(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 277 126**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/14 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA T5

(96) Número de solicitud europea: **03773805 .1**
(96) Fecha de presentación : **23.09.2003**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1543147**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **22.06.2005**

(54) Título: **Procedimiento para la detección de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina.**

(30) Prioridad: **23.09.2002 FR 02 11718**

(45) Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.07.2007**

(45) Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **11.05.2011**

(45) Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **11.05.2011**

(73) Titular/es: **Alain Rambach**
73 bld Montparnasse
F-75006 Paris, FR

(72) Inventor/es: **Rambach, Alain y**
Le Coustumier, Alain

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 277 126 T5

DESCRIPCIÓN

La invención se refiere a un nuevo medio gelificado para la detección de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, en el que están presentes un antibiótico seleccionado de entre el grupo de las cefalosporinas principalmente de segunda o tercera generación, y un agente cromógeno que presenta un cromóforo liberado después de la hidrólisis con una enzima activa en dichos *Staphylococcus aureus*.

La detección sistemática de los *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (escrita asimismo methicilina) (MRSA) es importante.

En efecto, aunque los MRSA no parecen más virulentos que los MSSA (Estafilococos dorados sensibles a la meticilina), sus infecciones son de tratamiento más difícil y costoso. Esto es debido a que la meti-resistencia confiere la resistencia a todas las beta-lactaminas y que esta resistencia está muy a menudo asociada a unas resistencias a numerosos otros antibióticos antiestafilococos mayores (Lyon t Skurry, Microbiol. Rev. 51; 88-134).

Para dicha detección a veces se han utilizado unos medios de crecimiento gelificados complementados con meticilina. Actualmente, dicho procedimientos se han abandonado a menudo porque detectan mal determinadas cepas MRSA, en particular de las cepas heterogéneas en las que unas poblaciones bacterianas contienen una proporción muy baja de bacterias claramente resistentes a la meticilina (en las que 1 bacteria de 10^4 ó 0^8 expresa la resistencia). Dicho procedimiento proporciona un número importante de resultados falsos negativos.

La utilización de medios de crecimiento gelificados suplementados con oxacilina es frecuente pero, como con la meticilina, determinadas cepas son difíciles de detectar.

Además, para que estos antibióticos (meticilina, oxacilina) funcionen de modo más o menos eficaz como suplementos selectivos, estamos obligados a utilizar determinados medios de crecimiento. En consecuencia, los medios propuestos al usuario son por ejemplo unos derivados del Agar Muller Hinton o del Mannitol Salt Agar. Desgraciadamente para el usuario, dichos medios son frecuentemente poco discriminatorios para la especie *S. aureus* lo que disminuye más la sensibilidad y la especificidad.

Se han propuesto unos medios de crecimiento gelificados suplementados con tobramicina o ofloxacino, ya sea en unas bases poco discriminatorias (derivados del Agar Salt Mannitol por ejemplo), o bien en la base muy discriminatoria del CHROMagar Staph aureus, pero la correlación con la resistencia a la meticilina es mediocre de ello un exceso de falsos positivos y de falsos negativos.

Se utiliza asimismo el método de difusión sobre gelatina, por ejemplo la gelatina Mueller Hinton, que consiste en depositar unos discos de papel impregnados de antibióticos sobre una gelatina sembrada con la bacteria que se va a estudiar. Se establece en la gelatina un gradiente de concentración de antibiótico alrededor de cada disco. Después de la incubación, se produce un halo de inhibición alrededor de cada disco que permite medir un diámetro, que refleja el valor de la CMI (concentración mínima de inhibición, concentración mínima para la que no se detecta ningún crecimiento de los microorganismos).

La presente invención se refiere a un medio de cultivo gelificado que permite detectar los *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, con una buena sensibilidad y una buena especificidad.

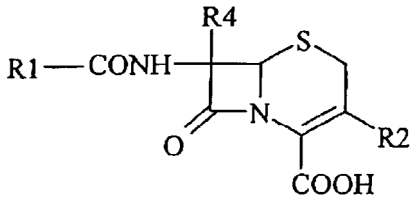
De este modo, en el marco de la presente invención, se utilizan las capacidades discriminatorias de los medios cromógenos, en combinación con las propiedades de los antibióticos de la familia de las cefalosporinas de 2ª o 3ª generación, que permiten detectar los microorganismos resistentes a la meticilina.

La invención se refiere por lo tanto a un medio de cultivo gelificado para la detección de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, que comprende además unos nutrientes que permiten el crecimiento de dichos *Staphylococcus aureus* a título de antibiótico, una cefalosporina seleccionada de entre el grupo constituido por la cefoxitina, el cefmetazol, el moxalactam y el flomoxefo y un agente cromógeno que libera un cromóforo después de la hidrólisis con una enzima activa en dichos *Staphylococcus aureus.*

Los medios de cultivo según la invención permiten una detección directa de los *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, en razón de su crecimiento sobre el medio según la invención y de la presencia del(los) agente(s) cromógeno(s), que permiten definir la naturaleza del microorganismo. Por lo tanto no se necesita ninguna etapa complementaria de confirmación de la naturaleza de los microorganismos que crecen sobre el medio según la invención.

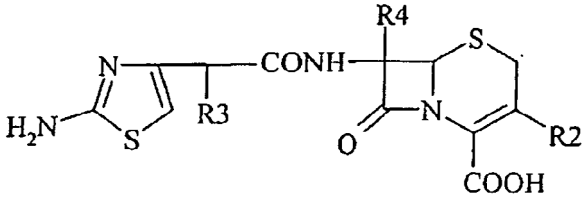
Los medios según la invención permiten la detección de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, a partir de un inóculo en estría sobre una placa, mientras que la mayoría de los procedimientos de la técnica anterior utilizan un depósito de aproximadamente 10^4 a 10^5 *Staphylococcus aureus* sobre la gelatina. Se pueden utilizar los medios según la invención directamente a partir de una extracción de un paciente, o después de una fase de enriquecimiento.

La cefalosporina utilizada en el medio de la invención es una cefalosporina de segunda o tercera generación, es decir un antibiótico de la familia de las cefalosporinas que presentan una fórmula derivada de la fórmula (I) siguiente:



en la que R2 es un grupo H, acetoximetilo, metiltiotetrazol, dimetil-amino-etil-tiotetrazol, triacina, acetaminopiridina (piridinio) o piridinio sustituido por un grupo carbamoilo, ciclo-pento-piridinio, tiometil-acetoxi-tiazol, R1 es un heterociclo amino-2-tiazol, una α-piperacina-diona, una α-sulfo-fenilo, y R4 es un grupo H o un radical α-metoxi.

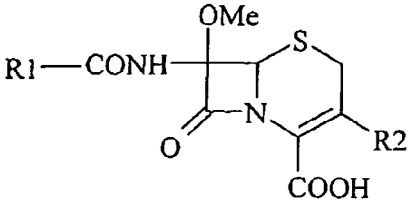
Dicha familiar comprende principalmente los compuestos que presentan la fórmula siguiente:



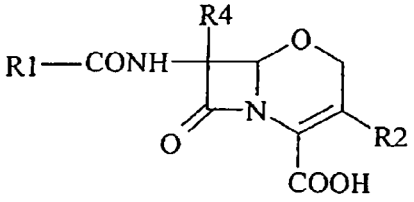
en la que R3 es un grupo H o un grupo α-metoxi-imino.

En un caso particular, el grupo R4 es un hidrógeno.

Las cefamicinas son unos compuestos en los que el grupo R4 es un radical α-metoxi, que protege el núcleo β-lactamo de la hidrólisis por las β-lactamasas y responden a la fórmula siguiente:



Los oxacefem son unos compuestos en los que el átomo de azufre del núcleo Cefem es sustituido por un átomo de oxígeno, y son considerados como derivados de la fórmula (I) presentada anteriormente.



En general, para dichos compuestos, el grupo R4 es un α-metoxi.

Una definición de cefalosporinas previstas de este modo se puede encontrar en Binger (Mécanisme d'Action des Bêta-lactamines, (de la structure bactérienne à la structure de la molécule)), 1986 Roussel (Paris) editor, capítulo III páginas 47-62, y capítulo IV páginas 63-68), y en la obra de Richmond (Beta-lactam antibiotics (the background to their use as therapeutic agents), Hoechst Aktiengesellschaft, D-6230 Frankfurt (Main) 80 editor, 1981, capítulo 3 páginas 55-65).

Además, hay que destacar que las cefalosporinas de segunda generación presentan un mejor efecto que las cefalosporinas de primera generación contra las bacterias Gram-negativas y resisten mejor la degradación por las β-lactamasas, las cefalosporinas de tercera generación que presentan un espectro de efecto todavía más amplio frente a las bacterias Gram-negativas.

De entre las cefalosporinas de segunda y tercera generación, se pueden citar: loracarbef, cefaclor, cefuroxima, cefprozil, cefoxitina (cefoxitano), cefamandol, cefotiam, cefotetan, cefmetazol, cefocinida, ceforanida, cefpodoxima, cefixima, cefotaxima, cefitizoxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefmenoxima, cefodizima, cefoperazona,

cefepima, cefpiroma, cefsulfónido, cefetamet, ceftibuteno, moxalactam, latamoxef y flomoxefo, principalmente en forma de sales (sódicas). El experto en la materia puede obtener unas listas de tales compuestos, principalmente en Internet en la página www.biam2.org o www.fpnotebook.com.

La concentración de antibiótico en el medio según la invención está comprendida preferentemente entre 0,5 y 50 mg/l, preferentemente 1,5 y 30 mg/l, en particular entre 1,5 y 15 mg/l. Algunos ensayos de rutina permiten al experto en la materia ajustar en función de la CMI (concentración mínima de inhibición, concentración mínima para la que no se detecta ningún crecimiento de los microorganismos) de los microorganismos considerados para el antibiótico considerado.

Hay que destacar que de entre los antibióticos susceptibles de entrar en la composición de un medio de la invención, algunos son capaces de conferir determinadas propiedades a dicho medio. Por ejemplo, la cefoxitina o el cefmetazol confieren una estabilidad particular, de por lo menos 2 meses a dicho medio.

Por ejemplo, se ha observado una estabilidad de por lo menos 2 meses para un medio según la invención preparado con la cefoxitina a una concentración de 5 mg/l, añadida al medio cuando éste se encuentra a una temperatura de 48ºC. La estabilidad del medio según la invención se ha elevado a por lo menos 5 meses cuando el mismo se ha preparado con cefmetazol a una concentración de 2,5 mg/l, añadido al medio cuando éste se encuentra a una temperatura de 48ºC.

Por "estabilidad del medio", se entiende que se define la capacidad del medio según la invención para permitir la detección selectiva de los *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, durante un tiempo determinado, con la misma fiabilidad durante toda la duración del periodo.

Asimismo hay que destacar que el flomoxef, presenta en cuanto a él la capacidad de conservar su actividad antibiótica cuando se somete a una temperatura superior a 100ºC (su resistencia también ha sido verificada por los inventores a una temperatura de 121ºC).

Tal propiedad permite realizar un medio según la invención en forma de un polvo único, lo que limita considerablemente las manipulaciones necesarias que se van a realizar en unas condiciones estériles para la preparación de cualquier medio de cultivo. El flomoxef se puede por lo tanto incorporar al medio en preparación antes del calentamiento lo que facilita la preparación. Dicha ventaja no debe ser desatendida porque es para facilitar la tarea de cualquier persona que debe preparar tales medios, sea cual sea su experiencia en la materia.

En una forma de realización preferida, dichos microorganismos son unos estafilococos, y se utiliza preferentemente un agente cromógeno seleccionado de entre el grupo constituido por el 5-bromo-6-cloro-3-indoxil fosfato y el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil glucósido, así como se ha descrito en la solicitud WO 00/53799.

Los medios de cultivo de *S. aureus* son conocidos y descritos principalmente en el manual "Oxoïd Unipath Limited", Wade Road, Basingstoke, Hampshire, RG24 OPW, Inglaterra. Se puede tratar, por ejemplo de "Nutrient Agar Oxoïd CM3", medio esencialmente a base de extractos de levadura, de peptona y de agar.

En una forma de realización preferida, dicho medio de cultivo contiene a la vez 5-bromo-6-cloro-3-indoxil fosfato y el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil glucósido.

Los medios según la presente invención contendrán, preferentemente, de 0,01 a 0,50 g/l, principalmente de 0,05 a 0,4 g/l de 5-bromo-6-cloro-3-indoxil fosfato, preferentemente de 0,01 a 0,20 g/l de 5-bromo-4-cloro-3-indoxil glucósido, preferentemente de 0,01 a 0,20 g/l de 5-bromo-4-cloro-3-indoxil galactósido, preferentemente de 0,01 a 0,20 g/l de 5-bromo-4-cloro-3-indoxil glucurónido.

En una forma de realización particular, el medio de cultivo según la invención presenta, además, por lo menos uno de los dos agentes cromógenos siguientes: 5-bromo-4-cloro-3-indoxil galactósido y 5-bromo-4-cloro-3-indoxil glucurónido.

En una forma de realización particular, dicho medio contiene además la deferoxamina. La deferoxamina permite en efecto inhibir *Staphylococcus epidermis* sin inhibir *Staphylococcus aureus*, la concentración utilizada estará comprendida preferentemente entre 0,01 y 0,10 g/l.

El medio puede contener asimismo un antibiótico glicopéptido seleccionado de entre el grupo constituido por la vancomicina, la teicoplamina y la avoparcina y sus mezclas. Con el fin de detectar los microorganismos resistentes a la vez a la meticilina y a la vancomicina, se puede utilizar aproximadamente de 5 mg/l a 50 mg/l de dichos antibióticos, más particularmente de 5 mg/l a 30 mg/l, de 10 mg/l a 30 mg/l, aproximadamente 25 mg/l.

En el marco de la presente invención, los inventores han demostrado que no es necesario tener una gran carga osmótica en el medio de cultivo. De este modo, contrariamente a los medios de detección de estafilococos dorados resistentes a la meticilina, que utilizan oxacilina como antibiótico, en los que se añade cloruro sódico, el medio de cultivo de la invención es asimismo funcional a una concentración de sodio inferior al 3% e igual a aproximadamente 2-2,5%. Las condiciones de incubación se pueden adaptar en función de la cantidad de cloruro sódico en el medio (duración de incubación, temperatura más o menos elevada…).

La invención se refiere asimismo a la utilización de un medio según la invención para la detección de microorganismos resistentes a la meticilina.

La invención se refiere asimismo a un procedimiento de detección de microorganismos resistentes a la meticilina en una muestra, que comprende las etapas que consisten en:

- inocular un medio según la invención con dicha muestra o un inóculo obtenido de dicha muestra,
- incubar dicho medio en unas condiciones que permiten el crecimiento de dichos microorganismos,
- detectar, sobre dicho medio, la presencia de dichos organismos resistentes a la meticilina, mediante la presencia de colonias coloreadas.

Las condiciones de incubación son conocidas por el experto en la materia y se utiliza generalmente una incubación a unas temperaturas comprendidas entre 25ºC y 42ºC, preferentemente entre 30ºC y 38ºC.

Las duraciones de las incubaciones son las clásicas (aproximadamente 24 horas).

Según el microorganismo considerado, se puede utilizar una duración de incubación más corta o más larga, trabajar en unas condiciones aerobias o anaerobias…

El medio según la invención permite principalmente detectar fácilmente los estafilococos resistentes a la meticilina, reduciendo el tiempo de análisis. La combinación de los antibióticos seleccionados en el marco de la invención y de los agentes cromógenos permite en efecto reducir el número de falsos positivos y de los falsos negativos y reducir de este modo la necesidad de realizar unos análisis complementarios.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Composición de un medio según la invención para la detección de *S. aureus* resistentes a la meticilina

Peptona y extracto de levadura	40 g/l
NaCl	25 g/l
5-bromo-6-cloro-3-indoxil fosfato	0,10 g/l
5-bromo-4-cloro-3-indoxil glucósido	0,05 g/l
5-bromo-4-cloro-3-indoxil galactósido	0,05 g/l
5-bromo-4-cloro-3-indoxil glucorónido	0,05 g/l
Deferoxamina	0,050 g/l
Agar	15 g/l

Se añade, en dicho medio, oxacilina (6 mg/ml) o cefoxitina (5 mg/l), después de autoclavado, antes de que el medio sea sólido (cuando se encuentra a una temperatura de aproximadamente 45ºC).

Dicho medio contiene 5-bromo-6-cloro-3-indoxil fosfato y 5-bromo-4-cloro-3-indoxil glucósido, que permite la detección específica de los estafilococos dorados (coloración lila de las colonias), así como 5-bromo-4-cloro-3-indoxil galactósido y 5-bromo-4-cloro-3-indoxil glucurónido, para colorear los otros microorganismos que pueden estar presentes en el inóculo.

EJEMPLO 2

Estudio del crecimiento de cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina en el medio CHROMagar Staph aureus (disponible en la compañía CHROMagar, 4, Place du 18 Juin 1940, 75006 Paris Francia):

AR4295 MetiS: cepa sensible a la meticilina

AR4297 MetiR: cepa resistente a la meticilina (homogénea)

MRhet: cepa resistente a la meticilina (heterogénea)

Z252: cepa resistente a la meticilina, homogénea, nivel de resistencia bajo.

	AR 4295 MetiS	AR4297 MetiR	MRhet	Z252
CHROMagar Staph aureus	+	+	+	+
CHROMagar Staph aureus + oxacilina 6 mg/ml	-	+/-	-	-
CHROMagar Staph aureus + cefoxitina 5 mg/l	-	+	+	+

+ = crecimiento de colonias; - = no hay crecimiento; * = microcolonias

Se inocula las placas de Petri con unos cultivos bacterianos estriando las placas, para observar el crecimiento de bacterias aisladas, después de incubación a una temperatura de 37ºC durante 24 horas.

Las bacterias que crecen proporcionan unas colonias lilas sobre el medio de cultivo, que confirman que los microorganismos son unos estafilococos dorados.

De esta manera, el medio según la invención permite detectar directamente los estafilococos dorados resistentes a la meticilina, comprendiendo las cepas heterogéneas o bien a un nivel bajo de resistencia, de la combinación del crecimiento de las bacterias y de la coloración de las colonias.

REIVINDICACIONES

1. Medio de cultivo gelificado para la detección de los *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, que comprende, además de los nutrientes que permiten el crecimiento de dichos *Staphylococcus aureus*:

- a título de antibiótico: una cefalosporina seleccionada de entre el grupo constituido por la cefoxitina, el cefmetazol, el moxalactam y el flomoxefo, y
- un agente cromógeno que libera un cromóforo después de la hidrólisis con una enzima activa en dichos *Staphylococcus aureus.*

2. Medio según la reivindicación 1, en el que dicho agente cromógeno es el 5-bromo-6-cloro-3-indoxil fosfato.

3. Medio según una de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque contiene 5-bromo-6-cloro-3-indoxil fosfato y 5-bromo-4-cloro-3-indoxil glucósido.

4. Medio según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque comprende, además, por lo menos uno de los dos agentes cromógenos siguientes: 5-bromo-4-cloro-3-indoxil galactósido y 5-bromo-4-cloro-3-indoxil glucurónido.

5. Medio según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la concentración en cloruro sódico es inferior al 3%.

6. Medio según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la concentración en antibiótico está comprendida entre 0,5 y 50 mg/l.

7. Medio según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la concentración de un agente cromógeno está comprendida entre 0,01 y 0,5 g/l.

8. Utilización de un medio según una de las reivindicaciones 1 a 7, para la detección de los *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina.

9. Procedimiento para la detección de los *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina en una muestra, que comprende las etapas que consisten en:

- inocular un medio según una de las reivindicaciones 1 a 7 con dicha muestra o un inóculo obtenido de dicha muestra,
- incubar dicho medio en unas condiciones que permiten el crecimiento de dichos *Staphylococcus aureus*,
- detectar, sobre dicho medio, la presencia de dichos *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, mediante la presencia de colonias coloreadas.