



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 200 321**

⑤① Int. Cl. 7: **C12Q 1/00**

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud: **98910425 .2**

⑧⑥ Fecha de presentación: **16.03.1998**

⑧⑦ Número de presentación de la solicitud: **0925369**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.1999**

⑤④ Título: **Sistemas de ensayo universales y procedimientos de uso de los mismos para identificar varias familias de microorganismos.**

③⑩ Prioridad: **10.04.1997 US 843634**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2004

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2004

⑦③ Titular/es: **Dade Microsan Inc.**
1584 Enterprise Boulevard
West Sacramento, California 95691, US

⑦② Inventor/es: **Godsey, James, H. y**
Nothhaft, Daniel, M.

⑦④ Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 200 321 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

Sistemas de ensayo universales y procedimientos de uso de los mismos para identificar varias familias de microorganismos.

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a sistemas de ensayo universales y a los procedimientos de uso de los mismos para determinar la identidad de un microorganismo que puede pertenecer a uno cualquiera de los múltiples grupos de microorganismos divergentes, por ejemplo, anaerobios, levaduras, patógenos, entéricos, estafilococos, estreptococos, y enterococos, entre los microorganismos de diversos grupos o familias. Los sistemas de ensayo de la presente invención comprenden una sola batería de ensayos predeterminados para detectar la presencia de enzimas únicas para una familia o grupos de microorganismos, género y/o especies.

15 **Antecedentes de la invención**

El desarrollo de métodos para clasificar o identificar bacterias ha sido una meta constante de la comunidad dedicada al estudio microbiológico desde el mismo comienzo de la disciplina de la microbiología. Los primeros métodos de clasificación se basaron en el examen microscópico de los microorganismos y la descripción subsiguiente de su morfología celular, es decir, células con forma de cocos, células con forma cilíndrica (bacilos), células con forma de cocobacilo, levaduras en germinación, y espiroquetas. Los microbiólogos describieron también sus observaciones microscópicas de agrupaciones celulares de microorganismos como un medio adicional de categorizar microorganismos, por ejemplo, estreptococos refiriéndose a una cadena de células con forma de coco que parecen una hilera de perlas, estafilococos refiriéndose a una agrupación de células con forma de coco que recuerdan un racimo de uvas, etc. Más tarde se desarrollaron tinciones para aumentar las capacidades de diferenciación del microscopio. La más importante de éstas fue la tinción de Gram, que dividió los microorganismos en dos grupos: microorganismos gram negativos que se tiñen de rosa a rojo, y microorganismos gram positivos que se tiñen de azul claro a azul. Subsiguientemente se observó que entre los microorganismos que causan enfermedades humanas, la mayoría de los microorganismos gram negativos tenían forma cilíndrica, y la mayoría de los microorganismos gram positivos tenían forma de coco. Otro de los primeros medios para diferenciar microorganismos fue determinar la capacidad del microorganismo para crecer en presencia o ausencia de oxígeno. Los microorganismos que crecen en presencia de oxígeno se llaman aerobios, y aquellos que crecen en ausencia de oxígeno se llaman anaerobios.

Uno de los primeros descubrimientos más importantes en microbiología de diagnóstico fue la capacidad para crecer bacterias en tubos de ensayo o en placas petri usando diferentes tipos de medios de crecimiento bacteriológico líquidos o sólidos. Posteriormente los microbiólogos empezaron a añadir diversos productos químicos a los medios de crecimiento para desarrollar medios adicionales de diferenciación entre los microorganismos tales como los ensayos de crecimiento o de inhibición del crecimiento, por ejemplo, NaCl al 6,5% inhibe el crecimiento de los estreptococos pero no de los enterococos, o ensayos bioquímicos, por ejemplo, las bacterias entéricas fermentan la glucosa para dar lugar a productos finales ácidos, mientras que las bacterias no fermentativas no lo hacen.

La combinación de todos los ensayos bioquímicos, de crecimiento/inhibición y morfológicos mencionados antes en una batería de ensayos disponible para los microbiólogos para clasificar bacterias condujo al desarrollo de medios de clasificación de las bacterias en las entidades taxonómicas tradicionales de familia, género, especie, utilizadas para clasificar todos los seres vivos. Históricamente, el enfoque de los microbiólogos ha sido desarrollar baterías de ensayos de clasificación que se aplican sólo a un grupo o familia de microorganismos, por ejemplo, el esquema de Facklam para identificar estreptococos *viridans* (Ref. 3), el esquema de Kloos y Schleifer para identificar estafilococos coagulasa negativos (Ref. 2), el esquema de Edwards y Ewing para identificar gérmenes entéricos gram negativos (Ref. 1), etc. Cada uno de estos esquemas usa formulaciones de ensayo que se diseñaron especialmente para el metabolismo y características de crecimiento de la familia de microorganismos a las que se dirige el esquema. Así, un ensayo de fermentación de glucosa para estreptococos se formula de manera diferente que un ensayo de fermentación de glucosa para microorganismos entéricos. De hecho, los proveedores comerciales de medios bacteriológicos preparados proporcionan las formulaciones específicas de familia anteriores en una base comercial. El catálogo Remel (12076 Santa Fe Drive, Lenexa, Kansas 66215-3594) número 103 (Enero de 1994), ofrece a los microbiólogos una amplia variedad de formulaciones bioquímicas en tubo convencionales con las que llevar a cabo los esquemas de identificación a los que se hace alusión antes. El catálogo Remel ofrece específicamente ocho (8) formulaciones de medios diferentes para detectar la fermentación de carbohidratos por siete (7) familias diferentes de microorganismos. Estos son, como sigue: el caldo púrpura se usa para analizar organismos entéricos (páginas 40-41), el caldo de rojo fenol se usa para analizar estreptococos (véanse las páginas 38-39), el medio P.R.A.S. y el medio CHO se usan para analizar anaerobios (véanse las páginas 29-30, y 40), el medio CTA y el caldo de infusión de corazón se usan para analizar microorganismos patógenos (véanse las páginas 30-31, y 33), el medio OF se usa para analizar bacilos Gram negativos y gérmenes entéricos no fermentativos (véanse las páginas 37-38), y el caldo de fermentación de levaduras se usa para analizar levaduras (véanse las páginas 47-48).

65

ES 2 200 321 T3

Referencias

1. **Ewing**, W.H., 1986, "Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae", 4ª ed., *Elsevier Science Publishing Co.*, New York.

2. **Kloose**, W.E., y K.H. Schleifer, 1975, "Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species", *J. Clin. Microbiol.*, 1:82-88.

3. **Facklan**, R.R., y J.A. Washington II, 1991, "*Streptococcus* and related catalase-negative gram-positive cocci", p. 238-257, "*Manual of Clinical Microbiology*", A. Barlows, W.J. Hausler, Jr., K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, y H.J. Shadome (ed.), 5ª ed., American Society for Microbiology, Washington, DC.

Comenzando al final de los años 1960 con la introducción por Roche Diagnostic's (1447 York Court, Burlington, NC 27215) del sistema de identificación de enterotubo para bacterias entéricas, y seguido rápidamente por el lanzamiento del sistema de identificación entérico 20E de API (595 Anglum Drive, Hazelwood, MO 63042-2395), las compañías de diagnóstico empezaron a adoptar este mismo fundamento para el desarrollo y fabricación de kits comerciales de identificación de bacterias. Vitek, MicroScan, IDS (Innovative Diagnostic Systems, 2797 Peterson Place, Norcross, GA 30071), y API ofrecen cada uno un producto específico de familia para identificar cada familia o grupo de bacterias. (Véase la Tabla I a continuación).

TABLA I

Microorganismo	MicroScan	IDS	Vitek	API
Enterobacteriaceas	MicroScan Dry Overnight Gram-negative ID Panel	IDS RapID onE	Vitek GNI card	API 20E
Estafilococos	MicroScan Overnight Dry Gram-positive ID Panel		Vitek GPI card	API StaphIdent; API UniScept 20GP; API STAPH
Estreptococos	MicroScan Overnight Dry Gram-positive ID Panel MicroScan	IDS RapID STR	Vitek GPI card	API 20S; API Uniscept 20GP
Anaerobios	MicroScan Rapid Anaerobe Panel	IDS RapID Ana		API 20A; API AnIdent
Levaduras	MicroScan Rapid Yeast ID Panel	IDS RapID Yeast Panel	Vitek YBC card	API 20C
Patógenos	MicroScan HNID	IDS RapID NH	Vitek NHI	API QuadFerm

La historia ha enseñado a los microbiólogos que la identificación de aislados clínicos o cepas de microorganismos que pertenecen a diferentes familias de bacterias requiere el uso de diferentes esquemas bioquímicos de tubo convencionales o de diferentes productos comerciales. Todos los ensayos bioquímicos tradicionales se basan en el crecimiento como medio para amplificar el número de células e inducir ciertas enzimas. La necesidad de optimizar la fórmula de ensayo a las características de crecimiento de familias individuales de bacterias es la base del enfoque histórico de los ensayos específicos de familia (ensayos bioquímicos en tubo tradicionales o kits comerciales). Por ejemplo, en la descripción anterior de los ensayos bioquímicos convencionales, hay ocho formulaciones diferentes para la fermentación de glucosa, formuladas para reaccionar específicamente con siete familias diferentes de microorganismos. Debido a que los ensayos bioquímicos convencionales dependen en su mayor parte del crecimiento, cada reacción de fermentación de glucosa se ha optimizado para el crecimiento de una familia concreta de microorganismos y para la detección de la fermentación de la glucosa por esa familia de microorganismos. Esta práctica se prorrogó mediante los sistemas de identificación bioquímicos comerciales, en los que hay diferentes productos de identificación bioquímica (véase la lista anterior) para cada una de las diferentes familias o grupos de microorganismos. El desarrollo de clases de productos específicos de grupo es tanto un reflejo de la necesidad de desarrollar formulaciones basadas en las características de crecimiento específicas de un grupo o familia como de optimizar la reactividad de un sustrato para el metabolismo de cada familia o grupo de microorganismos. Cuando las compañías de diagnóstico empezaron el desarrollo de ensayos de identificación rápida que utilizaban ensayos convencionales cromogénicos, fluorogénicos o rápidos detectados colorimétricamente o fluorimétricamente, continuó el formato del producto específico de familia,

incluso aunque la dependencia del crecimiento estuviera enormemente disminuida. Estos nuevos sistemas ID rápidos eran independientes del crecimiento más que dependientes del crecimiento. Estos analizaban enzimas preformadas presentes en suspensiones más densas de bacterias que las usadas en los sistemas basados en el crecimiento.

5 El documento EP-A0018825 describe un procedimiento para la identificación de bacterias, especialmente *Escherichia*, *Klebsiella* spp., *Proteus* y *Pseudomonas* spp. Que comprende someter a la bacteria una combinación de ensayos para la determinación de enzimas bacterianas, especialmente fosfatasa ácida, β -galactosidasa, glutamato descarboxilasa, fenilalanina desaminasa, citocromo oxidasa, enzimas productoras de diacetilo y ureasa.

10 De acuerdo con esto, sería deseable tener un sistema de ensayo universal para clasificar y/o identificar un microorganismo perteneciente a uno cualquiera de los múltiples grupos divergentes de microorganismos, tales como al usar una batería única de ensayos bioquímicos, evitando así el uso de baterías múltiples de ensayos o kits comerciales de ensayo, en el que cada batería o combinación de ensayo está adaptada a grupos o familias específicos de microorganismos.

15 Sumario de la invención

La presente invención crea por primera vez la capacidad de identificar un microorganismo que pertenece a uno cualquiera de los grupos de microorganismos ampliamente divergentes usando una única batería de ensayos bioquímicos, cada una con una formulación universal única.

Este formato "universal" proporciona sistemas de identificación bioquímica universales que producen resultados de identificación en un tiempo de incubación tan corto como 15 minutos, o hasta 8 horas (un único equipo de trabajo). Los ensayos pueden ser de naturaleza cromogénica/colorimétrica o fluorogénica/fluorométrica, y pueden leerse visual o automáticamente. Una base de datos (matriz de probabilidad) usada para clasificar e identificar los microorganismos comprende tanto una sola base de datos que comprende los miembros de todas las familias a identificar, o series de sub-bases de datos que son específicas para cada familia. A esta matriz de probabilidad algunas veces de aquí en adelante se le denomina estándar predeterminado. Una ventaja del presente sistema para el usuario es que se necesita aprender sólo cómo usar una única metodología de ensayo para la mayoría de sus necesidades de identificación de microorganismos.

30 En segundo lugar, el usuario sólo necesita encargar e inventariar un único ensayo de diagnóstico, en vez de manejar un inventario de múltiples productos para la mayoría de sus necesidades de identificación de microorganismos.

La presente invención se refiere a baterías únicas (universales) de ensayos bioquímicos, es decir, sistemas de ensayo, para identificar un microorganismo que pertenece a uno cualquiera de un número de grupos de microorganismos ampliamente divergentes. La clasificación de un microorganismo particular en uno de estos grupos ampliamente divergentes se basa en gran medida en los requerimientos de crecimiento de estos microorganismos en particular. Por ejemplo, los estafilococos, estreptococos y enterococos tienen requerimientos de crecimiento similares, como los tienen los entéricos y los no fermentativos. En el pasado se han detectado grupos divergentes de microorganismos observando el crecimiento en formulaciones bioquímicas bien conocidas asociadas específicamente a una familia o grupo (por ejemplo, medios de crecimiento específicos para levaduras, bacterias anaerobias; o bacterias patógenas, etc.). Los ejemplos de grupos o familias de microorganismos ampliamente divergentes comprenden (i) levaduras y bacterias anaerobias; (ii) levaduras y *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., y/o *Enterococcus* sp; (iii) levaduras y bacterias entéricas; (iv) levaduras, bacterias anaerobias y bacterias patógenas; (v) bacterias y levaduras patógenas; y (vi) bacterias anerobias y bacterias patógenas. Los ejemplos de grupos o familias de microorganismos no divergentes comprenden, por ejemplo, (i) bacterias entéricas y no fermentativas; (ii) *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., y *Enterococcus* sp; y (iii) *Neisseria* y *Haemophilus*.

Esta invención, por tanto, proporcionan un sistema de ensayo para identificar un microorganismo en una muestra, siendo capaz el sistema de ensayo de identificar ese microorganismo entre grupos de microorganismos ampliamente divergentes que comprenden levaduras y al menos uno de:

- i) bacterias anaerobias,
- ii) bacterias entéricas,
- 55 iii) el grupo de bacterias gram positivas,
- iv) *Neisseria* y *Haemophilus*, o
- 60 v) bacterias patógenas,

que pueden estar presentes en dicha muestra y comprendiendo el sistema de ensayo: una combinación predeterminada de ensayos bioquímicos no redundantes dispuestos en un número predeterminado de cámaras de reacción, en la que cada ensayo bioquímico comprende un sustrato para una enzima o grupo de enzimas, y en la que además, si actúa la enzima o grupo de enzimas, el sustrato da como resultado la formación de un producto detectable en la cámara de reacción, y en la que los productos detectables de la combinación de ensayos bioquímicos se usan para identificar al microorganismo en la muestra.

ES 2 200 321 T3

Se pueden encontrar ejemplos de microorganismos que pertenecen a cada uno de estos grupos ampliamente divergentes, en las Tablas II y IV más adelante. Los microorganismos se añaden y se borran de tales grupos de tiempo en tiempo al igual que se cambian de un grupo a otro o se les da un nuevo nombre. Los sistemas de ensayo de la presente invención se aplican a estos grupos.

5

TABLA II
Grupo HNID

10

<i>Gardnerella vaginalis</i>
<i>Haemophilus haemolyticus</i>
<i>H. influ Grp I</i>
<i>H. influ Grp II</i>
<i>H. influ Grp III</i>
<i>H. influ Grp IV</i>
<i>H. influ Grp V</i>
<i>H. influ Grp VI</i>
<i>H. influ Grp VII</i>
<i>H. p influ Gr I</i>
<i>H. p influ Gr II</i>
<i>H. p influ Gr III</i>
<i>H. p influ Gr IV</i>
<i>H. para/aphro</i>
<i>H. segnis</i>
<i>Branhamella catarrhalis</i>
<i>Neisseria cinerea</i>
<i>N. flavescens</i>
<i>N. gonorrhoeae</i>
<i>N.lactamica</i>
<i>N.meningitidis</i>
<i>N. mucosa</i>
<i>N. sp</i>
<i>N. sicca</i>
<i>N. Subflava</i>

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 200 321 T3

TABLA III
Grupo Levaduras

5	<i>Blastoschizomyces capitatus</i>	<i>Cr. neoformans</i>
	<i>Candida albicans</i>	<i>Cr. terreus</i>
10	<i>C. catenulata</i>	<i>Cr. uniguttulatus</i>
	<i>C. guilliermondii</i>	<i>Geotrichum sp</i>
	<i>C. humicola</i>	<i>Hansenula anomala</i>
15	<i>C. krusei</i>	<i>H. polymorpha</i>
	<i>C. limbica</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
20	<i>C. lipolytica</i>	<i>Pichia farinosa</i>
	<i>C. lusitaniae</i>	<i>Prototheca wickerhamii</i>
	<i>C. parapsilosis</i>	<i>Pr. Sp</i>
25	<i>C. pseudotropical</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
	<i>C. rugosa</i>	<i>R. minuta</i>
30	<i>C. stellatoidea</i>	<i>R. rubra</i>
	<i>C. tropicalis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	<i>C. tropicales (sn)</i>	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>
35	<i>C. viswanathii</i>	<i>Torulopsis candida</i>
	<i>C. zeylanoides</i>	<i>T. glabrata</i>
40	<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>T. inconspicua</i>
	<i>Cr. ater</i>	<i>T. pintolopesii</i>
	<i>Cr. gastricus</i>	<i>Tricosporou beigeli</i>
45	<i>Cr. laurentii</i>	
	<i>Cr. melibiosum</i>	

TABLA IV
Grupo gram positivo

55	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
	<i>Micrococcus kristinae</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>Ec avium</i>
60	<i>M. luteus</i>	<i>S. schleiferi</i>	<i>Ec. faecalis</i>
	<i>M. lylae</i>	<i>S. sciuri</i>	<i>Ec. facecium</i>
	<i>M. roseus</i>	<i>S. simulans</i>	<i>Ec. gallinarum</i>
65	<i>M. sedentarius</i>	<i>S. warneri</i>	<i>Ec. hira</i>
	<i>M. varians</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>Ec. mundtii</i>

ES 2 200 321 T3

TABLA IV (continuación)

5	<i>Pedlococcus sp</i>	<i>Aero viridans</i>	<i>Ec. raffinusus</i>
	<i>Staphylococcus arlettae</i>	<i>G. morbillorum</i>	<i>Ec. solitarius</i>
	<i>S. auricularis</i>	<i>Streptococcus agalact-Gp B</i>	
10	<i>S. capitis</i>	<i>St. anginosus grp</i>	
	<i>S. caprae</i>	<i>St. bovis</i>	
	<i>S. carnosus</i>	<i>St. equinus</i>	
15	<i>S. caseolyticus</i>	<i>St. equisimilis</i>	
	<i>S. chromogenes</i>	<i>St. mitis grp</i>	
20	<i>S. cohnii</i>	<i>St. mutans</i>	
	<i>S. epidermidis</i>	<i>St. pneumoniae</i>	
	<i>S. equorum</i>	<i>St. pyogenes</i>	
25	<i>S. gallinarum</i>	<i>St. salivarus</i>	
	<i>S. haemolyticus</i>	<i>St. sanguis I</i>	
30	<i>S. hominis</i>	<i>St. zooepidemicus</i>	
	<i>S. hyicus/chromo</i>		
	<i>S. hyicus hyicus</i>		
35	<i>S. intermedius</i>		
	<i>S. kloosii</i>		
40	<i>S. lentus</i>		

TABLA V

Grupo Anaerobio

	Bacilos gram negativos	Clostridios	Bacilos gram positivos	Cocos
50	<i>Bacteroides distasonis</i>	<i>Clostridium barati</i>	<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Acidaminococcus fermentans</i>
	<i>Bac. eggerthii</i>	<i>C. bifermentans</i>	<i>Act. odontolytic</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
55	<i>Bac. fragilis</i>	<i>C. butyricum</i>	<i>Act. viscosus</i>	<i>Ps. asaccharolyt</i>
	<i>Bac. ovatus</i>	<i>C. cadaveris</i>	<i>Bifidobacterium dentium</i>	<i>Ps. magnus</i>
60	<i>Bac. thetanota</i>	<i>C. clostridioform</i>	<i>Eubacterium lentum</i>	<i>Ps. prevotii</i>
	<i>Bac. uniformis</i>	<i>C. difficile</i>	<i>Eub. limosum</i>	<i>Ps. tetradius</i>
65	<i>Bac. ureolyticus</i>	<i>C. histolyticum</i>	<i>Lactobacillus sp</i>	<i>Staphylococcus saccharolyt</i>

ES 2 200 321 T3

TABLA V (continuación)

5	Bacilos gram negativos	Clostridios	Bacilos gram positivos	Cocos
	<i>Bac. vulgatus</i>	<i>C. innocuum</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Veillonella parvula</i>
10	<i>Bac. splanchnicus</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>Prop. granulosum</i>	
	<i>Bifidobacterium dentium</i>	<i>C. ramosum</i>		
15	<i>Capnocytopha sp</i>	<i>C. septicum</i>		
	<i>Fusobacterium mortiferum</i>	<i>C. sordellii</i>		
20	<i>Fuso necrophorum</i>	<i>C. sporogenes</i>		
	<i>Fuso.n nucleatum</i>	<i>C. subterminale</i>		
25	<i>Fuso. varium</i>	<i>C. tertium</i>		
	<i>Porphyromonas asaccharolyt</i>	<i>C. tetani</i>		
30	<i>Por. gingivalis</i>			
	<i>Prevotella bivia</i>			
	<i>Pre. buccae</i>			
35	<i>Pre. corporis</i>			
	<i>Pre. disiens</i>			
40	<i>Pre. melaninogen</i>			
	<i>Pre. oralis</i>			

45 Los procedimientos de la presente invención comprenden someter una muestra a una única batería de ensayos bioquímicos predeterminados para detectar la presencia de al menos una enzima y/o grupos de enzimas en una ruta metabólica, únicas para una familia de microorganismos, género y/o especie con el fin de identificar el microorganismo. De aquí en adelante, algunas veces una combinación de ensayos o un sistema de ensayo se denomina batería de ensayos. La muestra, de la forma en la que se usa aquí, incluye una suspensión de un microorganismo derivada de una colonia crecida en un medio selectivo o no selectivo, más preferiblemente una suspensión de un cultivo sustancialmente puro.

55 Los sistemas de ensayo de la presente invención comprenden una pluralidad de cámaras de reacción para llevar a cabo los ensayos bioquímicos, comprendiendo cada cámara de reacción un sustrato para al menos una enzima, dando como resultado el sustrato, si la enzima(s) actúa sobre él, la formación de un producto detectable en la cámara de reacción y estando relacionado los productos detectables en la combinación de ensayos se relacionan con la identidad de un microorganismo en una muestra.

60 En las realizaciones preferidas las cámaras de reacción se disponen en un único emplazamiento, por ejemplo una placa de microtitulación que se denomina aquí como "panel". El número de cámaras de reacción en el panel puede variar dependiendo de la aplicación concreta. Las cámaras de reacción están abiertas o cubiertas, según se desee.

65 Así, en un aspecto, la presente invención proporciona un sistema de ensayo universal y procedimientos para usar el sistema de ensayo, para proporcionar una batería única de ensayos bioquímicos predeterminados para identificar un microorganismo que pertenece a uno cualquiera de los múltiples grupos de microorganismos ampliamente divergentes. El microorganismo se clasifica preferiblemente en géneros discretos y más preferiblemente, en especies discretas.

En una realización preferida el sistema de ensayo universal comprende al menos un panel que tiene dispuestas

ES 2 200 321 T3

en él una pluralidad de cámaras de reacción, por ejemplo, pocillos, que contienen un sustrato para al menos una enzima y otros componentes para el ensayo. En una realización preferida la combinación única de ensayos bioquímicos predeterminados se lleva a cabo usando un panel universal único de ensayos que contiene un máximo de hasta aproximadamente 60, más preferiblemente entre aproximadamente 36 a 48 cámaras de reacción. En una realización particularmente preferida los pocillos se disponen en tiras lineales en el panel de ensayo para facilitar el uso de los métodos preferidos de manejo de datos, visualización, y muestreo semi- o totalmente automatizado.

Generalmente una batería de ensayos bioquímicos adecuada para uso en el sistema de ensayo universal de la presente invención se selecciona usando técnicas estadísticas conocidas para identificar una batería de ensayos capaz de identificar las múltiples familias de microorganismos deseadas. Luego se construyen diferentes bases de datos. Los diferentes grupos de bases de datos se evalúan después usando técnicas estadísticas bien conocidas. Una de tales técnicas estadísticas se describe más adelante en el Ejemplo 3. La base de datos (matriz de probabilidad) o estándar predeterminado usado para identificar los microorganismos comprende bien una sola base de datos que comprende los miembros de todos los grupos a identificar, o una serie de sub-bases de datos que son específicas para cada grupo. Como se mencionó previamente, las mayores ventajas de este sistema para el usuario es que necesita aprender cómo usar sólo una única metodología de ensayo para la mayoría de sus necesidades de identificación de microorganismos y sólo encargar e inventariar un único ensayo de diagnóstico en vez de manejar el inventario de múltiples productos para la mayoría de sus necesidades de identificación de microorganismos.

En la realización descrita antes la base de datos única o la serie de sub- bases de datos, es decir, la matriz de probabilidad se usa como el estándar predeterminado frente al cual se comparan los resultados del sistema de ensayo (panel) para identificar el microorganismo de una muestra. Véase Ejemplo 3. Preferiblemente el estándar predeterminado se genera a partir de los datos obtenidos usando técnicas espectroscópicas o fluorométricas. Sin embargo, el estándar predeterminado se puede desarrollar también usando datos obtenidos mediante una inspección visual de los ensayos colorimétricos.

En la técnica se conocen una variedad de ensayos bioquímicos para la identificación de enzimas microbianas. La mayoría de estos ensayos se pueden adaptar para uso en el sistema de ensayo universal de la presente invención.

Los sistemas de ensayo universales de la presente invención comprenden ensayos basados en la fluorescencia o ensayos basados en la colorimetría o alguna combinación de ambos. Por ejemplo, debido a una sensibilidad y velocidad mayores, se prefieren los ensayos basados en la fluorescencia respecto a los ensayos colorimétricos (cromogénicos) en el sistema de ensayo universal de la presente invención. Sin embargo, en otros ensayos en el sistema de ensayo universal se prefieren ensayos basados en la colorimetría debido a una mayor conveniencia tal como una interpretación visual del ensayo.

Así, en una realización preferida de la presente invención el sistema de ensayo universal es capaz de identificar un microorganismo de múltiples grupos de microorganismos usando una única batería de ensayos bioquímicos predeterminados, en la que la mayoría de los ensayos están en un formato basado en la fluorescencia. En esta realización la presencia de enzimas y/o grupos de enzimas en una ruta se detecta determinando la presencia de un producto fluorescente detectable. En algunos casos la formación del producto fluorescente es el resultado de un cambio en el pH causado por reacción de la enzima con un sustrato (ensayo fluorométrico). En otros casos la formación del producto fluorescente se acompaña de la escisión de un sustrato fluorogénico (por ejemplo por hidrólisis) para formar un derivado fluoróforo detectable que normalmente exhibe una fluorescencia aumentada (ensayo fluorogénico). En otros casos más, se forma un producto cromogénico que neutraliza un indicador fluorescente.

Los resultados de la batería de ensayos predeterminados se someten a varias metodologías estadísticas con el fin de identificar los microorganismos en la muestra, es decir, comparados con al menos un estándar predeterminado. Véase el Ejemplo 3.

En una realización preferida el producto fluorescente detectable se forma en una o más de las baterías de ensayos predeterminadas por inmovilización de al menos un sustrato fluorogénico (por ejemplo por hidrólisis) para formar un derivado fluorescente con fluorescencia aumentada. En una realización preferida particularmente, del sistema de ensayo universal, los ensayos de esterasa, peptidasa y glucosidasa se llevan a cabo preferiblemente en un formato fluorogénico.

En otra realización preferida, el producto detectable por fluorescencia en uno o más de los ensayos bioquímicos se forma mediante un indicador fluorométrico en presencia de la enzima de reacción. Generalmente el indicador fluorométrico es un compuesto sensible al pH capaz de exhibir un cambio en la fluorescencia. Particularmente el indicador fluorométrico sufre un aumento en la fluorescencia en presencia de un aumento (alcalinización) o descenso (acidificación) del pH. En una realización particularmente preferida del sistema de ensayo universal los ensayos de enzima de fermentación de un azúcar, ureasa, descarboxilasa, y enzima de utilización de carbono se hacen en un formato fluorométrico.

La presente invención proporciona también por primera vez ensayos de enzimas de utilización de carbono en un formato fluorométrico en. En esta realización, el ensayo enzimático comprende al menos un sustrato para una enzima

ES 2 200 321 T3

de utilización de carbono y al menos un indicador fluorométrico. La enzima de utilización de carbono, si está presente, actúa sobre el sustrato y produce un cambio en el pH que forma un producto fluorescente a partir del indicador fluorométrico.

5 En algunas realizaciones el sistema de ensayo universal de la presente invención comprende al menos un ensayo bioquímico de base colorimétrica. El ensayo colorimétrico puede estar además de o sustituir un ensayo realizado en un formato fluorescente. En algunos casos la formación del producto cromogénico es el resultado de un cambio del pH causado por reacción de una enzima con el sustrato (ensayo colorimétrico). Generalmente, el indicador colorimétrico es un compuesto sensible al pH capaz de exhibir un cambio en el color. Particularmente, el indicador cromogénico
10 sufre un cambio en el color en presencia de un aumento (alcalinización) o descenso (acidificación) del pH. En otros casos, la formación del producto cromogénico se acompaña de la escisión de un sustrato cromogénico (por ejemplo por hidrólisis) para formar un cromóforo derivado detectable.

15 En una realización particularmente preferida de la presente invención el sistema de ensayo universal comprende al menos un ensayo para detectar cada una de las enzimas peptidasa y glucosidasa. En otras realizaciones preferidas el sistema de ensayo además comprende un ensayo enzimático de fermentación de un azúcar. En otras realizaciones preferidas el sistema de ensayo comprende al menos un ensayo de ureasa, descarboxilasa, esterasa, triptofanasa (ensayo del indol), o una enzima que utiliza carbono. En una realización con formato de panel se han dispuesto en cada uno de un número de pocillos predeterminado en el panel de ensayo universal, al menos un sustrato para cada una de
20 las enzimas, así como otros componentes necesarios para el ensayo. En el momento de uso se añade la muestra a cada pocillo y la enzima o grupo de enzimas, si está presente en la muestra, actúa sobre el sustrato para formar un producto detectable. La presencia de la enzima o grupo de enzimas en cada uno de los ensayos, si están presentes, se determina identificando el producto detectable en cada pocillo, estando relacionados los productos detectables de la combinación de ensayos con la presencia de un microorganismo en la muestra en comparación con un estándar predeterminado.

25 En otras realizaciones preferidas los ensayos adicionales comprenden un ensayo de fosfatasa. El ensayo para la enzima adicional se hace en un formato cromogénico o fluorogénico, según se desee.

30 En una realización particularmente preferida el panel de ensayo universal comprende una única batería de ensayos bioquímicos predeterminados en la que los ensayos comprenden ensayos de fluorescencia para cada una de las enzimas peptidasa, glucosidasa, enzima de fermentación de un azúcar, esterasa y enzima que utiliza carbono, y al menos un ensayo colorimétrico de ureasa, fosfatasa, triptofanasa y una descarboxilasa.

35 En una realización particularmente preferida de la presente invención el sistema de ensayo universal comprende una única batería de ensayos bioquímicos predeterminados que se completan entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 8 horas, preferiblemente entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente dos horas y media. Aunque la mayoría de los ensayos bioquímicos de acuerdo con los presentes procedimientos se puede realizar en aproximadamente dos horas, en algunos casos es deseable extender los tiempos de ensayo a más de tres horas y hasta aproximadamente ocho horas. Por ejemplo, en algunos casos, los periodos de ensayo más largos de dos horas se usan para aumentar la detección de niveles bajos de enzimas que exhiben bajas velocidades de catálisis. En otros ejemplos los periodos de ensayo de menos de dos horas se emplean para detectar enzimas abundantes o enzimas con
40 altas velocidades catalíticas.

45 En otro aspecto más, la presente invención proporciona ensayos basados en fluorescencia útiles para detectar e identificar rápidamente en una muestra una variedad de levaduras, tales como las levaduras que causan enfermedades (por ejemplo, *Candida*).

50 En otro aspecto más, la presente invención proporciona ensayos de enzimas que utilizan carbono basados en la fluorescencia.

Descripción detallada de la invención

55 El sistema de ensayo universal de la presente invención está configurado convenientemente en forma de un panel que tiene un número predeterminado de cámaras de reacción o pocillos. Tal configuración se usará para ilustrar los sistemas de ensayo de la presente invención. No se pretende limitar el sistema de ensayo universal, ya que éste se puede configurar en una amplia variedad de formatos adecuados para encontrar el uso indicado.

60 Los sistemas de ensayo de la presente invención son capaces de identificar en una muestra un microorganismo de uno de los grupos de microorganismos ampliamente divergentes. En una realización preferida, el sistema de ensayo comprende:

65 una batería predeterminada de ensayos bioquímicos no redundantes dispuestos en un número predeterminado de cámaras de reacción en la que cada ensayo bioquímico comprende un sustrato para una enzima o grupo de enzimas, y en la que además el sustrato, si la enzima o grupo de enzimas actúa sobre él, da como resultado la formación de un producto detectable en la cámara de reacción;

y

ES 2 200 321 T3

en la que los productos detectables de la combinación de ensayos se usan para identificar el microorganismo en la muestra.

Con no redundante, como se usa aquí en relación con el sistema de ensayo universal de la presente invención, se quiere decir que la batería única de ensayos bioquímicos predeterminados no está basada en formulaciones específicas de familia o específicas de grupo para cada familia y/o grupo como se conoce en la técnica. En lugar de esto, cada ensayo bioquímico de la presente invención es independiente de familia y de grupo. Preferiblemente, un sustrato no se usa más de una vez por panel. Sin embargo, en algunos casos puede ser deseable incluir el mismo sustrato un número de veces pero, por ejemplo, en un sistema tampón diferente.

El descubrimiento de que las formulaciones específicas de grupo no se requieren para identificar un microorganismo en por ejemplo una muestra clínica que puede contener un microorganismo de uno cualquiera de los grupos ampliamente diversos, es un gran paso adelante que da como resultado los sistemas de ensayo y procedimientos de la presente invención.

La formación de un producto detectable como se usa aquí comprende preferiblemente la formación de un producto fluorescente o un producto cromogénico, o un cambio en el color o en la fluorescencia en la cámara de reacción. También pueden usarse en la práctica de la presente invención otros productos detectables, por ejemplo, detectables por un cambio en la radiación o en la luminiscencia.

El número de ensayos dispuestos en un panel de ensayo universal de la presente invención es suficiente para identificar en una muestra un único microorganismo que pertenece a uno cualquiera de los grupos ampliamente divergentes. Por ejemplo, si se desea hacer un panel de ensayo universal capaz de identificar un microorganismo de uno cualquiera de los siguientes grupos: entéricos, no fermentativos, anaerobios, y bacterias patógenas, la combinación apropiada de ensayos se determina rápidamente, por ejemplo, siguiendo el procedimiento que se señala en el Ejemplo 3. El procedimiento de selección del ensayo es iterativo, es decir, se selecciona una batería de ensayos, se hace, y luego, se prueba. Si la batería no pasa la prueba, entonces la batería de ensayos se modifica, por ejemplo, puede seleccionarse una concentración de sustrato diferente, se puede añadir o quitar un ensayo, etc., hacer de nuevo y evaluarse otra vez y así. Para identificar a nivel de especies en lugar de género, el número de ensayos será generalmente mayor. El número mínimo y/o óptimo de ensayos para un uso particular puede determinarse rápidamente usando técnicas estadísticas conocidas de acuerdo con las enseñanzas que se dan aquí. Un ejemplo de una técnica así se encuentra a continuación en el Ejemplo 3.

En las realizaciones preferidas los sistemas de ensayo de la presente invención comprenden al menos un ensayo para detectar una peptidasa, glucosidasa, una enzima de fermentación de un azúcar, una ureasa, una descarboxilasa, una esterasa, una enzima de utilización de carbono, una fosfatasa, o una triptofanasa. En otras realizaciones preferidas tales ensayos comprenden al menos un ensayo para al menos una peptidasa y al menos una glucosidasa.

Tales sistemas de ensayo pueden comprender además un ensayo para al menos una enzima de fermentación de un azúcar; al menos una ureasa, al menos una descarboxilasa, un ensayo para al menos una esterasa, y al menos una enzima de asimilación de carbono, y diversas combinaciones de los mismos. En otros sistemas de ensayo preferidos según la presente invención la combinación predeterminada de ensayos bioquímicos no redundantes es capaz de identificar un microorganismo entre, al menos, dos bacterias entéricas, bacterias no fermentativas, bacterias anaerobias, levaduras, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp, y bacterias patógenas. Otro sistema de ensayo preferido es capaz de identificar microorganismo entre al menos uno de los *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Corynebacteria* sp., *Lactobacillus* sp. *Pediococcus* sp., *Leuconostococcus* sp., *Alloicoccus* sp., *Vagococcus* sp., *Kluyvera* sp., *Leminorella* sp., *Haemophilus* sp., *Neisseria* sp., *Moraxella* sp., *Salmonella* sp., *Clostridia* sp., y *Listeria* sp.

En otro sistema más de ensayo preferido de la presente invención la combinación predeterminada de ensayos bioquímicos no redundantes es capaz de identificar el microorganismo entre al menos uno de los anaerobios, levaduras o bacterias patógenas; entre anaerobios y levaduras o bacterias patógenas; o entre levadura y bacterias patógenas.

En otras realizaciones preferidas los sistemas de ensayo de la presente invención son capaces de identificar los microorganismos entre al menos uno de *Staphylococcus*, *Streptococcus* o *Enterococcus*; y al menos uno de anaerobios, levaduras, bacterias entéricas, no fermentativas o bacterias patógenas combinaciones de los mismos; entre *Enterococcus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*; entre anaerobios, levaduras y bacterias patógenas; o entre *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, anaerobios, levaduras y bacterias patógenas.

Los procedimientos de la presente invención para identificar en una muestra un microorganismo de entre al menos dos grupos de microorganismos ampliamente divergentes el cual puede estar presente en tal muestra mediante el uso de un sistema de ensayo que comprende:

- a) añadir la muestra a cada cámara de reacción que comprende un sustrato;
- b) permitir a la enzima, si está presente, reaccionar con el sustrato;
- c) determinar la presencia de la enzima en la muestra detectando el producto detectable en un ensayo; y

ES 2 200 321 T3

- d) comparar los resultados de la combinación de ensayos predeterminados con al menos un estándar predeterminado para identificar el microorganismo en la muestra.

5 También se proporcionan por la presente invención ensayos para detectar la utilización de una fuente de carbono por un microorganismo, comprendiendo el ensayo al menos una fuente de carbono y al menos un indicador fluorométrico, actuando el microorganismo sobre la fuente de carbono para producir un cambio en el pH que causa un cambio en la fluorescencia del indicador, siendo el cambio en la fluorescencia indicativo de una utilización de la fuente de carbono por el microorganismo.

10 En una realización particularmente preferida el panel de ensayo universal es capaz de identificar un microorganismo de uno cualquiera de (i) la familia enterobacteriaceae, staphylococci, enterococci, y streptococci y (ii) los grupos de bacterias anaerobias, levaduras y patógenas al nivel de identificación deseado, por ejemplo, género y/o especie.

15 Típicamente el volumen de la cámara de reacción se elige por conveniencia y relación coste/eficacia.

Los materiales adecuados para uso en la fabricación de tales paneles deben ser sustancialmente no reactivos con los componentes de los ensayos enzimáticos e incluir plásticos tales como el poliestireno, PVC y otros.

20 En una realización, los paneles de ensayo universal de la presente invención se usan para identificar un microorganismo que pertenece a uno cualquiera de un número de múltiples grupos de microorganismos. El microorganismo se identifica hasta géneros y/o especies discretos, preferiblemente a nivel de especie.

25 Los paneles de ensayo universal de la presente invención se pueden configurar para identificar bacterias y levaduras, por ejemplo bacterias de grupos ampliamente diversos tales como las entéricas y no fermentativas; anaerobias; staphylococci, streptococci, y enterococci; y bacterias patógenas.

30 En una realización, el panel de ensayo universal incluye múltiples pocillos con ensayos bioquímicos diferentes. Sin embargo, en otra realización, el panel de ensayo universal comprende al menos un ensayo bioquímico en el que el ensayo se hace en pocillos separados con el mismo sustrato pero en tampones diferentes, tales como TRIS, HEPES, MOPS, PIPES, histidina, fosfato, citrato, acetato o carbonato. Por ejemplo, una realización del panel de ensayo universal de la presente invención comprende ensayos de peptidasa usando el sustrato (es decir, glicil-glicina 7-AMC) en Tris en un pocillo y HEPES en otro pocillo.

35 Generalmente el pH de cada pocillo del panel de ensayo universal estará entre aproximadamente 5 y aproximadamente 9. Por ejemplo los ensayos de peptidasa y glucosidasa se hacen típicamente a aproximadamente pH 7-9 y aproximadamente 7-8 respectivamente, y los ensayos de enzimas de fermentación de un azúcar a aproximadamente pH 7-8, y los ensayos de enzimas que utilizan carbono se hacen típicamente a aproximadamente pH 5,0-6,0.

40 En otros casos, el panel de ensayo universal comprende al menos un ensayo bioquímico en el que el ensayo se hace en pocillos separados con isómeros de los sustratos del enzima. En esta realización el isómero puede ser, por ejemplo, un enantiómero, diastereoisómero, o diastereoisómero *cis-trans*. Alternativamente el sustrato puede ser una mezcla de isómeros. Por ejemplo, los isómeros α y β de la galactosa son isómeros adecuados para uso en el ensayo enzimático de fermentación de azúcar. Véase la Tabla VI a continuación.

45 La muestra a ensayar en el panel de ensayo universal es una suspensión de microorganismo obtenida a partir de un aislado sustancialmente puro del microorganismo.

50 El aislado sustancialmente puro se obtiene mediante varios métodos conocidos. Por ejemplo, en un método la muestra se cultiva previamente con un medio líquido, sólido o semisólido capaz de sostener el crecimiento de un grupo deseado de microorganismos.

55 Más particularmente se puede cultivar la muestra previamente en un medio selectivo sólido o semisólido para obtener colonias a partir de las cuales se obtiene el microorganismo aislado esencialmente puro. Si se desea, el aislado sustancialmente puro se puede seleccionar adicionalmente para aumentar el número de microorganismos deseados. En cada caso el aislado se suspende en una solución detergente para formar una suspensión adecuada para el uso con el panel de ensayo universal. Típicamente la suspensión tiene una densidad de aproximadamente 0,1 a 5 unidades McFarland, preferiblemente aproximadamente 0,5 unidades McFarland. En algunos casos se prefieren suspensiones con densidades más altas dentro de este rango para obtener resultados más rápidos en el panel de ensayo universal. Los métodos para cultivar previamente las muestras de un microorganismo son bien conocidos.

60 Al seleccionar los ensayos para el sistema de ensayo universal de la presente invención se selecciona una batería de estos ensayos y se dispone en un panel apropiado y se ensaya como se describe más adelante hasta llegar a un estándar predeterminado (matriz de probabilidad) para uso en la identificación de un microorganismo que pertenece a uno cualquiera de los diversos grupos de microorganismos.

65 Según lo antes descrito, en los sistemas de ensayo universales de la presente invención se pueden usar una amplia variedad de ensayos de fluorescencia (por ejemplo fluorogénico, fluorométrico), colorimétrico, y de neutralización de fluorescencia.

ES 2 200 321 T3

Además para el uso con cada uno de estos ensayos, son adecuados una diversidad de sustratos. Por ejemplo, en las realizaciones preferidas de la presente invención se eligen los ensayos fluorogénicos y/o fluorométricos para uso con el panel de ensayo universal. En estas realizaciones el ensayo fluorogénico comprende al menos un sustrato fluorogénico, preferiblemente un sustrato fluorogénico que se escinde enzimáticamente para formar un producto fluorescente detectable. En las realizaciones particularmente preferidas, el sustrato fluorogénico consiste típicamente en un sustrato conjugado con un fluorógeno. El ensayo fluorométrico comprende al menos un sustrato, preferiblemente un sustrato que se hace reaccionar con al menos una enzima en la muestra para conseguir un cambio de pH detectado por un indicador fluorométrico. Se han descrito una amplia variedad de indicadores fluorógenos y *fluorométricos*. Véase por ejemplo, la Tabla VII a continuación, y Haugland, R.P., “*Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*”, 6ª Ed. (1996) de Molecular Probes, Inc; Bascomb, S. (1987) *Methods in Microbiol.* 19, 106; Manafi, M. *et al.* (1991) *Microbiological Rev.* 335.

Los sustratos ejemplares para uso en los sistemas de ensayo universal de la presente invención se enumeran más adelante en la Tabla VI. Los sustratos 1 a 25 son sustratos fluorogénicos para los ensayos de peptidasa. Los sustratos 26 a 34 son sustratos fluorogénicos para los ensayos de glucosidasa. Los sustratos 35, y 37 a 54 son sustratos para los ensayos de fermentación de azúcar usando el indicador fluorométrico 4-metilumbeliferona. Los sustratos 55 a 60 son sustratos que simulan carbono. Los sustratos 61-62, 64-65, 73-78, 88-89, y 92 son sustratos para los ensayos de fermentación de azúcar. El sustrato 63 es un sustrato para el ensayo de ureasa. Los sustratos 66-70, 79-80, y 90-91 son sustratos para los ensayos de glucosidasa. Los sustratos 71, 81-83, y 93-95 son sustratos para los ensayos de peptidasa. Los sustratos 72 y 84 son sustratos para los ensayos de fosfatasa. Los sustratos 85-87 son sustratos para los ensayos de descarboxilasa. El sustrato 96 es un sustrato para el ensayo del indol.

TABLA VI

25	1	L-Arginil-L-arginina 7-AMC HCl (Tris)	51	Trealosa (producción de ácido)
	2	L-Citrulina 7-AMC HBr (Tris)	52	Turanosa (producción de ácido)
30	3	Glicina 7-AMC HBr (Tris)	53	Xilosa (producción de ácido)
	4	Glicilglicina 7-AMC HCl (Tris)	54	Palatinosa (producción de ácido)
	5	Glicil-L-prolina 7-AMC HBr(Tris)	55	Acetamida (alcalinización)
35	6	L-Histidina 7-AMC (Tris)	56	Ácido benzoico (alcalinización)
	7	L-Hidroxiprolina 7-AMC (Tris)	57	Acido fórmico (alcalinización)
40	8	L-Isoleucina 7-AMC TFA (Tris)	58	Ácido maleico (alcalinización)
	9	L-Leucina 7-AMC AcOH (Tris)	59	Ácido pirúvico (alcalinización)
	10	L-Lisina 7-AMC AcOH (Tris)	60	Ácido malónico (alcalinización)
45	11	L-Metionina 7-AMC AcOH (Tris)	61	Arbitol (producción de ácido)
	12	L-Serina 7-AMC HCl (Tris)	62	Ácido glucurónico (producción de ácido)
50	13	L-Triptófano 7-AMC (Tris)	63	Urea (alcalinización)
	14	L-Arginil-L-arginina 7-AMC HCl (Hepes)	64	Manitol (producción de ácido)
55	15	L-Alanina 7-AMC TFA (Hepes)	65	Rafinosa (producción de ácido)
	16	Glicilglicina 7-AMC HCl (Hepes)	66	4-MeU β -D-Xilósido
60	17	Glicil-L-prolina 7-AMC HBr (Hepes)	67	4-MeU β -D-Glucósido
	18	L-Histidina 7-AMC (Hepes)	68	4-MeU β -D-Manopiranosido
	19	L-Hidroxiprolina 7-AMC (Hepes)	69	4-MeU β -D-N,N- Diacetilquitobiósido
65	20	L-Isoleucina 7-AMC TFA (Hepes)	70	4-MeU β -D-Galactósido

ES 2 200 321 T3

TABLA VI (continuación)

5	21	L-Leucina 7-AMC HCl (Hepes)	71	Ácido piroglutámico
	22	L-Metionina 7-AMC AcOH (Hepes)	72	4-MeU-fosfato (pH 7-8)
	23	L-Metionina 7-AMC TFA (Hepes)	73	Adonitol (producción de ácido)
10	24	L-Serina 7-AMC HCl (Hepes)	74	Arabinosa (producción de ácido)
	25	L-Triptófano 7-AMC (Hepes)	75	Inositol (producción de ácido)
15	26	4-MeU α -L- Fucósido	76	Manosa (producción de ácido)
	27	4-MeU α -L-Arabinopiranosido	77	Sacarosa (producción de ácido)
	28	4-MeU α -D-Manopiranosido	78	Salacina (producción de ácido)
20	29	4-MeU α -L-Ramnopiranosido	79	4-MeU-N-acetil- β -D- glucosamidina
	30	4-MeU β -D-Fucósido	80	4-MeU β -D-Glucurónido
25	31	4-MeU β -L-Fucósido	81	Arginina (AMC)
	32	4-MeU β -D-Lactósido	82	Glutaril-glicil-arg (AMC)
	33	4-MeU β -D-Celobiósido	83	Prolina (AMC)
30	34	4-MeU N-Acetil- β -D-Galactosaminida	84	4-MeU-fosfato (pH 6-7)
	35	Arbutina (producción de ácido)	85	Tampón de descarboxilasa
35	36	LOCATOR (AMC)	86	L-Lisina (alcalinización)
	37	Celobiosa (producción de ácido)	87	L-Ornitina (alcalinización)
	38	Dulcitol (producción de ácido)	88	Melibiosa (producción de ácido)
40	39	Eritriol (producción de ácido)	89	Sorbitol (producción de ácido)
	40	Fructosa (producción de ácido)	90	4-MeU α -d-Galactósido
45	41	Galactosa (producción de ácido)	91	4-MeU β -d-Glucósido
	42	Glicerol (producción de ácido)	92	Glucosa (producción de ácido)
	43	Inulina (producción de ácido)	93	α -Ácido α -Glutámico (AMC)
50	44	Lactosa (producción de ácido)	94	γ -Ácido γ -Glutámico (AMC)
	45	Maltosa (producción de ácido)	95	Tirosina (AMC)
55	46	Melecitosa (producción de ácido)	96	L-Triptófano (ensayo de desactivación)
	47	Mucata (producción de ácido)		
	48	Ramnosa (producción de ácido)		
60	49	Ribosa (producción de ácido)		
	50	Almidón (producción de ácido)		

65 Los sustratos fluorogénicos ejemplares para peptidasas, útiles en la práctica de la presente invención, comprenden un aminoácido, péptido, o polipéptido conjugado a un fluorógeno. A continuación en la Tabla VI se muestran ejemplos de fluorógenos adecuados e incluyen particularmente β -naftilamina y 7-aminometilcumarina (7-AMC). Un fluorógeno

ES 2 200 321 T3

particularmente preferido para uso en el ensayo de peptidasa es la 7-AMC. Los procedimientos para crear y usar los sustratos fluorogénicos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Gran Bretaña número 1.547.747 y la patente EPO número 0.000.063).

5

TABLA VII

10

Fluorógeno	Ensayo de fluorógeno	Ensayo fluorométrico
7-AMC	X	
β -metilesculetina		X
α -naftol	X	
β -naftol	X	
β -naftilamina	X	

15

20

Los péptidos y polipéptidos adecuados para uso en el ensayo de peptidasa tienen entre aproximadamente 2 y 20 aminoácidos de longitud y están dispuestos en una sola cadena, cadena ramificada o en forma cíclica. Los aminoácidos adecuados comprenden los 20 aminoácidos comunes: alanina; cisteína; ácido aspártico; ácido glutámico; fenilalanina; glicina; histidina; isoleucina; lisina; leucina; metionina; asparagina; prolina; glutamina; arginina; serina; treonina; valina; triptófano; y tirosina. Otros aminoácidos adecuados incluyen aminoácidos raros o no proteicos tales como los que se encuentran en las proteínas fibrosas y ciertas toxinas de hongos y plantas tales como la 4-hidroxi prolina; 5-hidroxi lisina; ϵ -N-metilisina; 3-metilhistidina; desmosina; isodesmosina; β -alanina; ácido γ -aminobutírico; homocisteína; homoserina; canavanina; ácido djencólico; y β -cianoalanina. Los aminoácidos pueden estar en forma D o L según se desee. Los sustratos ejemplares para uso en el ensayo de peptidasa se muestran en la Tabla VI anterior.

25

30

En otra realización preferida el panel de ensayo universal de la presente invención comprende al menos un ensayo de glucosidasa llevado a cabo preferiblemente en un formato fluorogénico. En esta realización, los ensayos de glucosidasa comprenden al menos un sustrato fluorogénico, preferiblemente un sustrato fluorogénico que se escinde en presencia de la glucosidasa de la muestra. Los sustratos fluorogénicos para uso en el ensayo de glucosidasa comprenden conjugados entre un carbohidrato, típicamente un azúcar, y un fluorógeno adecuado. En la Tabla VII se han descrito antes ejemplos de fluorógenos adecuados. Un fluorógeno preferido particularmente es la 4-MeU. Los azúcares adecuados para uso en el ensayo de glucosidasa comprenden aproximadamente 3 a 8 carbonos (por ejemplo, una tetrosa, pentosa, hexosa o heptosa), así como sacáridos y disacáridos que comprenden aproximadamente 2 a 10 unidades de azúcar unidas covalentemente y un peso molecular de aproximadamente entre 350 y 4000 daltons. En la Tabla VI anterior se muestran sustratos fluorogénicos ejemplares para usar en el ensayo de glucosidasa.

35

40

En otra realización, un panel de ensayo universal de la presente invención comprende al menos un ensayo para una enzima de fermentación de un azúcar llevado a cabo en formato fluorométrico. En esta realización el ensayo de fermentación del azúcar comprende al menos un azúcar o sacárido tal como los descritos antes para el ensayo de glucosidasa, y al menos un indicador fluorométrico. Los ejemplos de sustratos fluorométricos adecuados se muestran en la Tabla VII anterior, e incluyen 4-MeU. Preferiblemente el indicador fluorométrico es capaz de emitir fluorescencia en un intervalo de pH de aproximadamente 6 a 8. Un indicador fluorométrico particularmente preferido es la 4-MeU. Los sustratos adicionales para uso en el ensayo incluyen polisacáridos tales como almidón y glucógeno, con un peso molecular de entre aproximadamente 10^4 a 10^6 . En la Tabla VI anterior se muestran sustratos ejemplares para uso en el ensayo enzimático de fermentación de azúcar.

45

50

En otra realización el panel de ensayo universal comprende al menos un ensayo de utilización de carbono llevado a cabo en un formato fluorométrico. En esta realización el ensayo de utilización de carbono comprende al menos una fuente de carbono, preferiblemente una fuente de carbono y al menos un indicador fluorométrico adecuado, preferiblemente un indicador fluorométrico. Los indicadores fluorométricos adecuados para uso se muestran en la Tabla VII anterior e incluyen 4-MeU y otros compuestos. Un indicador fluorométrico preferido particularmente es la β -metilesculetina, capaz de emitir fluorescencia en un intervalo de pH de aproximadamente 5 a 7.

55

60

Una fuente de carbono adecuada para uso en el ensayo de utilización de carbono incluye un alqueno, alquino, alcohol, éter, éster, nitrilo, sulfuro, sulfona, tiol, cetona, sulfóxido, aldehído, amida, amina, ácido carboxílico, o ácido benzoico. La fuente de carbono generalmente incluye aproximadamente 2 a 10 átomos de carbono dispuestos en una cadena lineal, ramificada o en forma cíclica que tiene un peso molecular de aproximadamente entre 40 y 500. Las fuentes de carbono preferidas son miscibles en soluciones acuosas (por ejemplo, solución salina fisiológica y soluciones tampón que incluyen Tris o Hepes) y que no son volátiles. La tabla VI anterior proporciona ejemplos de fuentes de carbono adecuadas.

65

ES 2 200 321 T3

En una realización preferida de la presente invención los sustratos de los sistemas de ensayo comprenden lisina (AMC), leucina (AMC), metionina (AMC), glicilprolina (AMC), isoleucina (AMC), trealosa, maltosa, L-triptófano (7-AMC), 4-MeU-fosfato, β -D-xilósido-4-MeU, hidroxiprolina-AMC, β -D-glucurónido-4-MeU, tirosina (AMC), 4-MeU- β -D-galactósido, manosa, sacarosa, y prolina (AMC). En otra realización preferida, los sustratos comprenden además fructosa, glicerol, L-histidina 7-AMC, ácido piroglutámico (AMC) y 4-MeU- β -D-glucósido. En otra realización preferida los sustratos comprenden además L-serina-7-AMC, celobiosa, arginina (AMC), y 4-MeU-N-acetil- β -D-galactosaminida.

Los ensayos fluorescentes antes descritos forman productos que se detectan por métodos instrumentales fluorométricos o fluoroscópicos no destructivos convencionales para cuantificar un producto fluorescente en los ensayos. Por ejemplo, uno de los instrumentos automáticos particularmente preferidos es el sistema MicroScan Walkaway, disponible comercialmente en Dade MicroScan Inc. Sin embargo, los sistemas de ensayo universales de la presente invención se podrían adaptar para uso en otros instrumentos disponibles comercialmente.

En una realización de la presente invención el panel de ensayo universal consiste al menos en un ensayo llevado a cabo en formato colorimétrico (cromogénico). Por ejemplo, los ensayos de peptidasa, glucosidasa, enzima de fermentación de azúcar o enzima de utilización de carbono descritos aquí se pueden realizar en formato colorimétrico (cromogénico). Se conocen una variedad de ensayos colorimétricos para detectar peptidasas tales como las piroglutamilaminopeptidasas, L-alaninaminopeptidasas, arilpeptidasas, arilamidadas; y glucosidasas tales como la β -D-glucuronidasa, β -D-galactosidasa, 6-fosfo- β -D-galactósido-6-fosfogalactohidrolasa, α -D-galactosidasa, β -D-glucosidasa, neuroaminidasas, α -amilasa, α -glucosidasa y N-acetil-3-D-glucosaminidasa, N-acetil- α -D-glucosaminidasa, α -D-arabinosidasa, β -D-fucosidasa y β -D-xilosidasa. Adicionalmente, los ensayos colorimétricos para detectar enzimas que fermentan azúcar son bien conocidos y se pueden usar en el sistema de ensayo de la presente invención. Los ensayos colorimétricos adicionales adecuados para uso con el panel de ensayo universal incluyen ensayos conocidos para detectar, por ejemplo, ureasas, oxidasas, reductasas, hidrolasas, hidrogenasas, esterasas, fosfatasa, triptofanasas, proteasas tales como la quimi tripsina, descarboxilasas tales como las ornitin- y lisin-descarboxilasas, y enzimas capaces de asimilar intermedios del ciclo del ácido cítrico. Como se describe antes, tales ensayos se pueden adaptar para uso en el sistema de ensayo universal de la presente invención y ensayar usando análisis de probabilidad.

Un ensayo colorimétrico adecuado para uso en los presentes procedimientos se puede llevar a cabo en una diversidad de formatos de detección. Por ejemplo, en algunos casos, un sustrato que comprende un cromógeno se usa en un formato de detección directo. En este caso el sustrato cromogénico puede comprender, por ejemplo, ésteres de *o*-nitrofenol, *m*-nitrofenol o *p*-nitrofenol, ésteres de indoxilo o 5-bromo-4-cloro-3-indolilo, o un péptido arílico derivado de la *p*-nitroanilina. En el ensayo colorimétrico la liberación del cromógeno se detecta directamente. Sin embargo, en otros casos es deseable hacer el ensayo colorimétrico en un formato de detección indirecto mediante un reactivo adecuado. Los ejemplos de tales ensayos incluyen una reacción química de los productos de reacción enzimáticos inorgánicos (por ejemplo, nitrato), con ácidos inorgánicos tales como el ácido sulfanílico y la α -naftilamina. En otro caso, es deseable hacer el ensayo colorimétrico en un formato indirecto usando una molécula indicadora sensible al pH para detectar cambios de pH en el ensayo. Los ejemplos de tales moléculas incluyen azul de bromotimol y rojo fenol. Otros ensayos colorimétricos adecuados usan *p*-dimetilaminocinamaldehído para detectar la liberación de β -naftilamina, por ejemplo, ensayos de peptidasa cromogénicos a partir de sustratos cromogénicos que comprenden β -naftilamida. En otro caso más, el ensayo colorimétrico adecuado puede incluir una reacción de los derivados de *p*-nitroanilina con compuestos diazo para potenciar la sensibilidad del ensayo.

Particularmente, se han descrito muchos ensayos colorimétricos para detectar e identificar levaduras y microorganismos semejantes a las levaduras tales como *Protheca*, así como *Neisseria*, especies de *Haemophilus*, *Branhamella catarrhalis*, y *Gardnerella vaginalis*.

La tabla VIII a continuación, proporciona ejemplos de cromógenos adecuados para usar en un ensayo colorimétrico.

TABLA VIII

Cromógeno	Cromógeno conjugado al sustrato a través de:			
	Enlace éster	Enlace peptídico	Puentes de hidrógeno	Glucosidasa
Fenol	x		x	
<i>o</i> -nitrofenol	x		x	
<i>p</i> -nitrofenol	x		x	
Indoxilo	x		x	

ES 2 200 321 T3

TABLA VIII (continuación)

		Cromógeno conjugado al sustrato a través de:			
5	Cromógeno	Enlace éster	Enlace peptídico	Puentes de hidrógeno	Glucosidasa
	α -naftol	x		x	
10	4-metoxinaftilamina		x		
	Ácido hipúrico		x		
15	Fenoltaleína	x		x	
	<i>p</i> -nitroanilina	x		x	
	<i>p</i> -nitroanilina & colorante diazo		x		
20	β -naftilamina		x		
	β -naftol	x		x	
25	6-bromo-2-naftol	x		x	
	4,6-diamino-2-fenilindol				x
	Naranja de acridina				x
30	Bromuro de etidio				x

35 De acuerdo con esto, en una realización preferida de la presente invención el panel de ensayo universal comprende ensayos bioquímicos en los que los ensayos además comprenden al menos un ensayo para detectar peptidasa, glucosidasa, ensayo de fermentación de azúcar y de utilización de carbono, preferiblemente en un formato fluorescente; y al menos un ensayo colorimétrico para detectar ureasa, una descarboxilasa, preferiblemente la ornitín- descarboxilasa y lisín- descarboxilasa; esterasa y triptofanasa. Estos ensayos se pueden combinar de varias maneras dependiendo del uso intencionado del sistema de ensayo.

40 Un sistema de ensayo preferido de la presente invención comprende un ensayo para al menos una peptidasa y al menos una glucosidasa. Otro sistema de ensayo preferido comprende además un ensayo para al menos una enzima de fermentación de un azúcar. Otro sistema más de ensayo preferido comprende además al menos un ensayo para una ureasa, una descarboxilasa, una esterasa o una enzima de utilización de carbono o una combinación de los mismos.

45 En otra realización de la presente invención el panel de ensayo universal comprende ensayos bioquímicos en los que los ensayos comprenden al menos un ensayo para detectar catalasa, una descarboxilasa tal como la ácido glutámico- o arginin- descarboxilasa, una aminoácido desamidasa tal como la arginina-desamidasa, lipidasa, pirofosfodiesterasa, DNAasa, una oxidasa, una arilsulfatasa, o una enzima productora de acetoin/diacetilo. En esta realización los ensayos se hacen en formato colorimétrico o fluorescente según se desee.

50 Con el término “predeterminado”, como se usa aquí, se quiere decir que el ensayo bioquímico se ha seleccionado de acuerdo con técnicas estadísticas conocidas, tales como DFA o regresión lineal. En el Ejemplo 3 se proporciona un ejemplo de las técnicas estadísticas preferidas. De acuerdo con esto, una “batería o combinación de ensayos bioquímicos predeterminados”, como se usa aquí, es un grupo de ensayos bioquímicos que se han seleccionado mediante técnicas estadísticas apropiadas.

Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de la invención.

60 Ejemplo 1

Sistema de ensayo universal

65 Los sustratos para uso en la presente invención se pueden hacer de diversas maneras. En general, las formulaciones de los sustratos se diseñan para uso en un tampón conveniente, por ejemplo TRIS o HEPES en un intervalo de pH entre 5 y 9. Se seleccionan cantidades o concentraciones concretas de sustrato y sistemas tampón para optimizar la V_{max} de un ensayo bioquímico particular. Más particularmente, los sustratos para el ensayo de peptidasa se eligen para

ES 2 200 321 T3

que tengan una concentración final de aproximadamente entre 0,01 y 1,0 mM. En un tampón adecuado tal como el Tris (por ejemplo Tris fosfato) a una concentración de Tris de aproximadamente entre 0,1 y 1,0 M. Preferiblemente, para los ensayos de peptidasa, el intervalo de pH está entre aproximadamente 7,5 y 8,5. Los sustratos se disuelven en soluciones aceptables tales como agua, tampón, o dimetilsulfóxido (DMSO), según se necesite. Las formulaciones del sustrato para los ensayos de glucosidasa se diseñan de manera similar excepto en que la concentración de sustrato generalmente está entre aproximadamente 0,1 y 3,0 mM y un pH entre aproximadamente 7 y 8. Para los ensayos de descarboxilasa y de utilización de carbono se prefiere hacer el ensayo en un tampón de descarboxilasa, aunque se pueden usar si se desea otros tampones tales como los tampones Tris o Hepes. El tampón de descarboxilasa se formula combinando: extracto de levadura (aproximadamente 0,1 a 1,0% (p/v)); peptona (aproximadamente 0,1 a 1,0% (p/v)); 5-fosfato de piridoxilo (aproximadamente 0,01 a 0,1 mM); solución madre de glicerol al 10% (p/v) (aproximadamente 0,5 a 2% (p/v)); 4- β -metilesculetina 0,02 M (aproximadamente 0,1 a 1 mM); ácido fólico (aproximadamente 1,0 a 10,0 mM), pH 5 a 6; la fuente de aminoácido o de carbono está entre aproximadamente 0,5 a 5% (p/v).

Los ensayos de azúcar (producción de ácido) se llevan a cabo típicamente en tampón Hepes u otros tampones adecuados (aproximadamente 0,5 a 2,5 mM) a un pH entre aproximadamente 7 y 8. Otros componentes del ensayo incluyen 4-MeU (aproximadamente 0,01 a 0,25 mM); peptona (aproximadamente 0,01 a 0,5% (p/v)); el azúcar (aproximadamente 0,05 a 2% (p/v)); en aproximadamente 1 litro de agua destilada desionizada.

La tabla VI enumera sustratos ejemplares para uso en el sistema de ensayo universal. Las siguientes secciones (A-D) describen la formulación de los sustratos de la presente invención preferidos particularmente.

En una realización se disponen los sustratos en un panel de ensayo tal como una placa de microtitulación con pocillos (cámaras de reacción) dispuestos, por ejemplo, en filas lineales. Cada cámara de reacción fue de aproximadamente 0,3 ml.

Cada uno de los sustratos se usó en un ensayo bioquímico que se llevó a cabo en un formato fluorométrico o colorimétrico. Los resultados de cada ensayo se compilaron de acuerdo con técnicas estadísticas estándar y se compararon con una base de datos para identificar grupos múltiples de microorganismos usando las técnicas de cultivo microbiológico estándar. Generalmente la base de datos que se utilizaba era una matriz de probabilidad que se configuró, por ejemplo, como una única base de datos que comprende los miembros de todos los grupos o familias de microorganismos a identificar en la muestra. Alternativamente (o además) la base de datos es una matriz de probabilidad configurada como una serie de sub-bases de datos específicas para un grupo o familia particular de microorganismos en la muestra. En la construcción de las bases de datos para uso de acuerdo con la presente invención se usaron métodos estadísticos bien conocidos (véase a continuación, por ejemplo, el Ejemplo 3).

En general, las formulaciones del sustrato para dosificar en los pocillos del panel de ensayo universal se prepararon en cada pocillo de un panel de ensayo en un volumen final adecuado, después de lo cual se secó la solución en el pocillo a temperatura ambiente. Mediante dilución o concentración de los ingredientes de la fórmula de ensayo se puede disminuir o aumentar proporcionalmente el volumen a dosificar. En la mayoría de los casos las formulaciones se esterilizaron con filtro y se refrigeraron antes de ser repartidas.

A - Ensayo fluorogénico de peptidasa

Se preparó un tampón Tris de peptidasa (pH 8,0). La solución se ajustó a un pH entre 7 y 9.

Para los sustratos 1-13 de la tabla II anterior se hicieron las siguientes soluciones de sustrato en dimetilsulfóxido (DMSO) en forma de soluciones de aproximadamente 0,1-0,3 mM: los sustratos se obtuvieron de Sigma o Biosynth. Se situaron aproximadamente 5 ml de cada solución en un tubo dosificador. La solución se llevó a 500ml con el tampón Tris-Peptidasa. Para el sustrato 95 se preparó el concentrado TYR mezclando aproximadamente 0,01 a 0,02 g de tirosina (AMC) en 5 ml de DMSO. Par el sustrato 83 se añadieron aproximadamente 8 a 10 mg de prolina (AMC) a aproximadamente 5 ml de DMSO. Cada tubo de dosificación se tapó y se invirtió varias veces después de agitar.

Los sustratos 14-25 de la Tabla VI anterior se prepararon esencialmente igual que los sustratos 1-13, excepto en que los sustratos se diluyeron en un tampón Hepes Peptidasa (pH 8,0). Después de disolver los componentes del tampón se llevó la solución a un pH de aproximadamente entre 7-9.

B - Ensayo fluorogénico de glucosidasa

Los sustratos 26-34 de la Tabla VI anterior se prepararon en forma de disoluciones en DMSO de aproximadamente 0,9 mM a aproximadamente 1,8 mM: cada uno de estos sustratos se obtuvo de Sigma.

Se añadieron aproximadamente 5 ml de cada solución de sustrato a un tubo de dosificación junto con 10 ml de tampón de glucosidasa (véase a continuación). El tampón fosfato potásico de glucosidasa se preparó añadiendo base Trizma y fosfato potásico monobásico a agua desionizada. La solución se mezcló y ajustó a un pH de aproximadamente 7 a 7,8. Aproximadamente 5ml del concentrado se enrasaron con el tampón a aproximadamente 500 ml.

Para el sustrato 70, se preparó un concentrado β GAL añadiendo aproximadamente 0,3 a 0,5 g de MeU- β -D-galactosidasa en aproximadamente 5 ml de DMSO. Para el sustrato 70 se añadieron aproximadamente 2-3 ml de la

ES 2 200 321 T3

solución y se llevaron a un volumen final de aproximadamente 500 ml con el tampón de glucosidasa. Para los sustratos 76 y 77 se prepararon las soluciones madre de azúcar añadiendo aproximadamente 3 a 5 g de manosa o sacarosa en aproximadamente 1 litro de agua.

5 C - Ensayo fluorométrico enzimático de fermentación de azúcar

Para el sustrato 35 de la Tabla VI anterior se preparó una solución madre 2x de arbutina mezclando aproximadamente 1 a 2 g de arbutina (Sigma) en aproximadamente 40 ml de agua desionizada (solución madre ARB). Se pusieron aproximadamente 20 ml de solución madre ARB en un tubo dosificador, dentro del cual se añadieron 12,5 ml de tampón de azúcar junto con 2 ml de solución madre de 4-MeU. La solución se llevó a un volumen final de aproximadamente 500 ml con agua desionizada autoclavada. El tampón de azúcar se preparó mezclando fosfato potásico monobásico, fosfato potásico dibásico, agua de peptona y hasta 1 litro de agua desionizada. Los componentes se mezclaron y se llevaron a un pH de aproximadamente entre 7 y 8. La solución de agua de peptona se hizo mezclando 1 g de agua de peptona en aproximadamente 10 ml de agua desionizada. La solución madre de MeU se preparó mezclando aproximadamente 0,1 g de 4-metilumbeliferona de sodio en 20 ml de agua desionizada. El sustrato 36 es una solución testigo AMC.

Para los sustratos 37-54 de la Tabla VI anterior se hicieron las siguientes disoluciones madre 2x de azúcar de manera individual mezclando aproximadamente 1 a 2 g de los siguientes azúcares en aproximadamente 40 ml de agua desionizada destilada: dulcitol, eritriol, fructosa, galactosa, glicerol, inulina, lactosa, maltosa, melecitosa, ramnosa, ribosa, realosa, turanosa, xilosa o palatinosa. Cada uno de los azúcares se obtuvieron de Sigma.

El sustrato 37 de la Tabla VI anterior se preparó mezclando aproximadamente 1-2 g de ácido múxico en aproximadamente 400 ml de agua desionizada y aproximadamente 2 ml de NaOH 5N. Para el sustrato 50 se preparó una solución madre de almidón 2x (STA) mezclando aproximadamente 0,5 a 1g de almidón (Baker) con Pluronic P-104 (solución al 10%) en aproximadamente 445 ml de agua.

Con la excepción de los sustratos 47 y 50 de la Tabla VI anterior se añadieron aproximadamente 20 ml de cada solución madre 2x de azúcar al tubo dosificador, seguido de aproximadamente 12,5 ml de solución madre básica de azúcar, seguido de 2 ml de solución madre de MeU en agua destilada desionizada hasta aproximadamente 500 ml. Para el sustrato 47 se añadieron aproximadamente 400 ml de solución madre de MUC al tubo dispensador seguidos de aproximadamente 12,5 ml de la solución madre de tampón de azúcar y 2ml de solución madre de MeU. La solución se llevó a aproximadamente 500 ml con agua desionizada destilada y sometida a autoclavado.

35 D - Ensayo fluorométrico de utilización de carbono

Los sustratos 55-60 de la Tabla VI anterior se prepararon haciendo una solución madre de la fuente de carbono apropiada. Cada solución madre se preparó añadiendo aproximadamente 12g de las siguientes fuentes de carbono en aproximadamente 600 ml de tampón base de descarboxilasa: acetamida, ácido benzoico, ácido fórmico, ácido maleico, ácido pirúvico y ácido malónico. Cada una de las fuentes de carbono se obtuvo de Sigma. Se preparó una solución base de descarboxilasa haciendo una solución madre en la que se mezcló aproximadamente 9-10g de extracto de levadura, aproximadamente 70 ml de solución madre 2x de β -metilesculetina, aproximadamente 10-20g de proteasa peptona-3, aproximadamente 300 ml de glicerol al 10%, y aproximadamente 2 a 4g de ácido ftálico (sal de potasio en aproximadamente 2.700 ml de agua desionizada). La solución madre 2x de β -metilesculetina se preparó mezclando aproximadamente 3-4g de 4-metilesculetina en aproximadamente 400 ml de 2-metoxietanol y aproximadamente 600 ml de agua desionizada. Los componentes se disolvieron y se ajustó el pH entre 5 y 6. Para los sustratos 55-60 se añadieron 500 ml de la solución apropiada a un tubo dispensador y se repartieron.

50 E - Ensayos adicionales

Se han descrito una gran variedad de ensayos bioquímicos (véase, por ejemplo Bascomb, S. *supra*, y Manafi, *et al. supra*). Los ensayos adecuados para uso de acuerdo con la presente invención se seleccionan llevando a cabo los procedimientos que aquí se describen. Véase el Ejemplo 3. En las realizaciones preferidas los ensayos adicionales comprenden los siguientes ensayos:

- 55 i) Ureasa - Se ha descrito una gran variedad de procedimientos para detectar ureasa que incluyen la medida de los cambios de pH y la producción de amoníaco. Véase por ejemplo, Godsey *et al.* (1981) *J. Clin. Microbiol.*, 13, 483; y Bascomb, S. *supra*.
- 60 ii) Triptofanasa (Ensayo del indol)- Se han descrito muchos procedimientos para detectar triptofanasa, incluyendo los ensayos colorimétricos y los ensayos basados en la neutralización de la fluorescencia. Por ejemplo, un ensayo de triptofanasa preferido se ha descrito previamente. Véase, por ejemplo, Morris *et al.*, patente de Estados Unidos número 5.173.434, aquí incorporada en su totalidad mediante la referencia. Véase también Bascomb, S. *supra*.
- 65 iii) Esterasa y descarboxilasa - Los ensayos de esterasa se pueden hacer en varios formatos, incluyendo los ensayos de fluorescencia (véase, por ejemplo, Manafi *et al. supra*). Se ha descrito una diversidad de ensayos de descarboxilasas (véase por ejemplo Bascomb, S., *supra*). En una realización preferida se hacen ensayos de ornitin- y lisin-

ES 2 200 321 T3

descarboxilasa ensayando la formación de aminas básicas las cuales aumentan el pH y se detectan mediante un indicador fluorométrico de pH tal como la 4-metilesculetina. En otra realización se hacen ensayos de descarboxilasa en formatos colorimétricos bien conocidos (véase, por ejemplo, MacFaddin, J.F. (1980) *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, 2ª ed., Williams and Wilkins, Baltimore y Londres).

5 En el momento de uso, el sistema de ensayo universal se inocula con aproximadamente 10^4 a 10^8 UFC/ml de la muestra a ensayar y se sitúa en un instrumento Walkaway (W/A), a 35°C. Los datos de la muestra se recogen usando un programa de búsqueda WADEV con tiempos de lectura de 40 minutos (blanco de reacción), 120 minutos y 140 minutos. La densidad del inóculo se ajusta a $0,08 \pm 0,01$ Artel, leyendo después de inocular los pocillos en el panel con un inoculador/hidratador RENOK®. Los resultados del ensayo para cada enzima se desarrollan a través de una matriz ID usando técnicas estadísticas para detectar e identificar microorganismos en la muestra. Una técnica estadística preferida es el análisis de probabilidad Bayesiano. En los ejemplos que siguen, la detección e identificación de las muestras se basa en una base de datos generada previamente usando cultivos puros de especies seleccionadas de levaduras y bacterias.

F - Control de calidad

20 El ensayo de control de calidad se hizo semanalmente en el panel de ensayo universal y diariamente en algunos casos. Se revisó rigurosamente la pureza de todas las placas de subcultivo utilizadas para los aislados de la base de datos y cualquier placa contaminada se volvió a cultivar. Durante el ensayo, cada trabajo hecho para asegurar la calidad de la base de datos, tal como los datos no procesados, se revisó rigurosamente; y cualquier resultado problemático, por ejemplo falta de fluorescencia del pocillo, no adición del reactivo, velocidad de reacción de una cepa particular notablemente diferente de todas las otras de la misma especie, se repitió o confirmó antes de su inclusión en la base de datos.

25 El panel de ensayo universal se ensayó con una diversidad de aislados de control de calidad adecuados, incluyendo los de los paneles de ensayo MicroScan RNID2, RPID, HNID, anaerobio rápido y levaduras. La siguiente tabla IX enumera ejemplos de organismos control de calidad adecuados para uso con el panel de ensayo universal. Los ejemplos adicionales de organismos de control de calidad adecuados incluyen: *K. oxytoca*; *A. baumannii*; *Sh. putrefaciens*; *E. coli*; *A. hydrophila*; *P. vulgaris*; *Ps. fluorescens*; *Ps. aeruginosa*. Se incluye típicamente una solución salina testigo en el panel de ensayo universal para establecer los blancos de reacción para evaluar los resultados del ensayo.

TABLA IX

Panel	Organismo
RNID 3	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 49139 <i>Aeromonas hydrophila</i> AmMS 199 <i>Enterobacter aerogenes</i> AmMS 264 <i>Escherichia Coli</i> ATCC 25922 <i>Klebsiella oxy</i> ATCC 49131 <i>Proteus vulgaris</i> AmMS 105 <i>Shewanella putrefaciens</i> ATCC. 49138
Identificación de anaerobios	<i>Candida perfringens</i> ATCC 13124 <i>C. sordellii</i> ATCC 9714 <i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285 <i>Peptostreptococcus magnus</i> ATCC 29328
Identificación de levadura	<i>C. albicans</i> AmMS 225 <i>C. pseudotropicalis</i> AmMS 226 <i>C. tropicalis</i> AmMS 227 <i>Cryptococcus albidus</i> AmMS 228 <i>Cr. neoformans</i> AmMS 229 <i>Torulopsis glabrata</i> AmMS 231 <i>Cr. uniguttulatus</i> AmMS 234
RPID	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 49134 <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 <i>Ec. durans</i> ATCC 49135 <i>Streptococcus bovis</i> ATCC 49133 <i>St. pneumoniae</i> ATCC 49136

ES 2 200 321 T3

TABLA IX (continuación)

Panel	Organismo
HNID	<i>Neisseria lactamica</i> ATCC 49142 <i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49144 <i>H. paraphrphilus</i> ATCC 49146 <i>B. catarrhalis</i> ATCC 49143 <i>Gardnerella vaginalis</i> ATCC 49145

Ejemplo 2

Construcción de una base de datos

Se puede usar una diversidad de microorganismos tales como levaduras y bacterias para construir las bases de datos adecuadas para usar en el panel de ensayo universal. Por ejemplo, los siguientes grupos de microorganismos se usaron para construir una base de datos adecuada:

Grupo HIND: *Gardnerella vaginalis*; *Haemophilus haemolyticus*; *H. influ Grp I*; *H. influ Grp II*; *H. influ Grp III*; *H. influ Grp IV*; *H. influ Grp V*; *H. influ Grp VI*; *H. influ Grp VII*; *H.p influ Gr I*; *H.p influ Gr II*; *H.p influ Gr III*; *H.p influ Gr IV*; *H. para/aphro*; *H. segnis*; *Branhamella catarrhalis*; *Neisseria cinerea*; *N. flavescens*; *N. gonorrhoeae*; *N. lactamica*; *N. meningitidis*; *N. mucosa*; *N. sp*; *N. sicca*; **Grupo de levaduras:** *Blastoschizomyces capitatus*; *Candida albicans*; *C. catenulata*; *C. guilliermondii*; *C. humicola*; *E. Krusei*; *C. limbica*; *C. lipolytica*; *C. lusitaniae*; *C. parapsilosis*; *C. pseudotropicalis*; *C. rugosa*; *C. stellatoidea*; *C. tropicalis*; *C. tropicalis (sn;)*; *C. zeylanoides*; *Cryptococcus albidus*; *Cr. laurentii*; *Cr. neoformans*; *Cr. uniguttulatus*; *hansenula anomala*; *H. polymorpha*; *Prototheca wickerhamii*; *Rhodotorula glutinis*; *R. rubra*; *Saccharomyces cerevisiae*; *Torulopsis candida*; *T. glabrata*; *T. inconspicua*; *Tricosporou beigeli*; **Grupo gram positivo:** *Listeria monocytogenes*; *Micrococcus kristinae*; *M. luteus*; *M. lylae*; *M. roseus*; *M. sedentarius*; *M. varians*; *Pediococcus sp*; *Staphylococcus arlettae*; *S. auricularis*; *S. capitis*; *S. caprae*; *S. carnosus*; *S. caseolyticus*; *S. chromogenes*; *S. cohnii*; *S. epidermidis*; *S. equorum*; *S. gallinarum*; *S. haemolyticus*; *S. hominis*; *S. hyicus/chromo*; *S. hyicus hyicus*; *S. intermedius*; *S. kloosii*; *S. lentus*; *S. lugdunensis*; *S. saprophyticus*; *S. schleiferi*; *S. sciuri*; *S. simulans*; *S. warneri*; *S. xylosus*; *G. morbillorum*; *Streptococcus agalact-Gp B*; *St. anginosus grp*; *St. bovis*; *St. equinus*; *St. equisimilis St. mitis grp*; *St. mutans*; *St. pneumoniae*; *St. pyogenes*; *St. salivarius*; *St. sanguis I*; *St. zooepidemicus*; *Enterococcus casseliflavus*; *Ec avium*; *Ec. faecalis*; *Ec. fececium*; *Ec. gallinarum*; *Ec. Mundtii*; *Ec. mundtii*; *Ec. raffinosus*; *Ec. solitarius*; y **Grupo anaerobio:** *Bacteroides distasonis*; *Peptostreptococcus anaerobius*; *Bac. fragilis*; *Bac. ovatus*; *Bac. uniformis*; *Bac. ureolyticus*; *Bac. vulgatus*; *Bac. splanchnicus*; *Bifidobacterium dentium*; *Fusobacterium mortiferum*; *Fuso. necroforum*; *Fuso. nucleatum*; *Fuso. varium*; *Porphyromonas asaccharolyt*; *Prevotella bivia*; *Pre. buccae*; *Pre. corporis*; *Pre. melaninogen*; *C. innocuum*; *C. perfringens*; *C. sordellii*; *C. sporogenes*; *Bifidobacterium dentium*; *Eubacterium lentum*; *Eub. limosum*; *Propionibacterium acnes*; *Ps. magnus*; *Veillonella parvula*; *Ps. asaccharolyt*.

Una enumeración de esta base de datos particular es la siguiente: ANAEROBIOS (54 especies), PATÓGENOS (21 especies), ENTEROCOCOS (10 especies), ESTAFILOCOCOS (28 especies), ESTREPTOCOCOS (14 especies), LEVADURAS (42 especies).

Para construir una base de datos usando las especies mencionadas antes de levaduras y bacterias se ensayaron en torno a unos 30 aislados de cada especie (338 aislados) con una batería de ensayos bioquímicos identificados por técnicas estadísticas bien conocidas tales como las descritas en el Ejemplo 3. A los resultados de los ensayos se les da luego formato de base de datos (matriz de probabilidad) que consiste bien en una única base de datos que comprende miembros de todas las familias a identificar o bien en una serie de sub-bases de datos que son específicas de cada familia.

Ejemplo 3

Procedimientos ejemplares de selección de combinaciones de ensayos para el panel de ensayo universal

Los 96 sustratos no redundantes de la Tabla VI se usaron para generar una matriz de probabilidad como se describen a continuación.

La selección de los ensayos enzimáticos para un único grupo de microorganismos, por ejemplo gram negativos, se describe a continuación para ilustrar este procedimiento. El mismo procedimiento se aplicó a los organismos fermentativos, no fermentativos, y a otros grupos representados por especies clínicas comunes.

ES 2 200 321 T3

A) Aislados bacterianos y preparación

Las bacterias con IDS convencionales se ensayaron a partir de cultivos madre de MicroScan.

5 Las cepas madre se subcultivaron dos veces para asegurar la pureza y viabilidad antes del ensayo. La mayoría de los aislados ensayados se hicieron crecer en una placa de agar de crecimiento selectivo (por ejemplo agar MacConkey específico para bacterias gram negativas) incubando durante aproximadamente 18-24 horas a 35°C. Los aislados que no crecen en un tipo de agar de crecimiento selectivo se hacen crecer en otro (por ejemplo agar de tripticosa de soja complementado con una placa de sangre de oveja al 5% durante 18-24 horas en un incubador que no sea de CO₂ a 10 35°C para bacterias gram negativas.

Las suspensiones de bacterias se prepararon en tubos individuales que contenían 6,5 ml de solución salina al 0,4% con Pluronic® equivalente a un estándar Macfarland de 0,5 usando un medidor de turbidez MicroScan. Se reunieron 15 cuatro tubos separados que contienen el mismo aislado en una única bandeja Renok® y se inocularon usando un inoculador rehidratador MicroScan Renok®. Después de la dispensación del inóculo en el panel, se añadieron tres gotas de aceite mineral a los ensayos seleccionados. Luego se colocaron los paneles en el sistema Walkaway para incubación a 35°C dentro de los 30 minutos a partir de la inoculación inicial en los tubos.

B) Recogida de datos y análisis

20 Para los cuatro ensayos se usaron dos sistemas MicroScan®-Walkaway Classic, cuatro sistemas WalkAway® 96, y uno WalkAway® 40 para incubar y leer estos paneles. Los datos se recogieron usando un programa de adquisición de investigación de datos Microscan, que permite recoger más puntos de datos, es decir a 0 minutos, 40 minutos, 120 minutos y 140 minutos, que el programa del sistema de manejo de datos (abreviadamente DMS) que se encuentran en 25 el WalkAway®. Cada instrumento se calibró 2 a 3 veces semanalmente usando un panel de calibración MicroScan. Los datos no procesados, recogidos en forma de unidades de fluorescencia artificial (abreviadamente en inglés AFU) en el programa de búsqueda se transfirieron después a un formato de archivo ASCII a un programa de análisis estadístico (SAS) usando diskettes convencionales.

30 Los ensayos bioquímicos descritos previamente se usaron para generar una base de datos precisa, completa, fiable y de acuerdo con un análisis de probabilidad Bayesiano estándar.

C) Construcción de las matrices de probabilidad

35 El consenso de identificación sucede si la combinación de los ensayos enzimáticos identifica correctamente a nivel de especie (o especies combinadas) con una probabilidad normalizada de $\geq 85\%$ (preferiblemente 90% o 95%) y esta identificación está de acuerdo con la identificación de referencia. Esto se considera "Consenso de especie, Alta Probabilidad". Si la identificación a nivel de especie (o especies combinadas) no se obtiene con una probabilidad $\geq 85\%$, pero la especie correcta aparece como una de las posibles identificaciones de baja probabilidad (2-5 categorías taxonómicas), se considera "Consenso de especie, Baja Probabilidad") y se requieren ensayos adicionales para 40 confirmar la identificación de la especie. En este caso, los ensayos enzimáticos adicionales se hacen para diferenciar completamente las especies que se ensayan.

Las "Identificaciones incorrectas" no cumplieron estos criterios. Se obtiene un "Biotipo muy raro" si la combinación de los ensayos 61 a 96 exhibe desviaciones excesivas de los resultados esperados para el taxón más probable. Una "Identificación de grupo género, Alta Probabilidad" se obtiene si los ensayos enzimáticos no dan una identificación a nivel de especie $\geq 85\%$, pero la suma de las probabilidades de los miembros del mismo grupo/género fue de $> 85\%$.

50 Todos los datos se procesaron y analizaron usando un programa SAS. Los datos no procesados, recogidos durante el ensayo de la base de datos, se convirtieron en valores de velocidad para todos los ensayos excepto para los ensayos del indol y descarboxilasa usando la siguiente ecuación:

$$\text{Velocidad} = \frac{\text{fluorescencia final} - \text{fluorescencia inicial}}{\text{tiempo}} \times 100.$$

55 Para los ensayos de descarboxilasa, se usó la misma ecuación para calcular las velocidades iniciales. Sin embargo, para calcular la velocidad final bien de la ornitin- o bien de la lisin-, la velocidad para la base descarboxilasa se restó. Para los ensayos del indol, se añadió dimetilcinamaldehído (DMCA) tanto al pocillo del ensayo del indol como al pocillo del testigo de fluorescencia a las 2 horas, y se tomó la lectura a 2 horas y 20 minutos. Se asignó una velocidad para este ensayo usando la siguiente ecuación:

$$\text{Velocidad del indol} = \frac{\text{pocillo testigo de fluorescencia} - \text{fluorescencia en el pocillo del indol}}{\text{tiempo}}$$

65 Todos los datos de reacción en blanco y velocidad de reacción se revisaron por si había errores, es decir, entradas duplicadas, errores tipográficos, o resultados erráticos que sugirieran una contaminación microbiológica. Cuando sucedieron errores, se llevó a cabo la repetición o la confirmación del ensayo antes de la inclusión en la base de datos.

ES 2 200 321 T3

Las velocidades de reacción individuales se evaluaron luego para cada aislado de la base de datos. Estos datos cuantitativos de velocidad se transformaron en datos cualitativos para reducir el impacto de la variabilidad inter- e intra- aislados. En general, el perfil de la velocidad de reacción fue bimodal o trimodal para un ensayo específico, es decir, algunas categorías taxonómicas no tienen o tienen bajas velocidades de reacción, mientras que otras categorías taxonómicas tienen valores de velocidad de reacción moderados o altos. Usando un número de técnicas estadísticas y el lenguaje de programación SAS se evaluaron las velocidades de reacción para los ensayos individuales, y se asignó un valor de velocidad numérico (punto de corte) para distinguir entre resultados negativos y positivos. Para la selección de los puntos de corte se consideró para cada ensayo, la “curva de separación” (Gyllenberg, 1963; Rypka *et al.* 1967; Lapage & Bascomb, 1968; La Page *et al.*, 1970) con valores de corte diferentes cuando se consideraban para las velocidades de la totalidad o de parte de las categorías taxonómicas de la base de datos, así como las velocidades observadas con los paneles inoculados con solución salina. Para los resultados de los ensayos bimodales, si la velocidad de reacción de un aislado excedía este valor, el ensayo se puntuaba como un positivo, o si la velocidad de reacción era inferior a este valor, el ensayo se puntuaba como un negativo.

Después de asignar los puntos de corte para los ensayos individuales se convertían los resultados de la combinación de ensayos para gram negativos de un valor cuantitativo a uno cualitativo positivo ó negativo. Después se construyeron los diferentes grupos de matrices de probabilidad (Bascomb *et al.*, 1973) usando diferentes combinaciones de ensayos. Los diferentes grupos de matrices de probabilidad se evaluaron usando el modelo de identificación de probabilidad Bayesiano (Wilcox *et al.*, 1973) por su capacidad para identificar correctamente todos los aislados ensayados y por cómo los ensayos individuales dentro de cada matriz de probabilidad contribuyen a la capacidad de separación, es decir, la capacidad para diferenciar especies. Adicionalmente también se evaluó la facilidad de fabricación de los ensayos, la vida media a largo plazo, capacidad para tolerar la variación en el ajuste del panel, y la eliminación del aceite superficial. Usando todos estos criterios se seleccionaron 36 ensayos que satisficieron las puntuaciones de consenso mencionadas antes (véase, por ejemplo, 61-96, Tabla VI).

A continuación, se evaluó la precisión de los ensayos de combinación. Sobretudo, usando un corte de probabilidad normalizado a 85% para la aceptación de una identificación (“ Identificación de Alta Probabilidad”), el sistema tiene una precisión combinada de 98,8% (93,9% corregida para especies, 1,2% corregida para géneros, y 3,6% corregida para especies con ensayos adicionales) en 2 horas y 20 minutos. El examen de estos mismos datos utilizando un corte de probabilidad normalizado a 90 en vez de 85% dio como resultado un número más pequeño de aislados identificados a nivel de especie (30 aislados - 0,9%) con un aumento concomitante del número de aislados identificados correctamente a nivel de especie que requieren ensayo adicional (33 aislados - 1,1%), pero sin descender significativamente el número de identificaciones incorrectas (cuatro aislados - 0,1%). Por esta razón se eligió una probabilidad de normalizada del 85% como valor de corte para la aceptación de la identificación.

Para aislados importantes clínicamente (que incluyen 24 especies que aparecen con frecuencia), la combinación de los ensayos enzimáticos 61-96 tiene una precisión combinada del 99,4% (97,5% corregida para especies sin ensayos adicionales, 1,0% corregida para géneros, y 0,9% corregida para especies con ensayos adicionales).

Además, los resultados de la base de datos para todas las especies gram negativas fermentativas ensayados con la combinación de ensayos mostraron una precisión del 98,8% (96,5% corregida para especies sin ensayos adicionales, 1,1% corregida para géneros, y 1,2% corregida para especies con ensayos adicionales). Sobretudo, el sistema tuvo una precisión combinada del 98,1% (86,5% corregida para especies sin ensayos adicionales, 1,4% corregida a nivel de género, y 3,7% corregida para especies con ensayos adicionales).

La combinación de ensayos identifica 119 categorías taxonómicas (85 especies fermentativas y 34 especies no fermentativas) en 2 horas y 20 minutos, incluyendo las 24 especies de importancia clínica. Además, sólo el 0,9% de todas las categorías taxonómicas de importancia clínica (menos de 1 por cada 100 aislados encontrados habitualmente en el laboratorio clínico) y 3,7% de todos los aislados en la base de datos requiere ensayos adicionales para una identificación final normal.

REIVINDICACIONES

5 1. Un sistema de ensayo para identificar un microorganismo en una muestra, siendo capaz el sistema de ensayo de identificar ese microorganismo entre grupos de microorganismos ampliamente divergentes que comprenden levaduras y al menos uno de:

- 10 i) bacterias anaerobias,
- ii) bacterias entéricas,
- iii) el grupo de bacterias gram positivas,
- 15 iv) *neisseria* y *Haemophilus*, o
- v) bacterias patógenas,

20 que pueden estar presentes en dicha muestra; y comprendiendo el sistema de ensayo: una combinación predeterminada de ensayos bioquímicos no redundantes dispuestos en un número predeterminado de cámaras de reacción, comprendiendo cada ensayo bioquímico un sustrato para una enzima o grupo de enzimas, y además dando como resultado el sustrato, si actúa la enzima o grupo de enzimas, la formación de un producto detectable en la cámara de reacción; y en el que los productos detectables de la combinación de ensayos bioquímicos se usan para identificar el microorganismo en la muestra usando una matriz de probabilidad.

25 2. Un sistema de ensayo según la reivindicación 1, en el que identificar un microorganismo comprende clasificar el microorganismo en un género o una especie de microorganismo, o ambos.

30 3. Un sistema de ensayo según la reivindicación 1, en el que la combinación predeterminada de ensayos no redundantes comprende ensayos fluorescentes, ensayos colorimétricos, o una combinación de los mismos.

4. Un sistema de ensayo según la reivindicación 3, en el que los ensayos fluorescentes se llevan a cabo en un formato fluorogénico o fluorométrico.

35 5. Un sistema de ensayo según la reivindicación 3, en el que la combinación predeterminada de ensayos no redundantes se lleva a cabo en aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 8 horas.

6. Un sistema de ensayo según la reivindicación 1, en el que la combinación predeterminada de ensayos no redundantes se lleva a cabo a una temperatura entre aproximadamente 25 y aproximadamente 37°C.

40 7. Un sistema de ensayo según la reivindicación 6, en el que los ensayos colorimétricos se leen visualmente o mediante un colorímetro.

8. Un sistema de ensayo según la reivindicación 4, en el que los ensayos fluorescentes se leen usando un fluorímetro.

45 9. Un sistema de ensayo según la reivindicación 1, que comprende al menos un ensayo para detectar una peptidasa, glucosidasa, una enzima de fermentación de un azúcar, una ureasa, una descarboxilasa, una esterasa, una enzima de utilización de carbono, una fosfatasa, o una triptofanasa.

50 10. Un sistema de ensayo según la reivindicación 9, que comprende un ensayo para al menos una peptidasa y al menos una glucosidasa.

11. Un sistema de ensayo según la reivindicación 10, que comprende además un ensayo para al menos una enzima de fermentación de un azúcar.

55 12. Un sistema de ensayo según la reivindicación 11, que comprende además un ensayo para al menos una ureasa.

13. Un sistema de ensayo según la reivindicación 12, que comprende además un ensayo para al menos una descarboxilasa.

60 14. Un sistema de ensayo según la reivindicación 13, que comprende además un ensayo para al menos una esterasa.

15. Un sistema de ensayo según la reivindicación 14, que comprende además un ensayo para al menos una enzima de asimilación de carbono.

65 16. Un sistema de ensayo según la reivindicación 1, en el que la combinación predeterminada de ensayos bioquímicos no redundantes es capaz de identificar un microorganismo entre al menos dos de los siguientes:

ES 2 200 321 T3

bacterias entéricas y no fermentativas;

bacterias anaerobias;

5 levaduras;

Staphylococcus sp., *Streptococcus* sp. y *Enterococcus* sp.; y

bacterias patógenas.

10

17. Un sistema de ensayo según la reivindicación 1, en el que la combinación predeterminada de ensayos bioquímicos no redundantes es capaz de identificar un microorganismo entre al menos uno de los siguientes:

Staphylococcus sp., *Streptococcus* sp. y *Enterococcus* sp.;

15

Corynebacteria sp.;

Lactobacillus sp.

20

Pediococcus sp.

Leuconostococcus sp.

25

Alloicoccus sp.

Vagococcus sp.

Kluyvera sp.

30

Leminorella sp.

Haemophilus sp. y *Neisseria* sp.

Moraxella sp.

35

Salmonella sp.

Clostridia sp. y

40

Listeria sp..

18. Un sistema de ensayo según la reivindicación 1, en el que la combinación predeterminada de ensayos bioquímicos no redundantes es capaz de identificar microorganismos entre al menos uno de: microorganismos anaerobios, levaduras o bacterias patógenas.

45

19. Un sistema de ensayo según la reivindicación 18, en el que la combinación predeterminada de ensayos bioquímicos no redundantes es capaz de identificar microorganismos entre anaerobios y levaduras o bacterias patógenas.

20. Un sistema de ensayo según la reivindicación 19, en el que la combinación predeterminada de ensayos bioquímicos no redundantes es capaz de identificar un microorganismo entre levaduras y bacterias patógenas.

50

21. Un sistema de ensayo según la reivindicación 1, en el que la combinación predeterminada de ensayos bioquímicos no redundantes es capaz de identificar microorganismos entre al menos uno de los *Staphylococcus*, *Streptococcus* o *Enterococcus* y al menos uno entre anaerobios, levaduras, microorganismos entéricos y no fermentativos o bacterias patógenas, o combinaciones de los mismos.

55

22. Un sistema de ensayo según la reivindicación 1, en el que el sistema de ensayo es capaz de identificar entre levaduras, bacterias anaerobias y bacterias patógenas.

23. Un sistema de ensayo según la reivindicación 1, en el que el sistema de ensayo es capaz de identificar *Enterococcus*, *Staphylococcus*, o *Streptococcus*; anaerobios; levaduras; y bacterias patógenas.

60

24. Un sistema de ensayo según la reivindicación 1, en el que los sustratos comprenden lisina (AMC), leucina (AMC), metionina (AMC), glicilprolina (AMC), isoleucina (AMC), trealosa, maltosa, L-triptófano (7-AMC), 4-MeU-fosfato, α -D-xilósido-4MeU, hidroxiprolina-AMC, β -D-glucurónido-4MeU, tirosina (AMC), 4-MeU- β -D-galactósido, manosa, sacarosa, y prolina (AMC).

65

ES 2 200 321 T3

25. Un sistema de ensayo según la reivindicación 24, en el que los sustratos además comprenden fructosa, glicerol, L-histidina 7-AMC, ácido piroglutámico (AMC) y 4-MeU- β -D-glucósido.

26. Un sistema de ensayo según la reivindicación 25, en el que los sustratos comprenden además L-serina 7-AMC, celobiosa, arginina (AMC), y 4-MeU-N-acetil- β -D-galactosamidina.

27. Un procedimiento para identificar un microorganismo en una muestra de entre al menos dos grupos de microorganismos ampliamente divergentes que comprenden las levaduras y al menos uno de:

- 10 i) bacterias anaerobias,
- ii) bacterias entéricas,
- 15 iii) el grupo de bacterias gram positivas,
- iv) *neisseria* y *Haemophilus*, o
- v) bacterias patógenas,

20 que pueden estar presentes en tal muestra mediante el uso de un sistema de ensayo según la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento:

- a) añadir la muestra a cada cámara de reacción que comprende un sustrato;
- 25 b) permitir a la enzima, si está presente, reaccionar con el sustrato;
- c) determinar la presencia de la enzima en la muestra detectando el producto detectable en un ensayo; y
- 30 d) comparar los resultados de la combinación de ensayos predeterminados con al menos un estándar predeterminado para identificar el microorganismo en la muestra.

28. Un ensayo según la reivindicación 1 para detectar la utilización de una fuente de carbono por un microorganismo, comprendiendo levaduras y al menos uno de:

- 35 i) bacterias anaerobias,
- ii) bacterias entéricas,
- 40 iii) el grupo de bacterias gram positivas,
- iv) *neisseria* y *Haemophilus*, o
- v) bacterias patógenas,

45 comprendiendo el ensayo al menos una fuente de carbono y al menos un indicador fluorométrico, actuando el microorganismo sobre la fuente de carbono para producir un cambio en el pH que causa un cambio en la fluorescencia del indicador, siendo el cambio en la fluorescencia indicativo de una utilización de la fuente de carbono por el microorganismo.

50

55

60

65

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.
