



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 038**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/34 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06022204 .9**
96 Fecha de presentación : **02.04.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1754792**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.02.2007**

54 Título: **Nuevos sustratos cromógenos para la detección de hidrolasas.**

30 Prioridad: **02.04.1998 FR 98 04332**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.06.2011

73 Titular/es: **bioMérieux**
376 chemin de l'Orme
69280 Marcy l'Etoile, FR

72 Inventor/es: **Armstrong, Lyle;**
James, Arthur;
Monget, Daniel y
Orenga, Sylvain

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 361 038 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).

DESCRIPCION

Nuevos sustratos cromógenos para la detección de hidrolasas

- 5 La presente invención, se refiere a la evidenciación de enzimas del tipo peptidasas, para la utilización de sustratos cromógenos eficaces. La presente invención, se refiere igualmente a un procedimiento y a un dispositivo de identificación de micro-organismos que son, a la vez, simples y fiables.
- Desde hace muchos años, se utilizan sustratos particulares para permitir la determinación de la presencia o de la ausencia de actividades enzimáticas características de las bacterias. Para la elección de los sustratos, según haya reacción o no, es posible el caracterizar la naturaleza de una clase de bacterias o de diferenciarla de las especies de una clase bacteriana dada.
- 10 Los sustratos sintéticos de enzimas, se encuentran constituidos por dos partes, una primera parte específica de la actividad enzimática a revelar, y una segunda parte que hace la función de marcador, a la cual se la denominará, en la parte que sigue de este documento, como parte marcador.
- Estos sustratos particulares, pueden ser sustratos fluorescentes o cromógenos. De hecho, es la segunda parte o parte marcador que es fluorescente o cromógena, cuando ésta no se encuentra asociada a la primera parte.
- 15 Los sustratos fluorescentes, pueden ser de diferentes composiciones.
- En primer lugar, los sustratos a base de umbeliferona o de aminocumarina y sus derivados sustituidos en la posición 2, los cuales permiten la liberación de un compuesto fluorescente de color variante, del azul al verde, bajo lámpara a ultravioletas (UV)($\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$).
- 20 A continuación, los sustratos a base resorufina (y derivados), en donde existe liberación de un compuesto fluorescente rosa, bajo luz natural ($\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$).
- Finalmente, los sustratos a base de fluoresceína (y derivados), la cual, después de degradación, libera un compuesto fluorescente amarillo, bajo la luz natural ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$).
- Estos sustratos, están poco adaptados a una utilización en medios gelosados (gelificados), y son más útiles en medio líquido.
- 25 Los sustratos cromógenos, pueden igualmente ser de diferentes naturalezas.
- En primer lugar, existen los sustratos a base de indoxil y sus derivados, los cuales, en presencia de oxígeno, producen un precipitado variante del azul al rosa.
- Sus aplicaciones, se encuentran esencialmente limitadas a las osidasas, esterases, y no conciernen a la detección de una actividad peptidasa. Bien adaptadas a una utilización sobre soporte sólido (filtro, gelosa, gel de electroforesis,...), estos se encuentran, en cambio, menos bien adaptados a una utilización en medio acuoso líquido (formación de un precipitado).
- 30 En segundo lugar, existen sustratos a base de hidroxiquinolina o de esculetina y sus derivados, los cuales, en presencia de sales de hierro, producen un precipitado marrón.
- También, otra vez, sus aplicaciones, se encuentran limitadas a las osidasas y esterases. Éstos se encuentran adaptados a una utilización sobre soporte sólido, y poco adaptadas a una utilización en medio acuoso líquido.
- 35 En tercer lugar, existen sustratos a base de nitrofenol y nitroanilina y derivados, en donde se obtienen la formación de un compuesto amarillo.
- Éstos permiten detectar las actividades osidasas y esterases en el caso de sustratos a base de nitrofenol, y actividades peptidasas, en el caso de sustratos a base de nitroanilina. Mientras tanto, en el caso de la detección de actividades peptidasas, la nitroanilina liberada, es tóxica para las bacterias que se desea identificar o caracterizar, lo cual puede ser perjudicial para los análisis en curso o ulteriores. Por otra parte, éstos están poco adaptados a una utilización sobre soporte sólido y, mejor adaptados a una utilización en medio líquido. Además, éstos son poco cromógenos, debido al coeficiente de extinción relativamente débil del color (amarillo), en donde, el contraste, es poco pronunciado en los medios biológicos.
- 40

En cuarto lugar, existen sustratos a base de naftol y naftilamina y sus derivados. En este caso, la reacción, se efectúa en dos tiempos, el naftol o naftilamina liberada mediante la actividad enzimática, sigue un efecto "azo-coupling" (azo-acoplamiento), en presencia de una sal de diazonio que se ajusta en el momento de la revelación, conduciendo a la formación de un compuesto insoluble coloreado.

5 Éstos permiten detectar las actividades osidasas y esterases mediante la intermediación del naftol, y las actividades peptidasas mediante la intermediación de la naftilamina. La reacción "azo-coupling", se efectúa en un medio que es a menudo químicamente agresivo, tóxico para las bacterias y que convierte a la muestra en inutilizable para otros análisis y, además, las naftilaminas, son cancerígenas.

10 Para revelar la naftilamina y, por lo tanto, una actividad peptidasa, es también posible el añadir, al final de la reacción enzimática, p-dimetilaminocinamaldehído en medio ácido, en lugar de una sal de diazonio, siempre con los inconvenientes de toxicidad con respecto a la muestra analizada.

15 La solicitud de patente francesa FR – A – 2 708 286, propone utilizar una mezcla de sustratos cromógenos, proporcionando, cada cromógeno, una coloración particular para una enzima específica, que es diferente de la coloración y de la enzima asociada al otro cromógeno. Cuando las dos coloraciones y, por lo tanto, las dos enzimas, se encuentran presentes, existe formación de una "tercio-coloración".

Esta técnica, no es de todos modos satisfactoria, debido al hecho de que, en función de la reducida concentración de una de las dos enzimas, no es posible detectar esta actividad enzimática la cual se encuentra entonces enmascarada mediante la coloración asociada a la enzima, cuya concentración es preponderante.

20 Finalmente, las solicitudes de patentes estadounidenses US – A – 4.681.841 y US – A – 4.588.836, describen un procedimiento indirecto de detección de una sola actividad enzimática, que utiliza un acoplamiento entre un aminobenceno y un derivado aromático hidroxilado (por ejemplo, el alfa-naftol), acoplamiento éste, el cual engendra la formación de un indicador cromógeno, en presencia de oxidasa. Uno de los dos compuestos (el aminobenceno), entra en la composición del sustrato de partida: si la actividad enzimática investigada se encuentra presente, este compuesto, se liberará y podrá reaccionar con el otro compuesto.

25 No obstante, la presencia de oxidasa, en el medio reactivo, para que sea posible la evidenciación de la enzima buscada, es una absoluta necesidad. No obstante, si bien es cierto que estas informaciones disuaden a la persona experta en el arte especializado de la técnica, de buscar una solución en la que no se utilice oxidasa, el solicitante, por mediación de numerosos tests de ensayo efectuados en estos laboratorios, a probado que es posible el evidenciar la enzima buscada, mediante la utilización de, por ejemplo, del amino-benceno y del α -benceno, sin la adición de oxidasa.

30 Es por lo tanto fácil de comprender, el hecho de que no existe hoy en día, un sustrato no cromógeno, que permita revelar por lo menos dos actividades enzimáticas que sea particularmente eficaz e interesante.

En cuanto a lo concerniente al procedimiento y el dispositivo de identificación, el estado actual de la técnica, se encuentra constituido por un procedimiento de identificación que permite una manipulación en tres etapas:

- 35
- extracción de la colonia a identificar
 - realización de un test de ensayo de orientación, e
 - investigación de colonias parecidas a las observadas y realización de un inóculo.

El test de ensayo de orientación, debe practicarse antes de la utilización de un sistema de identificación.

Éste es particularmente el caso, para la coloración Gram que necesita una observación microscópica.

40 Mientras tanto, esta coloración, no siempre es fácil de realizar y, sobre todo, de interpretar. Por otra parte, el coste que acarrea este test de ensayo queda lejos de no tenerse en consideración.

45 Uno de los objetivos de la presente invención, es por lo tanto el crear el lazo de unión entre un medio de cultivo y los sistemas de identificación y de antibiograma, ofreciendo, a los biólogos, la posibilidad de efectuar un test de ensayo simple en una etapa, permitiendo, a la vez, la confirmación del resultado de la coloración de Gram y la preparación del inóculo. Así, de este modo, se fiabiliza la elección de los tests de ensayo de identificación y de antibiograma.

La solicitud de patente europea EP – A – 0 122 028, propone un procedimiento de colorimetría que permite detectar la presencia de por lo menos una enzima sospechosa de encontrarse presente en una muestra biológica. Ésta

preconiza el preparar un material absorbente montado sobre un soporte rígido, tal como un escobillón, absorbiendo, en este material, por lo menos un sustrato específico de la enzima que se desea detectar. Previamente a su utilización, el material absorbente que contiene el sustrato o los sustratos, se seca.

5 La invención, permite evidenciar, de una forma calorimétrica, las actividades enzimáticas del tipo peptidasa, con la ayuda de sustratos sintéticos a base de dos componentes, así como un nuevo procedimiento, que puede aplicarse a medios reactivos, tanto líquidos como sólidos.

10 Ésta propone, igualmente, un procedimiento y un dispositivo de identificación de microorganismos, que orientan la identificación, y que permiten la recuperación de los citados microorganismos para permitir efectuar un inóculo. Este inóculo, permite utilizar los mismos micro-organismos para una o varias otras etapas, tales como una identificación, un antibiograma.

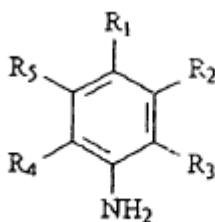
15 Después de la hidrólisis de los sustratos, la detección de las actividades enzimáticas, se basa en la formación de un complejo coloreado, a partir de un acoplamiento oxidante de los dos compuestos precedentemente citados. El acoplamiento oxidante, puede facilitarse mediante un oxidante añadido al medio reactivo o producto, en el momento de un procedimiento metabólico, en el seno de este medio, o de una forma más simple, mediante la presencia de oxígeno endógeno en este mismo medio.

20 Según una primera interpretación, la presente invención, se refiere a una asociación de dos entidades distintas, siendo, una de ellas, una molécula no cromógena y, siendo, la otra, el sustrato que permite detectar la presencia de la actividad enzimática de por lo menos una enzima. El sustrato, se caracteriza por el hecho de que, éste, se encuentra constituido por una parte específica de la enzima, y por una molécula no cromógena, diferente de la primera, que constituye la parte marcador del sustrato; las dos moléculas no cromógenas, reaccionan conjuntamente, cuando éstas son en forma libre, y pueden generar una molécula cromógena.

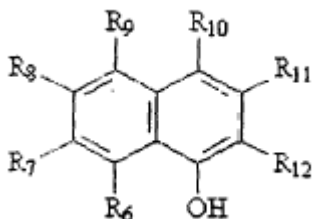
25 A dicho efecto, la presente invención, pone en práctica un sustrato cromógeno, que permite detectar la presencia de la actividad enzimática de por lo menos una enzima, caracterizado por el hecho de que, éste, se encuentra constituido por menos por dos moléculas, constituida, una primera molécula, por una parte marcador, no cromógena, asociada a por lo menos una parte específica diana de la enzima, y una segunda molécula, constituida por otra sustancia no cromógena, y que, la parte marcador, no cromógena, una vez liberada, reacciona con la primera molécula, para formar una molécula cromógena.

Según la invención, la parte marcador, no cromógena de la primera molécula, se encuentra constituida por aminobenceno, o por uno de sus derivados:

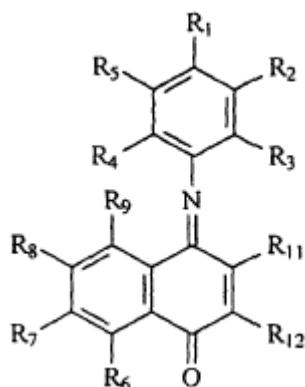
30



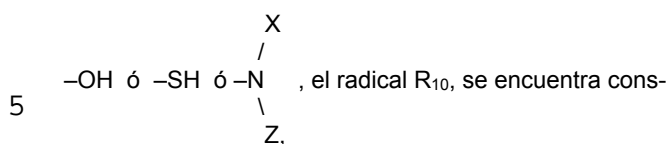
la parte marcador no cromógena de la segunda molécula, se encuentra constituida por α -naftol o uno de sus derivados:



y la molécula cromógena obtenida, se encuentra constituida por:

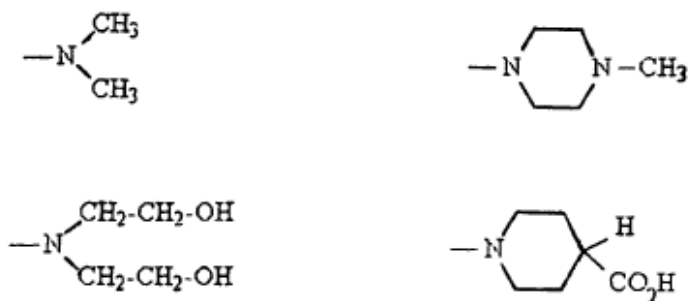


Fórmulas en las cuales, el radical R₁, se encuentra constituido por



tituido por -H ó por un átomo, tal como -Br, -Cl, -I, ó un grupo de átomos, tal como -SH, el cual puede retirarse durante el acoplamiento oxidante, y cada radical R₂ a R₉, R₁₁ ó R₁₂, se elige de entre -H, -OH, -Br, -Cl, -I, -CH₃, -CH₂CH₃, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -COOH.

10 En el caso del radical R₁, X, y/ó Z, se encuentra constituido por -H, u otros sustituyentes más complejos, tales como -CH₃, -CH₂CH₃,



Según la presente invención, el procedimiento de detección de una actividad enzimática por mediación de substratos, tales como los que se describen abajo, a continuación, consiste en:

- 15 - poner por lo menos un sustrato descrito anteriormente, arriba, en presencia de por lo menos un tipo de microorganismos, tales como bacterias, contenido en una muestra a someter a test de ensayo, sin la adición de oxidasa,
- esperar que la(s) bacteria(s) hidrolize(n) los substratos, y
- detectar las actividades enzimáticas basadas en la formación de un complejo coloreado a partir del acoplamiento oxidante de las dos partes marcador.

20 Otro objeto de la presente invención, es el de proponer un procedimiento, en el cual, las moléculas, se encuentran presentes en un material absorbente, y se ponen en contacto con la muestra, y, después de la detección, los microorganismos de esta forma extraídos, se vuelven a poner en suspensión, con el fin de permitir análisis ulteriores (identificaciones, antibiogramas, etc.).

Las moléculas y otros compuestos que entran en la composición reactiva contenida en el material absorbente, son:

- 25 - la primera molécula constituida por amino-benceno o uno de sus derivados, asociado a por lo menos una parte específica diana de la enzima, y

- la segunda molécula, constituida por α -naftol ó uno de sus derivados.

La composición reactiva, contiene igualmente un oxidante, tal como el ferricianato de potasio.

Entre los otros compuestos, es posible el tener igualmente un activador da la reacción, tal como una reducida cantidad de la primera molécula y / o de la segunda molécula presente(s) en la muestra a someter a test de ensayo.

- 5 Siempre entre los otros compuestos, es posible que la constitución contenga un ligante o cola, tal como la polivinilpirolidona (PVP).

El procedimiento, puede utilizarse para identificar el Gram de una especie bacteriana a someter a test de ensayo y, en este caso, la primera molécula se encuentra constituida por AlaDMpPD, y la segunda molécula, se encuentra constituida por α -naftol.

- 10 Adicionalmente, además, la composición de la mezcla reactiva absorbida por el material absorbente, es la siguiente:

- α -naftol de 0,01 a 5 g/l, de una forma preferente, de 0,1 a 1 g/l y, por ejemplo, 0,5 g/l,
- ferricianato de potasio de 0,01 g a 5 g/l, de una forma preferente, de 0,1 a 1 g/l y, por ejemplo, 0,5 g/l, y
- AlaDMpPD de 0,01 a 5 g/l, de una forma preferente, de 0,1 a 1 g/l, y por ejemplo, 0,35 g/l.

- 15 Según una variante, el activador, se encuentra constituido por Ala-DMpPD, a una concentración de 0,01 g a 0,5 g/l, de una forma preferente, de 0,05 a 0,1 g/l y, por ejemplo, de 0,075 g/l.

Según una variante, la composición, comprende, además, de 1 a 50 g/l de PVP, de una forma preferente, de 10 a 25 g/l de PVP y, por ejemplo, 15 g/l de PVP.

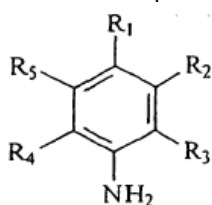
- 20 Un dispositivo de identificación que permite la puesta en práctica del procedimiento de identificación anteriormente descrito, arriba, se encuentra constituido por un soporte, por ejemplo, de plástico, el cual es inerte con respecto al material absorbente del substrato o de los substratos, que éste contiene, y / o con respecto a la muestra sometida a test de ensayo, sobre el cual se encuentra montado un cabezal de material absorbente, tal como la viscosa.

I - Nuevos substratos cromógenos y procedimiento de utilización

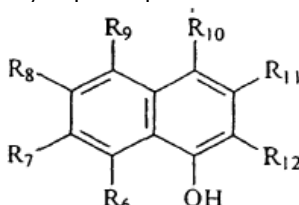
La invención que se describirá a continuación, se refiere a algunas formas de realización particulares de la invención.

- 25 El substrato cromógeno, que permite detectar la presencia de la actividad enzimática de por lo menos una enzima, se encuentra constituida por lo menos por dos moléculas, encontrándose constituida, una primera molécula, de una parte marcador no cromógena, asociada a por lo menos una parte específica diana de la enzima, y una segunda molécula, constituida por otra substancia no cromógena. La parte marcador no cromógena, una vez liberada, reacciona con la segunda molécula, para formar una molécula cromógena.

- 30 En el caso de una revelación de una sola actividad enzimática, existen dos moléculas no cromógenas, es decir, una primera molécula que tiene una parte específica de la actividad enzimática a revelar y una parte marcador, mientras que, la segunda molécula, sólo se encuentra constituida por la parte marcador. Las dos partes marcador, se encuentran respectivamente constituidas por los compuestos I y II que se presentan abajo, a continuación.

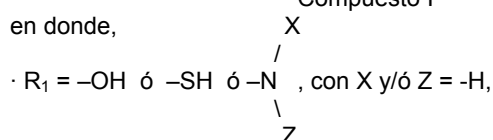


Compuesto I

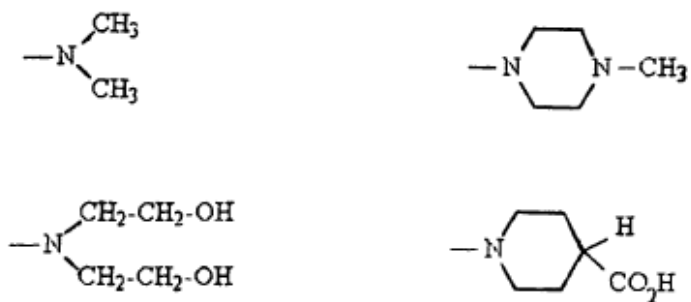


Compuesto II

- 35 en donde,



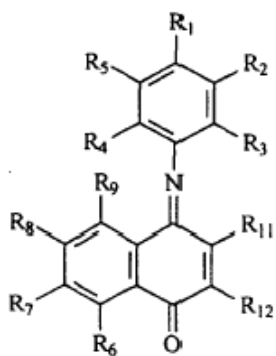
- 40 u otros sustituyentes más complejos, como CH_3 , $-CH_2CH_3$, CH_2CH_3 ,



· R₁₀ = -H ó un grupo o átomo que puede retirarse durante el acoplamiento oxidante, como -Br, -Cl, -I, -SH, etc.

· R₂, R₃, R₄, R₅, R₇, R₈, R₉, R₁₁ y R₁₂ = -H, -OH, -Br, -Cl, -I, -CH₃, CH₂CH₃, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -COOH.

El compuesto III, obtenido mediante la combinación de dos compuestos I y II, es por lo tanto el siguiente:

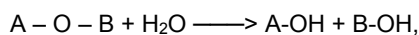


Compuesto III

5 Para comprender la invención, se recuerda que la fórmula de un sustrato enzimático hidrolasa, puede esquematizarse bajo la forma:

· A – O – B, si se trata de un sustrato de osidasa, de fosfatasa, o de esterasa o de sulfatasa.

La hidrólisis enzimática, puede entonces escribirse:



10 con, según la invención:

A-OH = osa, fosfato, sulfato, ácido graso (después del más simple, es decir, el ácido acético), y

B-OH = compuesto I con R₁ = -OH ó compuesto II.

· A-CO-NH-B, si se trata de un sustrato de peptidasa.

La hidrólisis enzimática, puede entonces escribirse:

15 A-CO-NH-B + H₂O \longrightarrow A-COOH + B-NH₂,

con, según la invención:

A-COOH = aminoácido o cadena de aminoácidos terminados o no por un agente bloqueante, y

B-NH₂ = compuesto I.

El procedimiento utilizado en concordancia con la presente invención, por una parte, un sustrato enzimático, tal como se describe anteriormente, arriba, a base de un compuesto 1 derivado del aminobenceno, con R₁ = -OH, por otra parte, un agente de revelación inicialmente presente en el medio reactivo, o que puede añadirse durante o después de la reacción enzimática, siendo, este agente:

el compuesto II para la evidenciación del compuesto 1 resultante de la hidrólisis enzimática de los sustratos a base de este primer compuesto.

La formación, en el medio reactivo, del complejo coloreado III (derivado del indofenol), a partir del acoplamiento oxidante de I y II, permite decelerar la hidrólisis del sustrato y, por lo tanto, la actividad enzimática implicada.

10 El color del compuesto III, depende de los sustituyentes sobre los compuestos I y II.

Éste es por ejemplo un color púrpura, si R₁ = -OH, y R₂ a R₁₁ = -H, o azul, en el caso en donde, R₁ = -OH, R₂ y R₅ = -Cl, y R₅ a R₁₁ = -H.

15 El procedimiento de esta forma descrito, es en particular extremadamente interesante, para decelerar colorimétricamente las actividades del tipo peptidasas. En efecto, según el estado anterior de la técnica, la elección de las reacciones coloreadas, se limitaba a la utilización de los sustratos a base de nitroanilina, poco cromógena, y de sustratos a base de naftilamina, muy tóxica, que necesitaban la adición de un reactivo, al final de la reacción (sal de diazonio, por ejemplo), para decelerar la amina liberada.

La invención, pone en práctica un nuevo tipo de sustratos de peptidasas, a base de aminobenceno o derivados (compuesto I).

20 Este último, a medida que se libera en el medio reactivo, en el momento de la hidrólisis enzimática, forma un complejo fuertemente coloreado (rojo a azul, generalmente), mediante acoplamiento oxidante con el α -naftol o un derivado (compuesto II), presente en este medio.

La reacción de acoplamiento, puede igualmente obtenerse al final del test de ensayo, si la adición del compuesto II, interviene al término de la reacción enzimática.

25 Otra aplicación de los sustratos descritos, que no pertenece a la invención, consiste en asociar dos sustratos en el medio reactivo, según el procedimiento, uno a base del compuesto I, y el otro a base del compuesto II.

30 Se pueden imaginar, de este modo, todos los tipos de combinaciones de detección simultánea de dos actividades enzimáticas (por ejemplo, una peptidasa y una osidasa, una esterasa y una osidasa, dos osidasas, etc.). En este caso, habrá la formación del complejo coloreado III únicamente, si los dos sustratos están hidrolizados. Esta combinación, puede ser útil para los tests de ensayo de diagnóstico que requieren una gran especificidad, especialmente, cuando se trata de caracterizar micro-organismos.

Uno de los ejemplos citados, ilustra el interés de esta detección simultánea de dos actividades enzimáticas en el sector de la identificación de las bacterias.

35 Es también posible, el proporcionar una doble funcionalidad al compuesto. Es en efecto posible el injertar químicamente, sobre el compuesto I, por una parte sobre el grupo -NH₂, un aminoácido o una cadena de aminoácidos terminados o no por un agente bloqueante y, por otra parte, sobre R₁, si se trata de un grupo hidroxilo (-OH), una osa, un fosfato o un ácido graso. Se obtiene una molécula que puede calificarse de doble sustrato, la cual, para generar el compuesto I en el estado libre, en el medio reactivo, debe hidrolizarse mediante dos actividades enzimáticas distintas, por una parte, una peptidasa y, por otra parte, una oxidasa, fosfatasa o esterasa, según la naturaleza del producto injertado sobre R₁.

Así, de este modo, en presencia del compuesto II, el complejo coloreado III, no puede obtenerse más que si, las dos actividades enzimáticas, se encuentran presentes. El interés de estos sustratos de doble funcionalidad, reside en su especificidad muy grande, la cual puede aprovecharse, para caracterizar micro-organismos, por ejemplo.

45 En el mismo sentido, se puede concebir una mezcla de un sustrato de doble funcionalidad, a base del compuesto I, tal como se ha descrito anteriormente, arriba, y un sustrato a base del compuesto II, para la investigación o búsqueda de otra osidasa, fosfatasa o esterasa. En este caso, la producción del producto coloreado III, necesita la presencia simultánea de tres actividades enzimáticas, con el fin de liberar los compuestos I y II. Dos actividades

enzimáticas, permiten hidrolizar la molécula a base del compuesto I, una actividad enzimática, permite hidrolizar la molécula a base del compuesto II. Se aumenta así todavía la especificidad del test de ensayo.

5 Según la invención, es también posible el combinar diferentes tipos de sustratos en el mismo medio reactivo, en particular, sustratos conocidos en el arte anterior de la técnica, y sustratos según el procedimiento reivindicado. Esto permite poner en práctica diferentes reacciones coloreadas y, por lo tanto, revelar, al mismo tiempo, varias actividades enzimáticas, en el seno del mismo medio reactivo.

La invención, puede aplicarse a la investigación o búsqueda de actividades enzimáticas en diferentes tipos de muestras, biológicas o no.

10 Ésta puede igualmente utilizarse para caracterizar micro-organismos, como bacterias o levaduras. Los tests de ensayo enzimáticos, pueden entonces practicarse en medio líquido, en tubos individuales, o en soportes compartimentados, como las placas de microtitrimetría, por ejemplo. Éstos pueden igualmente practicarse en medio gelosado (en placas de Petri, por ejemplo), con coloración de las colonias que producen las actividades enzimáticas investigadas.

15 La presente invención, se refiere, por lo tanto, a un procedimiento de detección de por lo menos dos actividades enzimáticas, mediante la intermediación de sustratos, tal y como se describen anteriormente, arriba, el consiste en:

- poner los sustratos en presencia de por lo menos un tipo de bacterias,
- esperar que las bacterias hidrolicen los sustratos, y
- detectar las actividades enzimáticas basadas en la formación de un complejo coloreado a partir del acoplamiento oxidante de dos partes marcador.

20 El acoplamiento oxidante, se facilita mediante bien ya sea:

- la adición de por lo menos un oxidante en el medio reactivo,
- la producción, en el momento de un proceso metabólico, en el seno de este medio reactivo, de por lo menos un oxidante,
- la presencia de oxígeno endógeno en el citado medio reactivo.

25 Los ejemplos que se facilitan abajo, a continuación, permitirán el comprender mejor la invención. Éstos se refieren únicamente al sector de bacteriología, pero está claro que, el procedimiento, puede aplicarse a todos los otros sectores de la enzimología, que implican la investigación o búsqueda de hidrolasas.

Ejemplo 1

Detección de la β -glucosidasa en medio líquido (método 1) (no perteneciente a la invención)

30 El medio reactivo propuesto en este ejemplo tiene, como formulación:

·peptona de carne	10 g
·NaCl	5 g
· α -naftil- β -D-glucopiranosido	0,5 g
·4-aminofenol	50 mg
35 ·H ₂ O	1000 mg
·pH	7,0

Esta medio, se esteriliza mediante filtración, sobre Millipore 0,22 μ , y se reparte en tubos estériles a razón de 5 ml por tubo.

El test de ensayo de investigación de la β -glucosidasa, se practica sobre 4 capas cultivadas, durante un transcurso de tiempo de 24 horas, a una temperatura de 35 – 37°C, sobre gelosa Trypticasa-Soja. Estas cepas, pertenecen exclusivamente a las especies:

- Escherichia coli,
- 5 - Staphilococcus sciuri,
- Streptococcus pyogenes,
- Enterococcus faecalis.

A partir de los cultivos anteriores, se realizan suspensiones acuosas ajustadas a 0,5 McFarland.

- 10 Se utilizan 100 microlitros de estas suspensiones, para sembrar cuatro tubos de medio reactivo, correspondiendo, cada tubo, a una cepa.

Los tubos tapados, se incuban a una temperatura de 35 – 37°C, durante un transcurso de tiempo de 18 a 24 horas.

Después de la incubación, se observa la aparición de una coloración púrpura, correspondiente a la formación del complejo indofenol, y traduciendo la presencia de una actividad β -glucosidasa.

Los resultados obtenidos, son los siguientes:

15

Cepa	Resultado teórico Esperado	Resultado obtenido
E. coli	-	-
S. sciuri	+	+
S. pyogenes	-	-
E. faecalis	+	+

Ejemplo 2

Detección de la β -glucosidasa en medio líquido (método 2): (no perteneciente a la invención)

El medio reactivo propuesto en este ejemplo tiene, como formulación:

- 20
- peptona de carne 10 g
 - NaCl 5 g
 - α -naftol 50 mg
 - 4-aminofenil- β -D-glucopiranosido 0,5 g
 - H₂O 1000 mg
 - 25 ·pH 7,0

La preparación del medio, la elección de las cepas sometidas a test de ensayo, y la práctica del test de ensayo, son idénticas a las del procedimiento descrito en el ejemplo 1.

La aparición de una coloración púrpura, debida a la formación del complejo indofenol, indica la presencia de una actividad β -glucosidasa.

- 30 Los resultados obtenidos, son los siguientes:

Cepa	Resultado teórico esperado	Resultado obtenido
E. coli	-	-
S. sciuri	+	+
S. pyogenes	-	-
E. faecalis	+	+

5 Estos resultados, muestran el hecho de que es posible el detectar una actividad del tipo osidasa, procediendo a utilizar, según la invención, de la misma forma, tanto un substrato a base del compuesto I, como un substrato a base del compuesto II. Sería lo mismo, para investigar las actividades de los tipos esterases o fosfatasas.

Ejemplo 3

Detección de la piroglutamil-aminopeptidasa en medio líquido:

El medio reactivo propuesto en este ejemplo tiene, como formulación:

- peptona de carne 10 g
- 10 ·NaCl 5 g
- α-naftol 50 mg
- L-piroglutamil-4-amino-2,6-diclorofenol 0,5 g
- H2O 1000 mg
- pH 7,0

15 La preparación del medio, la elección de las cepas sometidas a test de ensayo, y la práctica del test de ensayo, son idénticas a las del procedimiento descrito en el ejemplo 1.

La aparición de una coloración azul, debida a la formación del complejo indofenol, evidencia una actividad piroglutamil-aminopeptidasa. Debe tomarse debida nota del hecho de que, la tonalidad azul, resulta de la presencia de los grupos cloros, en posición 2 y 6, sobre el 4-aminofenol.

20 Los resultados obtenidos, son los siguientes:

Cepa	Resultado teórico esperado	Resultado obtenido
E. coli	-	-
S. sciuri	-	-
S. pyogenes	+	+
E. faecalis	+	+

Ejemplo 4

Investigación combinada de dos actividades enzimáticas según el procedimiento de la invención. Aplicación a la detección simultánea de la β -glucosidasa y la piroglutamil-aminopeptidasa: (no perteneciente a la invención)

5 El medio reactivo propuesto en este ejemplo tiene, como formulación:

- peptona de carne 10 g
- NaCl 5 g
- L-piroglutamil-4-amino-2,6-diclorofenol 0,5 g
- H₂O 1000 mg

10 ·pH 7,0

La preparación del medio, la elección de las cepas sometidas a test de ensayo, y la práctica del test de ensayo, son idénticas a las del procedimiento descrito en el ejemplo 1.

15 La aparición de una coloración azul, debida a la formación del complejo indofenol, no es posible, más que, si los dos substratos, se encuentran hidrolizados. Ésta traduce por lo tanto una combinación de las actividades β -glucosidasa y piroglutamil-aminopeptidasa, en el mismo medio reactivo. La ausencia de una de las actividades, impide la formación del complejo coloreado.

Los resultados obtenidos, son los siguientes:

Cepa	Resultado teórico	Resultado obtenido
	Esperado	
E. coli	-	-
S. sciuri	-	-
S. pyogenes	-	-
E. faecalis	+	+

20 Este ejemplo, ilustra claramente una de las ventajas de la invención, permitiendo una mayor selectividad en la caracterización de los microorganismos (E. faecalis, en esta aplicación).

Ejemplo 5

Caracterización de las bacterias en medio gelosado, mediante la investigación simultánea de las actividades β -galactosidasa (β GAL) y L-alanina-aminopeptidasa (Ala): (no perteneciente a la invención)

25 A un medio tripticasa gelosado, se le añaden α -naftil- β -D-galactopiranosido y L-alanil-N,N'-dimetil-p-fenilen-diamina-naftaleno-sulfonilhidrazina. Este substrato, de deriva del compuesto I según la invención.

El medio, se reparte y se siembra de la siguiente forma:

- seis placas con cultivos puros:
 - Escherichia coli [β GAL (+), Ala(+)]
 - Klebsiella pneumoniae [β GAL (+), Ala(+)]

- Salmonella typhimurium [β GAL (-), Ala(+)]
- Pseudomonas aeruginosa [β GAL (-), Ala(+)]
- Staphylococcus xilosus [β GAL (+), Ala(-)]
- Candida albicans [β GAL (-), Ala(-)]

5 ·dos placas, con las mezclas de las cepas E. coli / S. xylosus y S. typhimurium / C. albicans.

Los medios, se incuban a una temperatura de 35 – 37°C. Después de un transcurso de tiempo de 18 – 24 horas de incubación, solamente las placas que contienen las cepas de E. coli y K. pneumoniae [β GAL (+), Ala(+)], presentan colonias coloreadas en azul.

10 Con la mezcla E. coli / S. xylosus, solamente las colonias de E. coli son azules, permaneciendo incoloras las de S. xilosus.

De la misma forma que en el ejemplo 4, la producción del complejo coloreado III, a base de indofenol, tiene por lo tanto la necesidad de la presencia conjunta de dos actividades enzimáticas, aquí, la β -galactosidasa y la L-alanina-aminopeptidasa.

15 Por el contrario, la presencia de solamente una o de ninguna de estas dos actividades, no conlleva la formación del complejo coloreado.

Tal y como es el caso en el ejemplo 5, la elección de un derivado apropiado de la fenilén-diamina, permite obtener una coloración que permanece en las proximidades inmediatas de las colonias, y así, de este modo, el distinguir dos poblaciones diferentes en la mezcla.

20 Este ejemplo, muestra que es posible, según la invención, el colorear específicamente las colonias, en la superficie de un medio gelosado, y así, por lo tanto, el caracterizarlas. En el presenta caso, podría aplicarse a la detección de las bacterias coliformes, las cuales son bacillos de Gram negativo, que poseen las dos actividades β -galactosidasa y L-alanina-aminopeptidasa.

Ejemplo 6

25 **Investigación combinada de tres actividades enzimáticas según el procedimiento de la invención. Aplicación a la detección simultánea de la β -glucosidasa (β GAL), de la β -glucosidasa (β -GLU) y de la L-alanina-aminopeptidasa (Ala):(no perteneciente a la invención)**

El medio reactivo propuesto en este ejemplo tiene, como formulación:

·peptona de carne	10 g
·NaCl	5 g
30 · α -nafil- β -D-glucopironósido	0,5 g
·L-piroglutamil-4-amino-2,6-diclorofenil- β -D-galactopiranósido	0,5 g
·H ₂ O	1000 mg
·pH	7,0

La preparación del medio, es idéntica a la del procedimiento descrito en el ejemplo 1.

35 El test de ensayo de investigación, de las 3 actividades enzimáticas, se practica sobre 5 cepas cultivadas, durante un transcurso de tiempo de 24 horas, a una temperatura de 35 – 37°C, sobre gelosa Triticasa-Soja. Estas cepas, pertenecen, respectivamente, a las especies:

Eschrichia coli [β GAL (+), β GLU (-), Ala(+)]

Klebsiella pneumoniae [β GAL (+), β GLU (+), Ala(+)]

Salmonella typhimurium [β GAL (-), β GLU (-), Ala(+)]

Stenotrophomonas maltophilia [β GAL (-), β GLU (+), Ala(+)]

Staphylococcus saprophyticus [β GAL (+), β GLU (-), Ala(-)].

- 5 La aparición de una coloración azul, debida a la formación del complejo indofenol, no es posible, más que, si los 3 substratos, se encuentran hidrolizados. Ésta traduce por lo tanto una combinación de las actividades β -glucosidasa β -glucosidasa y L-alanina-aminopeptidasa, en el mismo medio reactivo, tal y como es el caso para la cepa de K. pneumoniae. La ausencia de una de las actividades, impide la formación del complejo coloreado.

Los resultados obtenidos, son los siguientes:

Cepa	Resultado teórico Esperado	Resultado obtenido
E. coli	-	-
K. pneumoniae	+	+
S. typhimurium	-	-
S. maltophilia	-	-
S. saprophyticus	-	-

- 10 Este ejemplo, muestra, otra vez, las potencialidades de la invención, para poner en práctica tests de ensayo altamente selectivos.

Los seis ejemplos citados, describen únicamente tests enzimáticos según la invención.

En el bien entendido, es posible el combinar éstos a otros tests de ensayo conocidos el arte especializado de la técnica anterior, utilizando substratos cromogénicos o fluorogénicos.

15 II -Procedimiento y dispositivo de identificación

El principio del medio, utilizado con el procedimiento y el dispositivo de identificación, se basa en la utilización de los substratos emparejados, anteriormente descritos, arriba.

- 20 Según un ejemplo representativo, el procedimiento de identificación de los GRAM, utiliza un substrato a base de amino-benceno, o uno de sus derivados, tal como la dimetil-parafenilendiamina (DMpPD). En el ejemplo que se presenta a continuación, el substrato, se encuentra constituido por la alanina-dimetil-parafenilen-diamina (AlaDMpPD). La actividad evidenciada, es por lo tanto la alanina-aminopeptidasa, actividad específica de las bacterias a Gram negativo.

- 25 Su funcionamiento, es el siguiente. Existe, mediante hidrólisis enzimática, liberación del grupo DMpPD. A continuación, el DMpPD, se une con el α -naftol (o un derivado), mediante acoplamiento oxidante facilitado por un oxidante, el ferricianato de potasio (K₃Fe(CN)₆). Existe entonces formación de un complejo coloreado gris violeta.

En un primer tiempo, el dispositivo, se define de la forma siguiente:

un medio biogelytone, que contiene el substrato AlaDMpPD, y

un escobillón impregnado de una mezcla reactiva constituida por α -naftol y ferricianato de potasio.

- 30 Se ha definido otro dispositivo, el cual es aún más específico en la identificación del Gram y que es también utilizable con las gelosas con sangre del tipo Columbia. Éste consiste en:

- un medio constituido por una gelosa con sangre del tipo Columbia (con o sin AlaDMpPD), y

- una mezcla reactiva que impregna un escobillón y que se encuentra constituida a base de α -naftol, de ferricianato de potasio y de AlaDMpPD y que después se seca.

Esta mezcla reactiva contenida por el escobillón, se mejoró todavía más, mediante la adición de una etapa de secado de los escobillones, lo cual facilita su manipulación ulterior.

5 La composición exacta, es la siguiente:

·para la gelosa:

presencia o no de AlaDMpPD a 0,075 gramos por litro, y

·para el escobillón:

- α -naftol de 0,01 a 5 g/l, de una forma preferente, de 0,1 a 1 g/l y, por ejemplo, 0,5 g/l,

10 - ferricianato de potasio de 0,01 a 5 g/l, de una forma preferente, de 0,1 a 1 g/l y, por ejemplo, 0,5 g/l, y

AlaDMpPD de 0,01 a 5 g/l, de una forma preferente, de 0,1 a 1 g/l y, por ejemplo, 0,35 g/l.

Los resultados obtenidos, en términos de sensibilidad y especificidad, se obtienen entonces de una forma mejor. En este caso, la detección de la reacción, no es instantánea. Debe esperarse de 15 a 30 segundos (s), para observar la aparición de una eventual coloración, tiempo necesario para la hidrólisis del sustrato para la aminopeptidasa bacteriana.

15

Se procedió a someter a test de ensayo sesenta y una cepas, sobre diferentes medios, tales como: gelosa, chocolate Polyvitex (marca registrada), medio CPS ID2 (marca registrada), TSA +/- sangre y Columbia +/- sangre, test de ensayo éste que se realizó con escobillones impregnados con α -naftol, ferricianato de potasio y AlaDMpPD y, a continuación, se secaron. Este estudio, mostró el hecho de que, el sistema, era compatible con la mayoría de los medios convencionales y cromogénicos usuales.

20

Para mejorar todavía más el tiempo de reacción, en el medio, se incorpora un activador de la reacción.

En este contexto de activación de la reacción, se ha verificado el hecho de que, la adición en el medio, de una reducida cantidad de AlaDMpPD y/o de α -naftol, permite la detección de la reacción, sin disminuir la sensibilidad. Además, el tiempo de detección, disminuye así, de esta forma, de una modo considerable, debido al hecho de que, éste, se lleva de 0 a 10 segundos. Esta reducida cantidad, corresponde a una concentración de 0,01 a 0,5 g/l, de una forma preferible, de 0,05 a 0,1 g/l y, por ejemplo, de 0,075 g/l.

25

Según una variante de realización, es igualmente posible el añadir ligante sobre el escobillón. El aporte de ligante, permite, a la vez, apretar las fibras del cabezal del escobillón, y limitar la liberación de los productos presentes en el escobillón, en la suspensión del inóculo. Un ligante de este tipo, puede estar constituido por la polivinilpirrolidona (PVP), la cual puede no únicamente responder a los criterios precedentes, sino también, aumentar sensiblemente la especificidad. En la composición precedentemente descrita, con las concentraciones, el PVP, se introduce en los constituyentes del cabezal de viscosa del escobillón, en una concentración comprendida dentro de unos márgenes que van de 1 a 50 g/l, de una forma preferible, de 10 a 25 g/l, y por ejemplo, de 15 g/l.

30

1°) Experimentación

35 Se procedió, por lo tanto, a realizar una evaluación sobre ciento treinta y tres (133) cepas repartidas según las especies siguientes. La tabla 1, la cual se facilita a continuación, enumera las especies sometidas a test de ensayo, así como el número de cepas para cada especie.

Tabla 1

Especies sometidas a test de ensayo y número de cepas para cada especie

Especie	Numero de cepas
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2
<i>Acinetobacter junii</i>	2
<i>Citrobacter freundii</i>	3
<i>Citrobacter spp</i>	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	3
<i>Enterobacter intermidis</i>	1
<i>Enterobacter spp</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	4
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4
<i>Morganella morganii</i>	4
<i>Proteus mirabilis</i>	5
<i>Proteus vulgaris</i>	5
<i>Providencia stuartii</i>	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5
<i>Serratia marcescens</i>	4
<i>Bacillus cereus</i>	4
<i>Bacillus lentus</i>	1
<i>Bacillus mycoides</i>	2
<i>Bacillus subtilis</i>	2
<i>Corynebacterium aquaticum</i>	2
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	5
<i>Enterococcus faecium</i>	3
<i>Enterococcus gallinarum</i>	3
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	2
<i>Haemophilus influenzae</i>	2
<i>Lactobacillus casei</i>	4
<i>Listeria monocytogenes</i>	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	3
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3
<i>Streptococcus agalactiae</i>	4
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3

30 La tabla 2, enumera los resultados obtenidos:

Tabla 2

Sensibilidad y especificidad de las especies sometidas a test de ensayo

Sensibilidad	93%
Especificidad con respecto a los Gram +	81 a 90%
Especificidad con respecto a las levaduras	89 a 100%

5 Entre los resultados obtenidos sobre las cepas sometidas a tests de ensayo, ciertas cepas, son falsos negativos. Estos falsos negativos, son dos (2) de las cuatro (4) cepas de *P. aeruginosa*, dos (2) de las cinco (5) cepas de *P. fluorescens*, y una (1) de las dos (2) cepas de *H. influenzae*. Ciertas cepas, son falsos positivos. Estos falsos positivos, se encuentran constituidos por las dos (2) cepas de *C. ulcerans*, una (1) de cinco (5) cepas de *E. faecalis*, las tres (3) cepas de *S. pyogenes*, dos (2) de la cuatro (4) cepas de *S. agalactiae*, la cepa de *C. guilliermondii* y la cepa de *C. parapsilosis*.

2º) Lisibilidad del test de ensayo

15 La casi totalidad de las bacterias a Gram negativo, con la excepción de las *Pseudomonas*, proporcionan una coloración gris violeta franca, cuya intensidad, es superior estrictamente a 2 (sobre una escala semi-cuantitativa que va hasta 4), mientras que, las bacterias a Gram positivo, o que son falsos positivos, con la excepción de *S. pyogenes*, tienen una intensidad de coloración inferior a 1, sobre esta misma escala.

3º) Tiempo de detección

Aproximadamente un 90% de las bacterias a Gram negativo, se detectan en un transcurso de tiempo que va de 0 a 10 segundos, la mayor parte de las bacterias a Gram positivo, o que son falsos positivos, se detectan después de un transcurso de tiempo de 10 segundos, con la excepción de las cepas de *S. pyogenes*.

20 El medio actual, presenta, por lo tanto, una buena sensibilidad y una buena especificidad. Las otras cepas falsos positivos, son generalmente de intensidad muy débil, y presentan un tiempo de detección superior a 10 segundos. Estas cepas, son por lo tanto más bien cepas dudosas, más bien que falsos positivos.

4º) Definición del escobillón

El modelo de escobillón, particularmente interesante, es un escobillón que responde a los criterios siguientes:

- 25 - un bastoncito de plástico, de un diámetro de 2,5 milímetros (mm) y de una longitud de 150 mm, y
- con un cabezal de viscosa de un diámetro inferior a 4,5 mm.

5º) Forma de fabricación del escobillón

Las condiciones de fabricación del escobillón, son las siguientes:

- 30 - inhibición en una solución tal y como la que se ha definido anteriormente, arriba, durante un tiempo de 2 a 3 minutos (mn),
- secado, durante un tiempo de 2 horas (h), a una temperatura de 37°C,
- acondicionamiento en saco de plástico estanco, y al abrigo de la luz.

6º) Acondicionamiento de los escobillones

35 Los escobillones, pueden por ejemplo almacenarse de una forma estéril (rayos gamma), en un embalaje que contiene uno (1), veinticinco (25) o cien (100) a mil (1000) de estos escobillones. No obstante, es del todo posible el

pretender un acondicionamiento de veinte (20) a veinticinco (25) escobillones, no obligatoriamente esterilizados, después del secado. El acondicionamiento, se efectúa con o sin sustancia de desecación, y al abrigo de la luz.

7º) Parámetros críticos

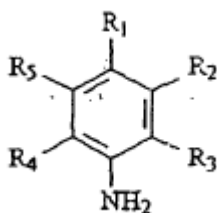
- 5 La utilización de los substratos aparejados, es por lo tanto idéntica a la expuesta en el inicio de la descripción. Así, de este modo, el cabezal del escobillón, contiene por lo menos dos moléculas. Así, en el ejemplo facilitado, una primera molécula (AlaDMpPD), se encuentra constituida por una parte marcador (DMpPD) no cromógena, asociada a por lo menos una parte específica (alanina) de la enzima (Alanina-aminopeptidasa) y una segunda molécula constituida por otra sustancia no cromógena (α -naftol), la parte marcador no cromógena (AlaDMpPD), una vez liberada, reacciona con la segunda molécula (α -naftol), para formar una molécula cromógena.
- 10 La utilización del escobillón, sirve de soporte de los reactivos, y permite la utilización de la suspensión del inóculo, que se utilizará en otros sistemas de identificación y antibiograma, sobre la base de las mismas cepas que se han evaluado precedentemente. Esto disminuye por lo tanto, de una forma considerable, los errores, en el momento del trasplante de nuevos microorganismos “parecidos”, para efectuar las operaciones siguientes de identificación y de antibiograma, etc.
- 15 Además, es igualmente posible el realizar escobillones para otros tipos de tests de ensayo, por ejemplo, oxidasa, indol, esterasa, fosfatasa...

REIVINDICACIONES

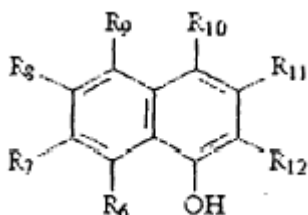
1.- Procedimiento de detección de una actividad enzimática peptidasa, caracterizado por el hecho de que consiste en:

- poner por lo menos un sustrato constituido por lo menos por dos moléculas,

5 . una primera molécula constituida por una parte marcador no cromógena asociada a por lo menos una parte específica diana de la enzima, encontrándose constituida, la citada parte marcadora no cromógena, por aminobenceno ó uno de sus derivados,



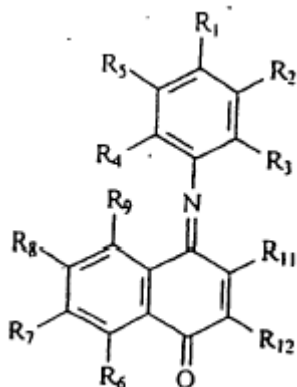
. y una segunda molécula constituida por una parte marcador, no cromógena, constituida por α-naftol o uno de sus derivados,



en presencia de por lo menos un tipo de microorganismos, tales como las bacterias contenidas en una muestra a someter a test de ensayo, sin la adición de oxidasa

10 - esperar que las bacterias hidrolicen el (los) sustrato(s), y

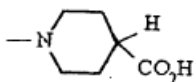
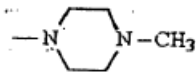
- detectar la formación de un complejo coloreado, a partir del acoplamiento oxidante de dos partes marcador, correspondiendo, el citado complejo coloreado, a la molécula



Fórmulas éstas en las cuales:

· el radical R1, se encuentra constituido por OH, SH, ó N(X)(Z), en donde, X y / ó Z, se eligen de entre H, CH₃, CH₂CH₃, N(CH₃)₂, N(CH₂CH₂OH)₂, y

5



10

· el radical R10, se elige entre -H, Br, Cl, I, y los grupos de átomos tales como SH, que pueden retirarse durante el acoplamiento oxidante

· y cada radical R2 a R9, R11 y R12, se elige entre H, OH, Br, Cl, e I, CH₃, CH₂CH₃, OCH₃, OCH₂CH₃ y COOH.

15

2.- Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que, las citadas moléculas, se encuentran presentes en un material absorbente, y éstas se ponen en contacto con la muestra, y porque, después de la detección, los microorganismos de esta forma extraídos, se vuelven a poner en suspensión, para permitir análisis posteriores (identificación, antibiogramas, etc.).

3.- Procedimiento, según la reivindicación 2, caracterizado por el hecho de que, las citadas moléculas, se encuentran asociadas a un oxidante.

4.- Procedimiento, según la reivindicación 3, caracterizado por el hecho de que, el oxidante, es el ferricianato de potasio.

20

5.- Procedimiento, según una las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por el hecho de que, éste, comprende un activador de la reacción, tal como una reducida cantidad de la primera molécula y / o de la segunda molécula, presente(s) en la muestra a someter a test de ensayo.

6.- Procedimiento, según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por el hecho de que, la composición, comprende un ligante, tal como la polivinilpirrolidona (PVP).

25

7.- Procedimiento, según una de las reivindicaciones 1 a 6, para identificar el Gram de una especie bacteriana a someter a test de ensayo, caracterizado por el hecho de que, la primera molécula, se encuentra constituida por el α-naftol.

8.- Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en combinación con la reivindicación 7, caracterizado por el hecho de que, la composición del material absorbente, es la siguiente:

30

- α-naftol de 0,01 a 5 g/l, de una forma preferente, de 0,1 a 1 g/l, y por ejemplo, de 0,5 g/l,

- ferricianato de potasio de 0,01 g a 5 g/l, de una forma preferente, de 0,1 a 1 g/l, y por ejemplo, de 0,5 g/l, y

- AlaDMpPD de 0,01 a 5 g/l, de una forma preferente, de 0,1 a 1 g/l y, por ejemplo, de 0,5 g/l.

35

9.-Procedimiento, según la reivindicación 5, caracterizado por el hecho de que, el activador, se encuentra constituido por AlaDMpPD, en una concentración de 0,01 a 0,5 g/l, de una forma preferente, de 0,05 a 0,1 1 g/l y, por ejemplo, de 0,075 g/l.

10.-Procedimiento, según la reivindicación 6, caracterizado por el hecho de que, la composición, comprende, además, de 1 a 50 g/l, de una forma preferible, de 10 a 25 g/l y, por ejemplo, 15 g/l de PVP.