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-metil- α -D-glucósido a una concentración comprendida entre 25 y 500 mg/l, preferiblemente entre 40 y 250 mg/l

5 * al menos un segundo sustrato que permite la detección de una segunda actividad diferente del metabolismo de los alfa-glucósidos preferiblemente el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucósido a una concentración comprendida entre 25 y 500 mg/l, preferiblemente entre 40 y 250 mg/l o 6-cloro-3-indolil- β -D-glucósido a una concentración comprendida entre 25 y 500 mg/l, preferiblemente entre 40 y 250 mg/l o el alizarin- β -D-galacosido a una concentración comprendida entre 10 y 500 mg/l, preferiblemente entre 20 y 250 mg/l o el 5-bromo-6-cloro-3-indolil- β -D-glucósido a una concentración comprendida entre 25 y 500 mg/l, preferiblemente entre 40 y 250 mg/l o el 5-bromo-6-cloro-3-indolil- β -D-galactósido a una concentración comprendida entre 25 y 500 mg/l, preferiblemente entre 40 y 250 mg/l o el 6-cloro-3-indolil- β -D-galactósido a una concentración comprendida entre 25 y 500 mg/l, preferiblemente entre 40 y 250 mg/l. Preferentemente, este segundo sustrato permite la detección de una actividad beta-glucosidasa o beta-galactosidasa.

15 * al menos un antimicrobiano, preferiblemente un antibiótico, tal como la vancomicina a una concentración comprendida entre 0,5 y 128 mg/l, preferiblemente entre 2 y 32 mg/l

Cuando el antibiótico es la vancomicina, este medio se utiliza preferiblemente para distinguir:

20 * un primer grupo de microorganismos, que comprende *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, resistentes a la vancomicina,

* un segundo grupo de microorganismos, que comprende *enterococcus casseliflavus* y *Enterococcus gallinarum*, resistentes a la vancomicina,

25 * un tercer grupo de microorganismos no resistentes a la vancomicina.

En este caso, el primer sustrato es preferiblemente el metil- α -glucósido, el segundo sustrato es preferiblemente el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucósido o el 6-cloro-3-indolil- β -D-glucósido, y el antimicrobiano es preferiblemente la vancomicina.

Este medio es también preferiblemente utilizado para distinguir:

35 * un primer grupo de microorganismos, que comprende *Enterococcus faecalis*, resistentes a la vancomicina,

* un segundo grupo de microorganismos, que comprende *Enterococcus gaecium* resistentes a la vancomicina,

40 * un tercer grupo de microorganismos no resistentes a la vancomicina o que expresa una resistencia natural (*E. casseliflavus* y *E. gallinarum*).

En este caso, el primer sustrato es preferiblemente el 5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-metil- α -D-glucósido o el 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-glucósido, el segundo sustrato es preferiblemente el 6-cloro-3-indolil- β -D-glucósido o el Alizarin- β -D-galactósido, o el 5 bromo-6-cloro-3-indolil- β -D-glucósido o el 5 bromo-6-cloro-3-indolil- β -D-galactósido o el 6-cloro-3-indolil- β -D-galactósido y el antimicrobiano es preferiblemente la vancomicina.

45 Este medio se utiliza también preferiblemente para distinguir:

* un primer grupo de microorganismos, que comprende *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, resistentes a la vancomicina

50 *.un segundo grupo de microorganismos, que comprende *Staphylococcus aureus*, intermedio o resistente a la vancomicina

55 *.un tercer grupo de microorganismos no resistentes a la vancomicina

En este caso, el primer sustrato es preferiblemente el 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-N-méthyl- α -D-glucósido o el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-glucósido, el segundo sustrato es preferiblemente el 6-cloro-3-indolil- β -D-glucósido o el 5-bromo-6-cloro-3-indolil- β -D-glucósido, y el antimicrobiano es preferiblemente la vancomicina.

60 La tabla siguiente permite distinguir las combinaciones adecuadas de sustratos y antimicrobianos en función de la especie que se desea detectar:

65

1º grupo de microorganismos	2º grupo de microorganismos	3º grupo de microorganismos	1º sustrato	2º sustrato	Antimicrobiano
<i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i> resistentes a la vancomicina	<i>E. casseliflavus</i> y <i>E. gallinarum</i> , resistentes a la vancomicina	Microorganismos no resistentes a la vancomicina	Metil- α -glucósido	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucósido o 6-cloro-3-indolil- β -D-glucósido	vancomicina
<i>E. faecalis</i> , resistentes a la vancomicina	<i>E. faecium</i> resistentes a la vancomicina	Microorganismos no resistentes a la vancomicina o que expresan una resistencia natural (<i>E. casseliflavus</i> y <i>E. gallinarum</i>)	5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-metil- α -D-glucósido o 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-glucósido	6-cloro-3-indolil- β -D-glucósido o alizarin- β -D-galactósido o 5-bromo-6-cloro-3-indolil- β -D-glucósido o 5-bromo-6-cloro-3-indolil- β -D-galactósido o 6-cloro-3-indolil- β -D-galactósido	vancomicina
<i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i> resistentes a la vancomicina	<i>S. aureus</i> resistentes a la vancomicina	Microorganismos no resistentes a la vancomicina	5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-metil- α -D-glucósido o 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-glucósido	6-cloro-3-indolil- β -D-glucósido o 5-bromo-6-cloro-3-indolil- β -D-glucósido	vancomicina

Puede ser pertinente ajustar también la concentración en vancomicina, preferiblemente entre 0,5 y 12 mg/l.

Asimismo, la invención se refiere también a un medio de cultivo que comprende:

5 *·al menos un primer sustrato que permite la detección del metabolismo de los alfa-glucósidos preferiblemente el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-glucósido a una concentración comprendida entre 25 y 500 mg/l, preferiblemente entre 40 y 250 mg/l o el 5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-metil- α -D-glucósido a una concentración comprendida entre 25 y 500 mg/l, preferiblemente entre 40 y 250 mg/l,

10 *·al menos un segundo sustrato que permite la detección de una segunda actividad diferente del metabolismo de los alfa-glucósidos, preferiblemente el 6-cloro-3-indolil- β -D-glucósido a una concentración comprendida entre 25 y 500 mg/l, preferiblemente entre 40 y 250 mg/l o el 6-cloro-3-indolil- β -D-galactósido a una concentración comprendida entre 25 y 500 mg/l, preferiblemente entre 40 y 250 mg/l o el Alizarin- β -galactósido a una concentración comprendida entre 10 y 500 mg/l, preferiblemente entre 20 y 250 mg/l o el 5-bromo-6-cloro-3-indolil- β -D-glucósido a una concentración comprendida entre 25 y 500 mg/l, preferiblemente entre 40 y 250 mg/l o el 5-bromo-6-cloro-3-indolil- β -D-galactósido a una concentración comprendida entre 25 y 500 mg/l, preferiblemente entre 40 y 250 mg/l o el 6-cloro-3-indolil- β -D-galactósido a una concentración comprendida entre 25 y 500 mg/l, preferiblemente entre 40 y 250 mg/l. Preferiblemente, este segundo sustrato permite la detección de una actividad beta-glucosidasa o beta-galactosidasa.

* una combinación de antimicrobiano, preferiblemente una combinación de antibióticos tal como,

- 25 ◦ la vancomicina a una concentración comprendida entre 0,5 y 128 mg/l, preferiblemente entre 2 y 32 mg/l
- el aztreonam a una concentración comprendida entre 1 y 150 mg/l preferiblemente entre 4 y 60 mg/l
- la colistina a una concentración comprendida entre 1 y 100 mg/l preferiblemente entre 2 y 20 mg/l
- 30 ◦ la amfotericina B a una concentración comprendida entre 0.5 y 50 mg/l preferiblemente entre 1 y 15 mg/l

Cuando uno de los antibióticos es la vancomicina, este medio se utiliza preferiblemente para distinguir:

35 *·un primer grupo de microorganismos, que comprende *Enterococcus faecium*, resistentes a la vancomicina

*·un segundo grupo de microorganismos, que comprende *Enterococcus faecalis*, resistentes a la vancomicina

*·un tercer grupo de microorganismos no resistentes a la vancomicina

40 Este medio se utiliza también preferiblemente para distinguir:

*·un primer grupo de microorganismos, que comprende *Enterococcus faecium*, resistentes a la vancomicina

45 * un segundo grupo de microorganismos, que comprende *Staphylococcus aureus*, intermedio o resistente a la vancomicina

* un tercer grupo de microorganismos no resistentes a la vancomicina

5 Las combinaciones de sustratos en función de los grupos de microorganismos que se desean identificar se presentan, por ejemplo, en la tabla anterior. Mediante la utilización de una combinación de antimicrobianos adecuada, es posible distinguir no sólo tres grupos de microorganismos, si no también 4, 5 o incluso más, grupos de microorganismos.

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

Ejemplo 1

15 Este primer ejemplo se basa en la detección fenotípica de los enterococos resistentes a los glicopéptidos, con distinción específica de los *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*, que utiliza la reducción de susceptibilidad a los antibióticos y la puesta en evidencia de una actividad enzimática: la β -glucosidasa y de una actividad metabólica: la acidificación del metil- α -glucósido.

1. Elección de las cepas

20 En el ámbito de las manipulaciones efectuadas, para la evaluación de la actividad de los antibióticos activos sobre los enterococos, se emplearon diferentes especies de *Enterococcus* (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gallinarum*). En los ensayos se comparan unas cepas resistentes a los glicopéptidos (VRE) y unas cepas salvajes.

25 2. Preparación del medio

El medio utilizado es un medio Columbia (51026) que comprende además

30 * 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucopiranosido (X-Glu) a 100 mg/l

* Metil- α -D-glucósido a 9 g/l

* rojo neutro a 25 mg/l

35 * sales biliares a 5g/l

* vancomicina a 4 mg/l

40 * amfotericina B a 2 mg/l

45 Se añade agua osmótica y el conjunto se homogeneiza y se funde al baño maría a 100°C. El medio de base se reparte en frascos, en un número que corresponde al número total de medios a ensayar durante la manipulación. Los frascos se pasan después a autoclaves durante 15 minutos a 121°C. Los medios llevan de vuelta y se mantienen en sobrefusión a $55 \pm 3^\circ\text{C}$ al baño maría, a fin de añadir estérilmente los aditivos termolábiles (esterilizados previamente por filtración sobre 0,22 μm).

50 Los medios se vierten después en cajas de 90 mm de diámetro y se dejan sobre una superficie plana para que puedan recuperar la masa. Después la superficie de las gelosas se seca bajo campana de flujo laminar durante 30 minutos.

3. Inoculación de los medios

55 A partir de precultivos de 24 horas a $36^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ en atmósfera aeróbica sobre medio TSA, se prepara un inóculo de 0,5 McF en agua fisiológica, después se transfiere 1 μl de esta suspensión en 5 ml de agua fisiológica. A fin de obtener unas colonias aisladas suficientemente numerosas, una gama de inóculos permitió determinar que la cantidad óptima de bacterias a inocular era de 10^3 a 10^4 CFU/ml. La inoculación se realiza directamente sobre las 2 semi-gelosas con la ayuda de un escobillón estéril. Después los cultivos se incuban a 37°C en atmósfera aeróbica.

60 4. Lectura de los medios

65 Las lecturas se efectúan a 18 horas (± 30 minutos), 24h (± 1 h) y 48h (± 4 h). Se ha observado la densidad y el tamaño de las colonias, el aspecto, el color y las intensidades de coloración de la masa y de las colonias aisladas, según las escalas de lectura 1 a 3 siguientes: 0: ningún crecimiento; 0,1: traza de crecimiento; 0,25: colonias de diámetro $< 0,5$; 0,5: colonias de 0,5 mm de diámetro; 0,75: 0,5 mm $<$ diámetro < 1 mm; 1: colonias de 1 mm de diámetro; 1,25: 1 mm $<$ diámetro $< 1,5$; 1,5; colonias de 1,5 mm de diámetro; 2: colonias de 2 mm de diámetros; 3:

colonias de diámetro > 2 mm.

5. Resultados:

5 Sobre este medio sólo las cepas de enterococos resistentes a los glicopéptidos se desarrollan y forman colonias.

Las cepas de *E. faecalis* y de *E. faecium* resistentes forman unas colonias verdes mientras que las de *E. casseliflavus* y de *E. gallinarum* forman unas colonias azules a violetas.

10 Este medio permite por lo tanto diferenciar estos dos grupos de enterococos y aportar una respuesta terapéutica adecuada.

Ejemplo 2

15 Este segundo ejemplo se basa en la detección fenotípica de los enterococos resistentes a los glicopéptidos, con distinción específica de los *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*, que utilizan la reducción de susceptibilidad a los antibióticos y la puesta en evidencia de dos actividades enzimáticas: la α -glucosidasa y la β -galactosidasa o β -glucosidasa.

20 1. Elección de las cepas

En el ámbito de las manipulaciones efectuadas, para la evaluación de la actividad de los antibióticos activos sobre los enterococos, se han empleado diferentes especies de *Enterococcus* (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gallinarum*,). En los ensayos se comparan unas cepas resistentes a los glicopéptidos (VRE) y unas cepas salvajes.

25 2. Preparación del medio

Los medios utilizados eran un medio Columbia (51026) que comprende además:

30 ◦ 5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-metil- α -D-glucopiranosido (GreenA- α -Glu) a 150 mg/l

◦ 6-cloro-3-indolil- β -glucopiranosido (Rose-b-Glu) a 200 mg/l

35 ◦ 5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-metil- α -D-glucopiranosido (GreenA- α -Glu) a 150 mg/l

◦ alizarin- β -galactopiranosido a 50 mg/l

y vancomicina a 8 mg/l

40 y amfotericina B a 4 mg/l

y colistina a 2 mg/l

45 y aztreonam a 32 mg/l

El agua osmótica se añade y el conjunto se homogeneiza y se funde al baño maría a 100°C.

50 Los medios de base se reparten en frascos. Los frascos se pasan después a autoclaves durante 15 minutos a 121°C. Los medios vuelven a llevar y se mantienen en sobrefusión a $55 \pm 3^\circ\text{C}$ al baño maría, a fin de añadir estérilmente los aditivos termolábiles (esterilizados previamente por filtración sobre 0,22 μm).

55 Los medios se vierten después en cajas de 90 mm de diámetro y se dejan sobre una superficie plana para que puedan recuperar la masa. Después la superficie de las gelosas se seca bajo campana de flujo laminar durante 30 minutos.

3. Inoculación de los medios

60 Esta etapa se realiza tal como se describe en el ejemplo 1.

4. Lectura de los medios

Esta etapa se realiza tal como se describe en el ejemplo 1.

65 5. Resultados:

ES 2 662 707 T3

Sobre el medio que contiene un sustrato de α -glucosidasa y β -glucosidasa, las cepas de *E. faecium* resistentes forman unas colonias violetas, mientras que las de *E. faecalis* resistentes forman unas colonias rosas. Las cepas de *E. casseliflavus* y de *E. gallinarum* (resistencias naturales) se inhiben debido a la concentración en vancomicina.

- 5 Este medio permite por lo tanto diferenciar estos dos grupos de enterococos y aportar una respuesta terapéutica adecuada así como un seguimiento de la epidemiología local.

- 10 Sobre el medio que contiene un sustrato de α -glucosidasa y β -galactosidasa, las cepas de *E. faecium* resistentes forman unas colonias violetas, mientras que las de *E. faecalis* resistentes forman unas colonias verdes. Las cepas de *E. casseliflavus* y de *E. gallinarum* (resistencias naturales) se inhiben debido a la concentración en vancomicina.

Este medio permite por lo tanto diferenciar estos dos grupos de enterococos y aportar una respuesta terapéutica adaptada así como un seguimiento de la epidemiología local.

15

REIVINDICACIONES

1. Medio de cultivo que comprende:

- 5 * al menos un primer sustrato enzimático que permite la detección de la actividad alfa-glucosidasa;
* al menos un segundo sustrato que permite la detección de la actividad beta-glucosidasa o beta-galactosidasa;
* al menos un antibiótico, que es la vancomicina.

10

2. Utilización de un medio de cultivo según la reivindicación 1, para distinguir:

- 15 * un primer grupo de microorganismos, que comprende *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, resistentes a la vancomicina;
* un segundo grupo de microorganismos, que comprende *Enterococcus casseliflavus* y *Enterococcus gallinarum*, resistentes a la vancomicina;
* un tercer grupo de microorganismos no resistentes a la vancomicina.

20

3. Medio de cultivo según la reivindicación 1, caracterizado por que el primer sustrato es el 5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-metil-alfa-D-glucósido o el 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-alfa-D-glucósido, el segundo sustrato es el alizarin-beta-D-galactósido, o el 5-bromo-6-cloro-3-indolil-beta-D-galactósido o el 6-cloro-3-indolil-beta-D-galactósido y el antimicrobiano es la vancomicina.

25

4. Utilización de un medio de cultivo según la reivindicación 1, para distinguir:

- * un primer grupo de microorganismos, que comprende *Enterococcus faecium*, resistentes a la vancomicina;
30 * un segundo grupo de microorganismos, que comprende *Enterococcus faecalis*, resistentes a la vancomicina;
* un tercer grupo de microorganismos no resistentes a la vancomicina o que expresan una resistencia natural.

35

5. Utilización de un medio de cultivo según la reivindicación 1, para distinguir:

- * un primer grupo de microorganismos, que comprende *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, resistentes a la vancomicina;
* un segundo grupo de microorganismos, que comprende *Staphylococcus aureus*, intermedio o resistente a la vancomicina;
40 * un tercer grupo de microorganismos no resistentes a la vancomicina.