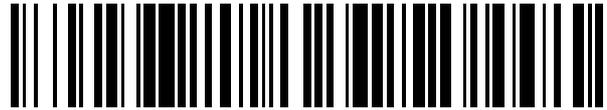


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 304**

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 11188970 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2465939**

54 Título: **Medio 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:

11.04.2018

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 BROSSARD, NATHALIE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 663 304 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 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 microorganismos, tales como, en particular, bacterias o levaduras.

10 La resistencia de las bacterias a los antibióticos es un problema importante de salud pública. La resistencia de microorganismos infecciosos frente a un tratamiento se ha desarrollado al mismo tiempo que las moléculas antiinfecciosas y representa en la actualidad un obstáculo importante en terapéutica. Esta resistencia es una fuente de problemas múltiples, incluyendo 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 estos 20 últimos años, representa uno de los problemas actuales principales de la medicina. Las infecciones causadas por estos organismos son el origen del alargamiento de la duración de hospitalización y se asocian a altas tasas de morbilidad y de mortalidad, tras 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 de las β -lactamasas, impiden la degradación enzimática de los antibióticos y les permiten volverse eficaces contra 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 las 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 generaciones, pero también de cefalosporinas de 3ª generación (C3G) (cefotaxima CTX, ceftazidima CAZ, cefpodoxima CPD, ceftriazona CRO) y 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 cefalosporinas 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, luminiscente, 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 esterasas. Se pueden citar también los sustratos
65 a base de nitrofenol y nitroanalina y derivados, que permiten detectar las actividades osidasas y esterasas 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 esterases 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 Triptófano 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 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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:
- 25 * un sustrato específico
- 30 * 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 linezolido 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

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

55 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.

Este modo de realización de la invención permite así, por ejemplo, distinguir, en una misma muestra, un primer grupo que comprende unas bacterias *E. coli* BLSE, y un segundo grupo que comprende unas bacterias KESC BLSE.

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

- 5 * un primer sustrato que permite la detección de una actividad enzimática beta glucuronidasa o beta galactosidasa, preferiblemente 6-Cloro-3-indolil- β -D-glucurónido a una concentración comprendida entre 25 y 750 mg/l, preferiblemente entre 40 y 300 mg/l o 5-Bromo-6-cloro-3-indolil- β -D-galactósido a una concentración comprendida entre 25 y 500 mg/l, preferiblemente entre 40 y 150 mg/l
- 10 - un segundo sustrato que permite la detección de una actividad beta glucosidasa, 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 triptofanasa o desaminasa, preferiblemente el Triptófano a una concentración comprendida entre 50 y 5000 mg/l, preferiblemente entre 250 y 2000 mg/l
- 15 - un antimicrobiano que es un antibiótico, preferiblemente la cefpodoxima a una concentración comprendida entre 0,5 y 32 mg/l, preferiblemente entre 0,75 y 10 mg/l y aún más preferiblemente entre 1 y 6 mg/l y la cloxacilina a una concentración comprendida entre 10 y 2000 mg/l, preferiblemente entre 50 y 500 mg/l
- 15 Cuando el antibiótico es la cefpodoxima, este medio se utiliza preferiblemente para distinguir:
- 20 * un primer grupo de bacterias *E. coli* BLSE
- * un segundo grupo de bacterias KESC BLSE
- * un tercer grupo de bacterias, no resistentes a las beta lactaminas
- La invención se refiere también a un medio de cultivo que comprende:
- 25 * un primer sustrato que permite la detección de una actividad enzimática beta glucuronidasa, preferiblemente 6-Cloro-3-indolil- β -D-glucurónido a una concentración comprendida entre 25 y 750 mg/l, preferiblemente entre 40 y 300 mg/l o beta galactosidasa, preferiblemente 5-Bromo-6-cloro-3-indolil- β -D-galactósido a una concentración comprendida entre 25 y 500 mg/l, preferiblemente entre 40 y 150 mg/l
- 30 * un segundo sustrato que permite la detección de una actividad beta glucosidasa, 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 triptofanasa o desaminasa, preferiblemente el Triptófano a una concentración comprendida entre 50 y 5000 mg/l, preferiblemente entre 250 y 2000 mg/l
- 35 * dos antimicrobianos, que son preferiblemente dos antibióticos, preferiblemente la cefpodoxima a una concentración comprendida entre 0,1 y 32 mg/l, preferiblemente entre 0,25 y 10 mg/l y aún más preferiblemente entre 0,5 y 4 mg/l y aztreonam a una concentración comprendida entre 0,1 y 8 mg/l, preferiblemente entre 0,5 y 1,5 mg/l
- Este medio se utiliza preferiblemente para distinguir:
- 40 * un primer grupo de bacterias *E. coli* BLSE o Case NH
- * un segundo grupo de bacterias KESC BLSE o Case NH
- 45 * un tercer grupo de bacterias, no resistentes a las beta lactaminas y/o a las cefalosporinas
- La invención se refiere también a un medio de cultivo que comprende:
- 50 * un antimicrobiano, preferiblemente un antibiótico tal como la cloxacilina
- * un inhibidor de mecanismo de resistencia, tal como preferiblemente una cefalosporina de 3ª generación seleccionada entre cefotaxima, ceftazidima, cefpodoxima, ceftriaxona.
- Este medio se utiliza también preferiblemente para detectar unas bacterias BLSE.
- 55 El modo de realización de la invención descrito anteriormente no está limitado a la distinción de 3 grupos de microorganismos, sino que puede permitir la distinción de 4, 5 o incluso más grupos de microorganismos. Es entonces necesario añadir en el medio unos marcadores de identificación entre los diferentes grupos.
- 60 Por este motivo, la invención se refiere también a un medio de cultivo que comprende:
- 65 * un primer sustrato que permite la detección de una actividad enzimática beta glucuronidasa, preferiblemente 6-Cloro-3-indolil- β -D-glucurónido a una concentración comprendida entre 25 y 750 mg/l, preferiblemente entre 40 y 300 mg/l o beta galactosidasa, preferiblemente 5-Bromo-6-cloro-3-indolil- β -D-galactósido a una concentración comprendida entre 25 y 500 mg/l, preferiblemente entre 40 y 150m/l

* un segundo sustrato que permite la detección de una beta glucosidasa, 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

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

◦ la cefpodoxima a una concentración comprendida entre 0,5 y 32 mg/l, preferiblemente entre 0,75 y 10 mg/l y aún más preferiblemente entre 1 y 6 mg/l,

◦ la cloxacilina a una concentración comprendida entre 10 y 2000 mg/l, preferiblemente entre 50 y 500 mg/l,

◦ la vancomicina a una concentración comprendida entre 0,5 y 128 mg/l, preferiblemente entre 2 y 32 mg/l et·

◦ el anfo B a una concentración comprendida entre 0,5 y 64 mg/l, preferiblemente entre 1 y 16 mg/l, aún más preferiblemente entre 1 y 8 mg/l

* un tercer sustrato que permite la detección de una actividad desaminasa tal como la histidina, la fenilalanina, el Triptófano o la Tirosina a una concentración comprendida entre 50 y 5000 mg/l, preferiblemente entre 250 y 2000 mg/l.

Este medio puede comprender además un quinto antibiótico que es la cefsulodina, a una concentración comprendida entre 0,5 y 64 mg/l, preferiblemente entre 1 y 16 mg/l.

Este medio se utiliza preferiblemente para distinguir:

* un primer grupo de bacterias *E. coli* BLSE

* un segundo grupo de bacterias KESC BLSE

* un tercer grupo de bacterias, no resistentes a las beta-lactaminas y/o a las cefalosporinas

- un cuarto grupo de bacterias *Proteeae* BLSE

Mediante la utilización de una combinación de antimicrobianos adaptada, es posible distinguir no solamente tres grupos de microorganismos sino también 4, 5 o incluso más grupo de microorganismos.

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

EJEMPLO 1

El ejemplo a continuación se basa en la detección fenotípica de BLSE utilizando la reducción de susceptibilidad de estas cepas a los antibióticos y su sensibilidad a las asociaciones con los inhibidores de β-lactamasas. Para ello, se ha utilizado una bi-caja en base CPS ID 3 (medio cromógeno para la detección de microorganismos en las orinas y vendida por bioMérieux bajo la referencia 43541) con una semi-gelosa que contiene un antibiótico y una semi-gelosa que contiene una asociación antibiótico - inhibidor de β-lactamasas.

1. Elección de las cepas

En el ámbito de las manipulaciones efectuadas, para la evaluación de la actividad de los antibióticos activos sobre los bacilos gram-negativos, se han empleado diferentes especies de enterobacterias (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*) y de bacilos gram-negativos no fermentantes (*Pseudomonas aeruginosa*) susceptibles de producir BLSE. En los ensayos se comparan unas cepas BLSE positivas, unas cepas productoras de cefalosporinasa de alto nivel (Case HN) y unas cepas salvajes.

Para las manipulaciones que se refiere a los antibióticos activos sobre las bacterias gram-positivas, se han ensayado unas cepas de cocos gram-positivos (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus agalactiae*) y de bacilos gram-positivos (*Lactobacillus spp*).

Para los ensayos destinados a evaluar la actividad de los antifúngicos, se han utilizado diferentes cepas de levaduras (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida dubliniensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum capitatum*).

2. Preparación de los medios

El medio utilizado era un medio CPS ID3 (referencia 43541) que comprende además, al menos un antibiótico y al menos un inhibidor de mecanismo de resistencia.

La composición de los medios ensayados era la siguiente:

5

	Sustrato cromogénico	Antibiótico	Inhibidor de resistencia
Medio A	6-cloro-3-indolil-β-D-glucurónido 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucósido Triptófano FeCl ₃ Total: 1,73g/l	Cefotaxima 1 mg/l	
Medio B	6-cloro-3-indolil-β-D-glucurónido 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucósido Triptófano FeCl ₃ Total: 1,73g/l	Ceftazidima 1,5 mg/l	Ac clavulánico 0,25 mg/l

10

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 ± 3°C al baño maría, a fin de añadir estérilmente los aditivos termolábiles (esterilizados previamente por filtración sobre 0,22 μm).

15

Los medios se vierten después en bi-cajas de 90 mm de diámetro (es decir aproximadamente 9,5 ml/semi-caja) 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

20

A partir de precultivos de 24 horas a 36°C ± 2°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 10³ a 10⁴ CFU/ml. La inoculación se realiza directamente sobre las 2 semi-gelosa con la ayuda de un escobillón estéril. Después los cultivos se incuban a 37°C en atmósfera aeróbica.

25

4. Lectura de los medios

30

Las lecturas se efectúan a 18 horas (± 30 minutos), 24h (± 1h) y 48h (± 4h). 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.

35

5. Resultados:

a) Cribado de los antibióticos

40

Se ensayaron los 5 antibióticos recomendados por el NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Para cada producto ensayado, se efectuó una rango a fin de determinar las concentraciones que permiten inhibir las cepas salvajes de las enterobacterias ensayadas, sin afectar al crecimiento de las cepas BLSE positivas ni las cepas Case HN positivas.

Las concentraciones elegidas se clasifican en la tabla III siguiente.

45

Tabla III. Valores umbrales de las concentraciones de antibióticos que permiten una inhibición de las cepas salvajes de la enterobacterias ensayadas, sin afectar al crecimiento de las cepas BLSE-positivas en las condiciones ensayadas

	Valor base	Valor alto
Cefotaxima	1 mg/l	2 mg/l
Ceftazidima	2 mg/l	2,5 mg/l
Ceftriaxona	1 mg/l	2,5 mg/l
Cefpodoxima	2 mg/l	10 mg/l
Aztreonam	1 mg/l	1,5 mg/l

El valor base corresponde a la concentración mínima del antibiótico necesaria para la inhibición de las cepas salvajes de las enterobacterias ensayadas. El valor alto corresponde a la concentración máxima del antibiótico que se puede utilizar sin afectar al crecimiento de las cepas BLSE positivas ensayadas.

A estas concentraciones, es conforme la separación de las cepas salvajes y resistentes es satisfactoria, y la expresión de las actividades enzimáticas sobre el medio CPS ID 3.

Además, se señala que la ceftazidima es el único antibiótico ensayado y utilizado en la detección de BLSE que ha mostrado una actividad sobre las cepas salvajes de *P. aeruginosa*. Se ha efectuado un rango a fin de definir la concentración mínima que permite una inhibición total de estas cepas y el valor umbral es de 1,5 mg/l.

La adición de antibióticos no tenía ninguna influencia sobre la expresión de las actividades enzimáticas bacterianas sobre el medio cromogénico. Los grupos de gérmenes estaban también mejor separados e identificados en medio CPS ID 3 control que sobre los medios que comprenden los antibióticos tales como se han descrito anteriormente.

b) Cribado de los inhibidores de β -lactamasas

Se han utilizado tres inhibidores de β -lactamasas (IBL), a saber el ácido clavulánico, el tazobactam y el sulbactam. Cada uno fue objeto de un rango, en presencia de cefotaxima, a fin de determinar la concentración óptima para inhibir las cepas BLSE positivas, sin obstaculizar el crecimiento de las cepas Case HN.

El ácido clavulánico aparecía como el IBL más eficaz en presencia de cefotaxima. El tazobactam y el sulbactam necesitaban unas concentraciones superiores a 2 mg/l para inhibir las cepas BLSE positivas, mientras que el ácido clavulánico era más activo a concentraciones claramente inferiores y en un intervalo de utilización amplio (de 0,1 a 8 mg/l cuando se utiliza en asociación con la cefotaxima).

Cada antibiótico (cefotaximina, ceftazidimina, ceftriaxona, cefpodoxima, aztreonam) se ensayó en presencia de una gama de ácido clavulánico a fin de definir las combinaciones más eficaces. Las combinaciones elegidas se clasifican en la tabla IV siguiente.

Tabla IV. Asociaciones elegidas de antibióticos y de ácido clavulánico (AC), que inhiben las cepas de enterobacterias ensayadas BLSE-positivas, pero que dejan crecer las cepas Case HN positivas.

Cefotaxima	2 mg/l	+ AC	0,1 mg/l
Ceftazidima	2,5 mg/l	+ AC	2 mg/l
Ceftriaxona	2 mg/l	+ AC	0,25 mg/l
Cefpodoxima	9 mg/l	+ AC	0,25 mg/l
Aztreonam	1 mg/l	+ AC	0,5 mg/l

Los resultados obtenidos utilizando una bi-caja que contiene de un lado el antibiótico solo y del otro lado la asociación antibiótico + ácido clavulánico se clasifican en la tabla V.

Tabla V

	Antibiótico solo	Antibiótico + ácido clavulánico
<i>E. coli</i> salvaje		
<i>E. coli</i> BLSE positivo	Colonias rosas	
<i>E. coli</i> Case HN positivo	Colonias rosas	Colonias rosas
<i>Proteeae</i> salvaje		
<i>Proteeae</i> BLSE positivo	Colonias marrón	
<i>Proteeae</i> Case HN positivo	Colonias marrón	Colonias marrón
KESC salvaje		
KESC BLSE positivo	Colonias verdes	
KESC Case HN positivo	Colonias verdes	Colonias verdes

La adición de inhibidores de β -lactamasas no tenía ninguna influencia sobre la expresión de las actividades enzimáticas bacterianas sobre el medio cromogénico. Los grupos de gérmenes estaban también mejor separados e identificados sobre medio CPS ID 3 control que sobre los medios que comprenden unos inhibidores de β -lactamasas.

c) Combinación de antibióticos

Teniendo en cuenta las actividades relativas de los antibióticos y del ácido clavulánico, se han asociado

* la cefotaxima (antibiótico activo sobre las cepas BLSE positivas en combinación con la más baja concentración de ácido clavulánico).

* la ceftazidima (antibiótico activo sobre las cepas salvajes de *P. aeruginosa*), y

* el ácido clavulánico,

a fin de poder inhibir por un lado las cepas salvajes (incluyendo las del bacilo piocianico), y las cepas BLSE positivas de las enterobacterias ensayadas por la adición de IBL.

Tal asociación se ha ensayado sobre las cepas de *P. aeruginosa*, esta especie es naturalmente resistente a la cefotaxima pero sensible a la ceftazidima. Asociando 1,5 mg/l de CAZ (ceftazidima), 1 mg/l de CTX (cefotaxima) y 0,25 mg/l de AC (ácido clavulánico), todas las cepas salvajes y las cepas BLSE positivas de las enterobacterias ensayadas se inhibieron y crecía sólo el conjunto de las cepas Case HN y las cepas BLSE positivas de *P. aeruginosa*. Se trata de una bi-caja con, por un lado la CAZ solo y, por otro lado, CTX más el ácido clavulánico.

La adición de estas combinaciones de antibióticos no tenía ninguna influencia sobre la expresión de las actividades enzimáticas bacterianas sobre el medio cromogénico. Los grupos de gérmenes estaban tan bien separados e identificados sobre medio CPS ID 3 control como sobre los medios que comprenden tales combinaciones de antibióticos.

d) Ensayo de colorante

El medio según la invención se ha realizado también para una utilización en bi-caja, conteniendo uno de los lados un antibiótico, y el segundo otro antibiótico o una combinación de antibióticos. Dado que la misma base de medio CPS ID 3 se utiliza a ambos lados, estos 2 lados estaban diferenciados por la presencia de un colorante.

El colorante ensayado, el azul de Evans, da al medio un color verde. La coloración permitía diferenciar fácilmente los 2 lados de la bi-caja, sin afectar a la fertilidad del medio, ni obstaculizar la lectura de las actividades enzimáticas de las colonias. Después de haber efectuado un rango de azul de Evans, añadido antes o después del tratamiento en autoclave, los valores elegidos eran los siguientes:

- 1,5 o 2 mg/l si el colorante se añade después del tratamiento en autoclave

- entre 2 y 5 mg/l si se añade antes del tratamiento en autoclave.

e) Inhibición de las bacterias Gram-positivas

Las BLSE son un mecanismo de resistencia a las β -lactaminas, encontrado únicamente en los bacilos gram-negativos, conviene por lo tanto inhibir las bacterias gram-positivas por el medio. Se utilizaron dos antibióticos, el linezolido y la vancomicina en el medio según la invención para inhibir las bacterias gram-positivas sensibles.

Para la vancomicina, en las condiciones ensayadas, una concentración comprendida entre 2 y 32 mg/l y en particular 2 a 5 mg/l permite la inhibición de las bacterias gram-positivas sensibles sin interferir con la detección de las bacterias BLSE.

Para la linezolidina, en las condiciones ensayadas, una concentración comprendida entre 2 y 64 mg/l y en particular 4 a 16 mg/l permite la inhibición de las bacterias gram-positivas sensibles sin interferir con la detección de las bacterias BLSE.

La inhibición de las bacterias gram-positivas permitía mejorar la detección de las bacterias BLSE en extracciones polimicrobianas y la especificidad de su coloración.

f) Inhibición de las levaduras

El medio según la invención puede también comprender unos antifúngicos a fin de inhibir la presencia eventual de levaduras que podrían crecer sobre el medio y que podrían molestar el crecimiento de los gérmenes.

Se han ensayado por lo tanto dos antifúngicos: el voriconazol y la anfotericina B.

Para la anfotericina B, en las condiciones ensayadas, una concentración comprendida entre 1 y 32 mg/l y en particular 2 a 8 mg/l permite la inhibición de las levaduras sensibles sin interferir con la detección de las bacterias BLSE.

Para el voriconazol, en las condiciones ensayadas, una concentración comprendida entre 1 y 64 mg/l y en particular 4 a 16 mg/l permite la inhibición de las levaduras sensibles sin interferir con la detección de las bacterias BLSE.

La inhibición de las levaduras permite mejorar la detección de las bacterias BLSE en extracciones polimicrobianas y la especificidad de su coloración.

5 6. Conclusión

Estos resultados demuestran que el medio según la invención permite el aislamiento y la identificación presunta de las bacterias productoras de BLSE, diferenciándolas de las cepas productoras de cefalosporinasa de alto nivel. La utilización de una bi-caja que contiene en un lado una cefalosporina sola, y en el otro una asociación cefalosporina/ácido clavulánico, en base CPS ID 3, es particularmente interesante.

Ejemplo 2

Este segundo ejemplo se basa en la detección fenotípica de BLSE utilizando la reducción de susceptibilidad a los antibióticos y la sensibilidad de Case HN a las concentraciones con tobramicina o cloxacilina o di-cloxacilina y presenta la utilización de una cefalosporina mencionada anteriormente (CTX, CAZ, CPD, CRO, ATM) en combinación con un compuesto que inhibe las cefalosporinasas (cloxacilina, di-cloxacilina y tobramicina). Tal medio permite la inhibición de las bacterias que tienen una cefalosporinasa "natural", teniendo la mayor parte de estas únicamente una cefalosporinasa de alto nivel (Case HN), permitiendo al mismo tiempo el crecimiento de las bacterias BLSE.

1. Elección de las cepas

En el ámbito de las manipulaciones efectuadas, para la evaluación de la actividad de los antibióticos activos sobre los bacilos gram-negativos, se han empleado diferentes especies de enterobacterias (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*) y de bacilos gram-negativos no fermentantes (*Pseudomonas aeruginosa*) susceptibles de producir BLSE. En los ensayos se comparan unas cepas BLSE positivas, unas cepas productoras de cefalosporinasa de alto nivel (Case HN) y unas cepas salvajes.

30 2. Preparación del medio

El medio utilizado era un medio CPS ID3 (43541) que comprende además

35 * ceftazidima a 2,5 mg/l y tobramicina a 2 mg/l (medio A) o

* ceftriaxona a 2 mg/l y cloxacilina a 150 mg/l (medio B) o

* cefpodoxima a 2 mg/l y di-cloxacilina a una concentración comprendida entre 500 y 1000 mg/l (medio C)

40 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).

45 Los medios se vierten después en cajas de 35 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.

50 3. Inoculación de los medios

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

4. Lectura de los medios

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

5. Resultados:

60 El medio A que comprende ceftazidima y tobramicina permitía la inhibición de todas las cepas salvajes y todas las Case Hn ensayadas. Sólo las cepas BLSE positivas estaban detectadas en este medio.

El medio B que comprende la ceftriaxona y la cloxacilina permitía inhibir todas las Case HN y todas las cepas salvajes salvo *P. aeruginosa* Case Hn y salvaje, y crecía sólo la mayoría de las cepas BLSE positivas.

65 El medio C que comprende la cefpodoxima y la di-cloxacilina permitía la inhibición de todas las cepas salvajes y la

mayoría de las Case HN sin afectar el crecimiento de las cepas BLSE positivas.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de un medio de cultivo para distinguir:

- 5
- un primer grupo de bacterias *E. coli* BLSE;
 - un segundo grupo de bacterias KESC BLSE;
 - un tercer grupo de bacterias no resistentes a las beta-lactaminas;

10 comprendiendo dicho medio de cultivo:

- un primer sustrato que permite la detección de una actividad enzimática beta-glucuronidasa o beta-galactosidasa;
- 15 • un segundo sustrato que permite la detección de una actividad beta-glucosidasa o triptofanasa o desaminasa;
- la cefpodoxima;
- la cloxacilina.

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

- un primer grupo de bacterias *E. coli* BLSE;
- 25 • un segundo grupo de bacterias KESC BLSE;
- un tercer grupo de bacterias, no resistentes a las beta-lactaminas y/o a las cefalosporinas;
- un cuarto grupo de bacterias *Proteeae* BLSE;

30 comprendiendo dicho medio de cultivo:

- un primer sustrato que permite la detección de una actividad enzimática beta-glucuronidasa o beta-galactosidasa;
- 35 • un segundo sustrato que permite la detección de una actividad beta-glucosidasa;
- la cefpodoxima,
- la cloxacilina,
- 40 • la vancomicina,
- la anfotericina B,
- 45 • un tercer sustrato que permite la detección de una actividad desaminasa.

3. Utilización de un medio de cultivo, según la reivindicación 2, comprendiendo además dicho medio de cultivo la cefsulodina.