

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 782**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/04** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12Q 1/37** (2006.01)

**C12Q 1/42** (2006.01)

**C12Q 1/44** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2007 E 11192535 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 2428581**

54 Título: **Procedimiento para la identificación de, al menos, dos grupos de microorganismos**

30 Prioridad:

**28.02.2006 FR 0650693**

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

**30.01.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JAMES, ARTHUR;  
ORENGA, SYLVAIN;  
PERRY, JOHN y  
ROGER-DALBERT, CÉLINE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 440 782 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

Procedimiento para la identificación de, al menos, dos grupos de microorganismos

La invención se refiere a un procedimiento para la identificación de, al menos, dos grupos de microorganismos que expresan una misma actividad enzimática. La invención se refiere, igualmente, a un medio de reacción particular así como a su utilización para la identificación de, al menos, dos grupos de microorganismos que expresan una misma actividad enzimática.

Desde hace muchos años, se utilizan sustratos enzimáticos particulares para permitir la determinación de la presencia o ausencia de actividades enzimáticas características de microorganismos. Estos sustratos enzimáticos están compuestos, generalmente, de dos partes, una primera parte específica de la actividad enzimática a revelar, llamada igualmente parte diana, y una segunda parte que desempeña el oficio de marcador, llamada parte marcadora, que induce, por ejemplo, una coloración particular de la colonia en el momento de la hidrólisis del sustrato, o la aparición de un precipitado detectable con facilidad. Para la elección de estos sustratos, según que haya reacción o no, por ejemplo una coloración diferente, es posible caracterizar la naturaleza de un microorganismo, o discriminar grupos diferentes de microorganismos. Así pues, en el caso de bacterias, las cepas de *Escherichia coli* son puestas de manifiesto, frecuentemente, por la revelación de una actividad enzimática de tipo osidasa tal como la actividad  $\beta$ -glucuronidasa o  $\beta$ -galactosidasa. Del mismo modo, el género *Listeria* puede ser detectado por la puesta de manifiesto de una actividad  $\beta$ -glucosidasa. Se puede citar, igualmente, la detección de una actividad esterasa para, especialmente, la puesta de manifiesto del género *Salmonella*. En efecto, el género *Salmonella* posee esterases inespecíficas capaces de hidrolizar sustratos sintéticos cromógenos, por ejemplo indigogénicos. En el caso de la detección de salmonelas, y más generalmente, en el caso de bacterias con actividad esterasa, la detección y/o la identificación de estas bacterias se lleva a cabo, clásicamente, en medios gelosados que permiten la detección y/o la identificación de colonias sospechosas de bacterias con actividad esterasa.

Sin embargo, una actividad enzimática única no es siempre suficiente para caracterizar un grupo particular de microorganismos de otro grupo de microorganismos. Por ejemplo, si se quiere diferenciar bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas, como por ejemplo las bacterias del grupo KES (*Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*, bacterias Gram negativas), y las del grupo *Enterococcus* (bacterias Gram positivas), es necesario detectar varias actividades enzimáticas para acrecentar la especificidad. Conviene, por tanto, combinar varios sustratos enzimáticos en un mismo medio de cultivo, lo que puede ocasionar un elevado coste de fabricación. Además, en ciertos casos, no es posible poner de manifiesto espontáneamente en un mismo medio de reacción, actividades diferentes dado que las condiciones de expresión de las diferentes actividades no son compatibles. Por consiguiente, en el momento de la utilización del medio cromógeno CPS ID 3 comercializado por bioMérieux, tanto las bacterias del grupo KES (*Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*, bacterias Gram negativas), como las del género *Enterococcus* (bacterias Gram positivas), detectadas por una actividad osidasa ( $\beta$ -glucosidasa) producen colonias de color azul-verdoso; la distinción entre los dos grupos debe ser confirmada mediante una etapa suplementaria, por un examen microscópico.

La invención se propone resolver los problemas del estado de la técnica presentando un procedimiento nuevo adaptado particularmente para identificar y discriminar específicamente grupos diferentes de microorganismos, de una manera rápida, poco costosa y fácil de poner en práctica.

De modo sorprendente, los inventores han puesto en evidencia que era posible diferenciar dos grupos de microorganismos que expresan una misma actividad enzimática, mediante la elección juiciosa de una combinación de sustratos específicos de la actividad enzimática expresada por los dos grupos de microorganismos.

Antes de ir más adelante en la exposición de la invención, se proporcionan las definiciones que siguen con la finalidad de facilitar la comprensión de la invención:

En el sentido de la presente invención, el término microorganismo comprende las bacterias, Gram positivas o Gram negativas, las levaduras y más generalmente, los organismos generalmente unicelulares, invisibles a simple vista, que pueden ser multiplicados y manipulados en el laboratorio.

Como bacterias Gram negativas se pueden citar las bacterias de los géneros siguientes: *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Morganella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Acinetobacter*, *Branhamella*, *Neisseria*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Aeromonas*, *Moraxella*, *Pasteurella*, *Providencia*, *Actinobacillus*, *Alcaligenes*, *Bordetella*, *Cedacea*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Ralstonia*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas* y *Legionella*.

Como bacterias Gram positivas se pueden citar las bacterias de los géneros siguientes: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Clostridium*, *Gardnerella*, *Kocuria*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Mycobacteria* y *Corynebacteria*.

En calidad de levaduras, se pueden citar las levaduras de los géneros siguientes: *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* y *Trichosporon*.

Por medio de reacción se entiende un medio que comprende todos los elementos necesarios para la expresión de un metabolismo y/o para el crecimiento de microorganismos. Este medio de reacción puede o bien servir únicamente de medio de revelación, o bien de medio de cultivo y de revelación. En el primer caso, el cultivo de los microorganismos se efectúa antes de la siembra y, en el segundo caso, el medio de reacción constituye igualmente el medio de cultivo. Este medio puede contener otros aditivos eventuales tales como, por ejemplo : peptonas, uno o más factores de crecimiento, hidratos de carbono, uno o varios agentes selectivos, tampones, uno o más agentes gelificantes... Este medio de reacción puede presentarse en forma de líquido, de gel listo para el empleo, es decir, listo para realizar la siembra en un tubo o un frasco, o en placas de Petri.

Por sustrato enzimático se entiende todo sustrato que puede ser hidrolizado por una enzima dando un producto que permite la detección, directa o indirecta, de un microorganismo. Este sustrato comprende especialmente una primera parte específica de la actividad enzimática a poner de manifiesto y una segunda parte que ejerce el orificio de marcador, denominada a continuación parte marcadora. Esta parte marcadora puede ser cromógena, fluorógena, luminiscente, ... Como sustrato cromógeno, que se adapta bien a los soportes sólidos (filtro, gelosa, gel de electroforesis) se pueden citar especialmente los sustratos a base de indoxilo y sus derivados, y los sustratos a base de hidroxiquinolina o de esculetina y sus derivados, que permiten la detección de actividades osidasas y estererasas.

A título de sustratos a base de indoxilo, se pueden citar especialmente: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-acetil-β-D-glucosamina, 5-bromo-3-indolil-N-acetil-β-D-glucosamina, 6-cloro-3-indolil-N-acetil-β-D-glucosamina, 5-bromo-6-cloro-3-indolil-N-acetil-β-D-glucosamina, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-acetil-β-D-galactosamina, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-celobiósido, 5-bromo-3-indolil-β-D-celobiósido, 6-cloro-3-indolil-β-D-celobiósido, 5-bromo-6-cloro-3-indolil-β-D-celobiósido, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido, 5-bromo-3-indolil-β-D-galactósido, 6-cloro-3-indolil-β-D-galactósido, 5-bromo-6-cloro-3-indolil-β-D-galactósido, 6-bromo-3-indolil-β-D-galactósido, 3-indoxil-β-D-galactósido, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactósido, 5-bromo-3-indolil-α-D-galactósido, 6-cloro-3-indolil-α-D-galactósido, 5-bromo-6-cloro-3-indolil-α-D-galactósido, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucósido, 5-bromo-3-indolil-β-D-glucósido, 6-cloro-3-indolil-β-D-glucósido, 5-bromo-6-cloro-3-indolil-β-D-glucósido, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-metil-β-D-glucósido, 6-bromo-3-indolil-β-D-glucósido, 3-indoxil-β-D-glucósido, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-glucósido, 5-bromo-3-indolil-α-D-glucósido, 6-cloro-3-indolil-α-D-glucósido, 5-bromo-6-cloro-3-indolil-α-D-glucósido, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-metil-α-D-glucósido, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónido, 5-bromo-3-indolil-β-D-glucurónido, 6-cloro-3-indolil-β-D-glucurónido, 5-bromo-6-cloro-3-indolil-β-D-glucurónido, 6-bromo-3-indolil-β-D-glucurónido, 3-indoxil-β-D-glucurónido, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-manósido, 5-bromo-6-cloro-3-indolil-α-D-manósido, 6-cloro-3-indolil-α-D-manósido, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-manósido, 5-bromo-6-cloro-3-indolil-β-D-manósido, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-ribósido, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-L-fucósido, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-xilósido, 5-bromo-6-cloro-3-indolil-β-D-xilósido, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-mio-inositol-1-fosfato, 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-fosfato, 5-bromo-3-indoxil-β-D-fosfato, 6-cloro-3-indoxil-fosfato, 5-bromo-6-cloro-3-indoxil-fosfato, 3-indoxil-fosfato, 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-acetato, 5-bromo-3-indoxil-β-D-acetato, 6-cloro-3-indoxil-acetato, 5-bromo-6-cloro-3-indoxil-acetato, 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-butirato, 5-bromo-3-indoxil-β-D-butirato, 6-cloro-3-indoxil-butirato, 5-bromo-6-cloro-3-indoxil-butirato, 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-octanoato, 5-bromo-3-indoxil-β-D-octanoato, 6-cloro-3-indoxil-octanoato, 5-bromo-6-cloro-3-indoxil-octanoato, 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-nonanoato, 5-bromo-3-indoxil-β-D-nonanoato, 6-cloro-3-indoxil-nonanoato, 5-bromo-6-cloro-3-indoxil-nonanoato, 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-decanoato, 5-bromo-3-indoxil-β-D-decanoato, 6-cloro-3-indoxil-decanoato, 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-oleato, 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-palmitato. 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-sulfato, 5-bromo-6-cloro-3-indoxil-sulfato.

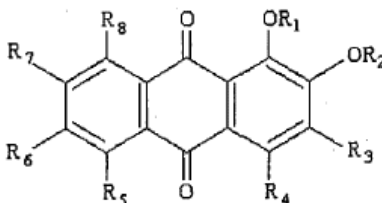
Se pueden citar igualmente los sustratos derivados de flavonoides. Por derivado de flavonoide se entiende especialmente el 3',4'-dihidroxi-flavona-4'-β-D-ribósido, el 3',4'-dihidroxi-flavona-4'-β-D-galactósido, el 3',4'-dihidroxi-flavona-4'-β-D-glucósido, el 3-hidroxi-flavona-β-D-galactósido, el 3-hidroxi-flavona-β-D-glucósido y el 3',4'-dihidroxi-flavona-3',4'-diacetato.

Se pueden citar igualmente los sustratos a base de nitrofenol y nitroanilina y derivados, que permiten detectar las actividades osidasas y estererasas en el caso de sustratos a base de nitrofenol, y de las actividades peptidasas en el caso de sustratos a base de nitroanilina. También se pueden citar los sustratos a base de cumarina y derivados que permiten también detectar las actividades osidasas y estererasas en el caso de sustratos a base de hidroxicumarinas y en especial de la 4-metil-umbeliferona o de la ciclohexenoesculetina, y de las actividades peptidasas en el caso de sustratos a base de aminocumarinas y en especial de la 7-amino-4-metil-cumarina. Todavía se pueden citar los sustratos a base de aminofenol y derivados que permiten detectar las actividades osidasas, estererasas y peptidasas. Se pueden citar, igualmente, los sustratos a base de alizarina y derivados que permiten detectar las actividades osidasas y estererasas. Finalmente, se pueden citar los sustratos a base de naftol y naftilamina y sus derivados, que permiten detectar las actividades osidasas y estererasas por intermedio del naftol, y las actividades peptidasas por intermedio de la naftilamina.

Por sustrato a base de naftol se entiende especialmente los sustratos a base de α-naftol, de β-naftol, de 6-bromo-2-naftol, de naftol AS BI, de naftol AS de p-naftolbenceína, tal como se define en la solicitud de patente EP1224196 del solicitante. Esos pueden ser sustratos de osidasas, de estererasas, de fosfatasa y de sulfatasa. Los sustratos de osidasas

son en especial sustratos de N-acetil- $\beta$ -hexosaminidasa, de  $\beta$ -galactosidasa, de  $\alpha$ -galactosidasa, de  $\beta$ -glucosidasa, de  $\alpha$ -glucosidasa, de  $\beta$ -glucuronidasa, de  $\beta$ -celobiosidasa y de  $\alpha$ -manosidasa.

Por sustrato a base de alizarina se entienden especialmente los sustratos descritos en la patente EP1235928 del solicitante, es decir un sustrato de fórmula general:



5

en la que:

-R1 es una parte elegida como blanco o H, y R2 es una parte elegida como blanco o H, siendo al menos uno de los R1 y R2 una parte elegida como blanco-

10 -R3 es H, SO<sub>3</sub>H, Cl, Br, F, I, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, NR<sub>9</sub>R<sub>10</sub>, acilamino, aminoarilo o aminoacilamino del tipo NHCOX, siendo X igual a alquilo, arilo y aralquilo o un resto de un  $\alpha$ -aminoácido tal como la alanina;

-R4 es H, SO<sub>3</sub>H, Cl, Br, F, I, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, NR<sub>9</sub>R<sub>10</sub>, OH, acilamino, aminoarilo o aminoacilamino del tipo NHCOX, siendo X igual a alquilo, arilo, aralquilo o un resto de un  $\alpha$ -aminoácido tal como la alanina;

- según una variante, R3 y R4 están unidos uno a otro formando un ciclo de al menos cinco lados y preferentemente de seis lados;

15 - R5, R6, R7 y R8 están constituidos, cada uno, por uno de los átomos o grupos de átomos siguientes: H, halógeno, particularmente Cl o Br, OH, SO<sub>3</sub>H, alquilo o alcoxi; y

-R9 y R10 están constituidos, independientemente, por metilo, alquilo, arilo o aralquilo, o constituyen uno, R9 o R10, un

ciclo (piperidina, pirrolidina, morfolina, etc.) y el otro, R10 o R9, un átomo de hidrógeno.

20 El sustrato enzimático puede ser, igualmente, un sustrato natural cuyo producto de hidrólisis se detecta directa o indirectamente. Como sustrato natural se pueden citar especialmente el triptófano para detectar una actividad triptofanasa o desaminasa, un aminoácido cíclico (triptófano, fenilalanina, histidina, tirosina) para detectar una actividad desaminasa, el fosfatidil inositol para detectar una actividad fosfolipasa, ....

25 La invención se refiere a un procedimiento para la identificación de un primer grupo de microorganismos y un segundo grupo de microorganismos, que expresan una misma actividad enzimática, que comprende las etapas siguientes:

a) el cultivo de dichos primer y segundo grupos de microorganismos en un medio de reacción que comprende un primer sustrato enzimático y un segundo sustrato enzimático, cuyos primer y segundo sustratos enzimáticos son metabolizados por una misma actividad enzimática,

30 b) la identificación de dichos grupos de microorganismos.

Preferentemente dicha misma actividad enzimática se escoge entre las actividades enzimáticas siguientes: osidasa, esterasa y peptidasa, y todavía más preferentemente, dicha misma actividad enzimática se escoge entre las actividades enzimáticas siguientes:  $\beta$ -D-glucosidasa,  $\beta$ -D-galactosidasa, alfa-D-glucosidasa, alfa-D-galactosidasa, alfa-manosidasa,  $\beta$ -D-glucuronidasa, N-acetil- $\beta$ -D-hexosaminidasa,  $\beta$ -D-celobiosidasa, esterasa, fosfatasa, fosfolipasa, sulfatasa y peptidasa.

35

De manera general, las etapas de incubación y de identificación son ampliamente conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la temperatura de incubación puede ser 37°C. Tratándose de la atmósfera de incubación, ésta es preferentemente aerobia, pero igualmente puede ser anaerobia, microaerobia o realizarse bajo CO<sub>2</sub>. La identificación puede llevarse a cabo a simple vista por visualización de un cambio de coloración que no se difunde en el medio de reacción, y que, por tanto, se concentra al nivel de las colonias. En el caso de la revelación de fluorescencia, se utilizan los dispositivos de lectura de la fluorescencia conocidos por los expertos en la técnica.

40

Según un modo preferido de realización de la invención, dicho primer grupo de microorganismos es un grupo de Staphylococcus aureus y dicho segundo grupo es un grupo de Enterococcus faecalis, dicha misma actividad enzimática es una actividad alfa-glucosidasa, y dichos primer y segundo sustratos son a base de indoxilo.

Preferentemente, el primer sustrato es la 5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-metil-alfa-glucósido y el segundo sustrato es el 6-cloro-3-indolil-alfa-glucósido.

5 Según otro modo preferido de realización de la invención, dichos primer y segundo grupos de microorganismos son salmonelas de serotipos diferentes, dicha misma actividad enzimática es una actividad esterasa, y dichos primer y segundo sustratos son a base de indoxilo.

Preferentemente, dicho primer sustrato es el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-octanoato y dicho segundo sustrato es el 5-bromo-6-cloro-3-indoxil-octanoato.

10 Según otro modo preferido de realización de la invención, dicho primer grupo de microorganismos es un grupo de bacterias Gram + y dicho segundo grupo de microorganismos es un grupo de bacterias Gram -; dicha misma actividad enzimática es una actividad beta-glucosidasa; dicho primer sustrato es un derivado de un flavonoide y dicho segundo sustrato es a base de indoxilo.

Preferentemente, dicho primer sustrato es el 3-hidroxi-flavona-beta-glucósido, y dicho segundo sustrato es el 5-bromo-4-cloro-N-metil-3-indolil-beta-glucósido.

15 Según otro modo preferido de realización de la invención, dicho primer grupo de microorganismos es un grupo de bacterias Gram + y dicho segundo grupo de microorganismos es un grupo de bacterias Gram -; dicha misma actividad enzimática es una actividad beta-glucuronidasa; dicho primer sustrato es a base de naftol y dicho segundo sustrato es a base de indoxilo.

Preferentemente, dicho primer sustrato es el p-naftol-benceína-beta-glucurónido y dicho segundo sustrato es el 6-cloro-3-indolil-beta-glucurónido.

20 Según otro modo preferido de realización de la invención, dicho primer grupo de microorganismos es un grupo de levaduras y dicho segundo grupo de microorganismos es un grupo de bacterias; dicha misma actividad enzimática es una actividad hexosaminidasa; dicho primer sustrato es a base de alizarina y dicho segundo sustrato es a base de indoxilo.

25 Preferentemente, dicho primer sustrato es la alizarina-N-acetil-beta-glucosaminida y dicho segundo sustrato es el 5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-acetil-beta-glucosaminida.

30 Cualquiera que sea el modo de realización del procedimiento según la invención, el medio de reacción puede comprender, además, al menos otro sustrato, preferentemente varios, metabolizado por al menos otra actividad enzimática, preferentemente varias, estando escogida, preferentemente, dicha otra actividad enzimática entre una actividad  $\beta$ -D-glucuronidasa, una actividad  $\beta$ -glucosidasa, una actividad triptofanasa, o una actividad desaminasa. Según un modo todavía más preferido, dicho otro sustrato se escoge entre el 6-cloro-3-indolil-beta-glucurónido, el 5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-metil- $\beta$ -D-glucósido, el 3',4'-dihidroxi-4'- $\beta$ -D-glucósido y el triptófano,

35 Así es posible discriminar e identificar no solamente un primer grupo de bacterias Gram - y un segundo grupo de bacterias Gram + que expresan, todas, una actividad  $\beta$ -glucosidasa, sino que es igualmente posible identificar a la menos un tercer grupo de bacterias que expresan una actividad  $\beta$ -glucuronidasa y un cuarto grupo de bacterias que expresan una actividad desaminasa, así como subgrupos que expresan una actividad triptofanasa.

La invención se refiere igualmente a la utilización de un medio de reacción que comprende al menos un primer sustrato enzimático y al menos un segundo sustrato enzimático, cuyos primer y segundo sustratos enzimáticos están metabolizados por una misma actividad enzimática, para la identificación de un primer grupo de microorganismos y de un segundo grupo de microorganismos, que expresan una misma actividad enzimática,

40 Preferentemente, dicha misma actividad enzimática se escoge entre las actividades enzimáticas siguientes: osidasa, esterasa y peptidasa, y todavía más preferentemente, dicha misma actividad enzimática se escoge entre las actividades enzimáticas siguientes:  $\beta$ -D-glucosidasa,  $\beta$ -D-galactosidasa, alfa-D-glucosidasa, alfa-D-galactosidasa, alfa-manosidasa,  $\beta$ -D-glucuronidasa, N-acetil- $\beta$ -D-hexosaminidasa,  $\beta$ -D-celobiosidasa, esterasa, fosfatasa, fosfolipasa, sulfatasa y peptidasa.

45 Según un modo preferido de realización de la invención, dicho primer grupo de microorganismos es un grupo de *S. aureus* y dicho segundo grupo es un grupo de *E. faecalis*; dicha misma actividad enzimática es una actividad alfa-glucosidasa y dichos primer y segundo sustratos son a base de indoxilo.

Preferentemente, el primer sustrato es el 5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-metil-alfa-glucósido y el segundo sustrato es el 6-cloro-3-indolil-alfa-glucósido.

50 Según otro modo preferido de realización de la invención, dichos primer y segundo grupos de microorganismos son salmonelas de serotipos diferentes, dicha misma actividad enzimática es una actividad esterasa, y dichos primer y segundo sustratos son a base de indoxilo.

Preferentemente, dicho primer sustrato es el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-octanoato y dicho segundo sustrato es el 5-bromo-6-cloro-3-indoxil-octanoato.

5 Según otro modo preferido de realización de la invención, dicho primer grupo de microorganismos es un grupo de bacterias Gram + y dicho segundo grupo de microorganismos es un grupo de bacterias Gram -; dicha misma actividad enzimática es una actividad beta-glucosidasa, dicho primer sustrato es un derivado de un flavonoide y dicho segundo sustrato es a base de indoxilo.

Preferentemente, dicho primer sustrato es el 3-hidroxi-flavona-beta-glucósido, y dicho segundo sustrato es el 5-bromo-4-cloro-N-metil-3-indolil-beta-glucósido.

10 Según otro modo preferido de realización de la invención, dicho primer grupo de microorganismos es un grupo de bacterias Gram + y dicho segundo grupo de microorganismos es un grupo de bacterias Gram -; dicha misma

actividad enzimática es una actividad beta-glucuronidasa, dicho primer sustrato es a base de naftol y dicho segundo sustrato es a base de indoxilo.

Preferentemente, dicho primer sustrato es el p-naftol-benceína-beta-glucurónido y dicho segundo sustrato es el 6-cloro-3-indolil-beta-glucurónido.

15 Según otro modo preferido de realización de la invención, dicho primer grupo de microorganismos es un grupo de levaduras y dicho segundo grupo de microorganismos es un grupo de bacterias; dicha misma actividad enzimática es una actividad hexosaminidasa; dicho primer sustrato es a base de alizarina y dicho segundo sustrato es a base de indoxilo

20 Preferentemente, dicho primer sustrato es el alizarina-N-acetil-beta-glucosaminida y dicho segundo sustrato es el 5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-acetil-beta-glucosaminida.

25 Cualquiera que sea el modo de utilización de la invención, el medio de reacción puede comprender, además, al menos otro sustrato, preferentemente varios, metabolizado por al menos otra actividad enzimática, preferentemente varias, estando escogida, preferentemente, dicha otra actividad enzimática entre una actividad  $\beta$ -D-glucuronidasa, una actividad  $\beta$ -glucosidasa, una actividad triptofanasa, o una actividad desaminasa. Según un modo todavía más preferido, dicho otro sustrato se escoge entre el 6-cloro-3-indolil-beta-glucurónido, el 5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-metil- $\beta$ -D-glucósido, el 3',4'-dihidroxi-4'- $\beta$ -D-glucósido y el triptófano,

30 Así es posible discriminar e identificar no solamente un primer grupo de bacterias Gram - y un segundo grupo de bacterias Gram + que expresan, todas, una actividad  $\beta$ -glucosidasa, sino que es igualmente posible identificar al menos un tercer grupo de bacterias que expresan una actividad  $\beta$ -glucuronidasa y un cuarto grupo de bacterias que expresan una actividad desaminasa, así como subgrupos que expresan una actividad triptofanasa. Un medio tal es muy útil, especialmente, para el diagnóstico de infecciones urinarias.

Los ejemplos que siguen se proporcionan a título ilustrativo y no tienen carácter limitativo alguno. Estos ejemplos permitirán comprender mejor la invención.

35 Ejemplo 1: Ensayo para determinar una diferencia de metabolismo de un mismo sustrato por diferentes grupos de microorganismos que expresan una misma actividad enzimática.

El objeto es diferenciar al menos dos grupos de microorganismos, por ejemplo un primer grupo y un segundo grupo, que expresan una misma actividad enzimática dada, por ejemplo una actividad enzimática de una enzima alfa.

40 La actividad de cada uno de los dos grupos de microorganismos se evalúa frente a diferentes sustratos de la enzima alfa, por ejemplo un sustrato A, un sustrato B, un sustrato C. Cada uno de los sustratos A, B, C se añade individualmente a un medio de reacción adaptado al metabolismo de dicho primer grupo y de dicho segundo grupo de microorganismos que se desea diferenciar. Se obtiene de este modo un medio A, que comprende el sustrato A, un medio B, que comprende el sustrato B, un medio C que comprende el sustrato C, ...

A título indicativo, para discriminar levaduras, un medio adaptado al metabolismo de las levaduras puede ser, especialmente, un medio Sabouraud eventualmente desprovisto parcial o totalmente de glucosa.

45 Un medio adaptado al metabolismo de las bacterias puede ser, especialmente, un medio Trypcase Soja o un medio Columbia.

Un medio adaptado al metabolismo de los microorganismos urinarios puede ser, especialmente, un medio CPS ID 3, desprovisto de sus sustratos enzimáticos.

50 No es necesario decir que, en función de los microorganismos a diferenciar y de la actividad enzimática estudiada, otros medios de reacción podrán ser privilegiados. Según la aplicación, podrá tratarse de medios líquidos o de medios gelificados.

Cada medio se distribuye en partes alícuotas. Una o varias cepas de cada uno de los grupos de microorganismos a diferenciar se siembran sobre una parte alícuota de cada medio. Seguidamente estos cultivos son incubados en las condiciones apropiadas.

- 5 La hidrólisis de cada uno de los sustratos se evalúa, eventualmente después de diferentes tiempos de incubación, para determinar si existe entre al menos dos sustratos una misma actividad enzimática, una diferencia de hidrólisis ligada al grupo de microorganismos.

- 10 Cuando se identifica una diferencia tal, se fabrica un medio de reacción análogo adicionado con los sustratos enzimáticos que presentan esta diferencia de hidrólisis. Como precedentemente, el medio se distribuye en partes alícuotas. Una o varias cepas de cada uno de los grupos de microorganismos a diferenciar se siembran sobre una parte alícuota de este medio. Estos cultivos se incuban seguidamente en las condiciones apropiadas y luego son examinados, eventualmente después de diferentes tiempos de incubación, para evaluar si la diferencia de expresión enzimática permite diferenciar los grupos de microorganismos estudiados. En efecto, la diferenciación de los grupos depende no solamente de la diferencia de hidrólisis entre los sustratos, sino igualmente de la diferencia entre las señales producidas por la hidrólisis de cada uno de los sustratos y de eventuales interacciones, especialmente al nivel de los sustratos enzimáticos y/o de las señales producidas.

El ejemplo desarrollado precedentemente puede ser puesto en práctica de un modo similar para discriminar no solo dos grupos de microorganismos, sino 3, 4 ó más grupos de microorganismos.

- 20 Ejemplo 2 : Utilización de dos sustratos de alfa glucosidasa a base de indoxilo, el 5-bromo-4-cloro-3-indolil-N-metil-alfa-glucósido (X-N-Me- $\alpha$ -GLU) en combinación con el 6-cloro-3-indolil-alfa-glucósido (Rosa- $\alpha$ -GLU) para discriminar las especies *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*.

Un volumen de 200 ml de agar Columbia fundido a 50°C, se añadió a diferentes composiciones de sustratos descritas en la tabla 1 que figura a continuación:

Tabla 1

	Medio 1	Medio 2	Medio 3
X-N-Me- $\alpha$ -GLU	75 mg/l	-	75 mg/l
Rosa- $\alpha$ -GLU	-	200 mg/l	200 mg/l

- 25 Los medios constituidos de este modo fueron distribuidos en placas de Petri.

Tres cepas diferentes de *S. aureus* y de *E. faecalis* se sembraron sobre cada medio a la dosis valorada de 10  $\mu$ l, partiendo de suspensiones valoradas de 0,5 McFarland. Todos los cultivos fueron incubados 24 horas a 37°C.

- 30 Los resultados de crecimiento y de coloración obtenidos en 24 horas de incubación se exponen en la tabla 2, en la que Co significa crecimiento, C significa color, I significa incoloro, In significa intensidad de coloración, la señal ++ significa muy buen crecimiento, la señal + significa buen crecimiento de la cepa, la señal +/- significa crecimiento mediano de la cepa y la señal - significa ausencia de crecimiento de la cepa. 1 corresponde a una intensidad de coloración débil, 2 mediana y 3 fuerte.

Tabla 2

		Medio 1			Medio 2			Medio 3		
		C	In	Co	C	In	Co	C	In	Co
1	<i>S. aureus</i>	Verde	1	+	Rosa	2	+	Violeta	3	+
2	<i>S. aureus</i>	Verde	1	+	Rosa	2	+	Violeta	1	+
3	<i>S. aureus</i>	Verde	2	+	Rosa	2	+	Violeta	2	+
4	<i>E. faecium</i>	I		+	I		+	I		+
5	<i>E. faecalis</i>	Verde	2	+	Rosa	1	+	Verde	3	+
6	<i>E. faecalis</i>	Verde	3	+	rosa	1	+	verde	2	+

Los resultados expuestos en la tabla 2 anterior muestran que las dos especies ensayadas, *S. aureus* y *E. faecalis*, presentan intensidades de coloración diferentes para cada sustrato. La combinación en un mismo medio de estos dos sustratos permite observar coloraciones diferentes para cada especie. Por tanto, para una misma actividad enzimática y en presencia de dos sustratos de esta actividad, es posible diferenciar dos especies para las que la afinidad de su enzima en cada sustrato es variable. Además, si se añade un glicopéptido, por ejemplo, la vancomicina o la teicoplanina, en una concentración ajustada, por ejemplo, entre 2 y 16 mg/l, este medio está particularmente adaptado para la detección de cocos Gram positivos resistentes a los glicopéptidos, en especial los que tienen una resistencia denominada adquirida, tal como el *Staphylococcus aureus* resistente a la Vancomicina (VRSA) o el *Enterococcus faecalis* o el *E. faecium* resistente a la Vancomicina (VRE).

Ejemplo 3: Utilización de dos sustratos de esterasa a base de indoxilo, el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-octanoato (X-C8) en combinación con el 5-bromo-6-cloro-3-indoxil-octanoato (Magenta-C8) para discriminar cepas de salmonelas de serotipos diferentes.

Un volumen de 200 ml de agar Columbia fundido a 50°C, se añadió a diferentes composiciones de sustratos resumidas en la tabla 3 que sigue:

Tabla 3

	Medio 1	Medio 2	Medio 3
X-C8	300 mg/l	-	300 mg/l
Magenta-C8	-	500 mg/l	500 mg/l

Los medios constituidos de este modo fueron distribuidos en placas de Petri.

Diferentes serotipos de salmonelas fueron sembrados a la dosis valorada de 10 µl, sobre cada medio, partiendo de suspensiones valoradas de 0,5 McFarland. Todos los cultivos fueron incubados 24 horas a 37°C.

Los resultados de crecimiento y de coloración obtenidos en 24 horas de incubación se exponen en la tabla 3, en la que Co significa crecimiento, C significa color, I significa incoloro, In significa intensidad de coloración, la señal ++ significa crecimiento muy bueno, la señal + significa crecimiento bueno de la cepa. la señal +/- significa crecimiento mediano de la cepa, y la señal - significa ausencia de crecimiento de la cepa, 1 corresponde a una intensidad de coloración débil, 2 mediana y 3 fuerte.

Tabla 4

		Medio 1			Medio 2			Medio 3		
		C	In	Co	C	In	Co	C	In	Co
1	<i>S. enteritidis</i> serot. Dublín	Verde	1	+	I		+	Verde	1	+
2	<i>S. enteritidis</i> serot. Dublín	Verde	1	+	I		+	Verde	1	+
3	<i>S. enteritidis</i> serot. Enteritidis	Verde	2	+	Violeta	2	+	Violeta	2	+
4	<i>S. enteritidis</i> serot. Enteritidis	Verde	3	+	Violeta	2	+	Violeta	3	+
5	<i>S. enteritidis</i> serot. Paratyphi A	Verde	1	+	Violeta	1	+	Violeta	1	+
6	<i>S. enteritidis</i> serot. Typhimurium	Verde	1	+	Violeta	3	+	Violeta	3	+



5 Los resultados expuestos en la tabla 4 muestran que la afinidad de la actividad esterasa de los diferentes serotipos de salmonelas, es variable según los sustratos. El serotipo Dublín hidroliza más específicamente el X.C8 que el Magenta-C8. Al revés, los otros serotipos hidrolizan preferentemente el Magenta-C8, las intensidades de coloración son más fuertes para este sustrato. Por esto, un medio que contiene estos dos sustratos de una misma actividad enzimática permite obtener colonias coloreadas para los diferentes tipos de salmonelas, y. separar el serotipo Dublín de los otros serotipos de salmonelas y de bacterias que no expresan esterasa

10 Ejemplo 4: Utilización de un sustrato de beta glucosidasa, 3-hidroxi flavona-beta-glucósido (HF-β-GLU) o 3'.4'-di-hidroxi flavona-beta-glucósido (DHF-β-GLU), con un sustrato a base de indoxilo, el 5-bromo-4-cloro-N-metil-3-indolil-beta-glucósido (X-N-Me-β-GLU) para discriminar bacterias Gram + y bacterias Gram – que poseen actividad beta-glucosidasa.

Un volumen de 200 ml de agar Columbia fundido a 50°C, se añadió a diferentes composiciones de sustratos resumidas en la Tabla 5.

Tabla 5

	Medio 1	Medio 2	Medio 3
X-N-Me-β-GLU	75 mg/l	75 mg/l	75 mg/l
HF-β-GLU	-	-	200 mg/l
DHF-β-GLU	-	200 mg/l	-

15 Los medios constituidos de este modo se distribuyeron en placas de Petri. Cepas de *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *Enterococcus gallinarum*, *S. aureus* y *E.coli*, fueron sembradas a la dosis valorada de 10 µl, sobre cada medio, a partir de suspensiones valoradas de 0,5 McFarland, Todos los cultivos fueron incubados 24 horas a 37°C.

20 Los resultados de crecimiento y de coloración obtenidos en 24 horas de incubación se exponen en la tabla 4, en la que Co significa crecimiento, C significa color, I significa incoloro, In significa intensidad de coloración, la señal ++ significa crecimiento muy bueno, la señal + significa crecimiento bueno de la cepa, la señal +/- significa crecimiento mediano de la cepa, y la señal – significa ausencia de crecimiento de la cepa. 1 corresponde a una intensidad de coloración débil, 2 mediana, 3 fuerte y 4 muy fuerte.

25 Tabla 6

		Medio 1			Medio 2			Medio 3		
		C	In	Co	C	In	Co	C	In	Co
1	<i>E. cloacae</i>	Verde	3	+	Verde	3	+	Verde	3	+
2	<i>K. pneumoniae</i>	Verde	3	+	Verde	3	+	Verde	3	+
3	<i>S. marcescens</i>	Verde	2	+	Verde	2	+	Verde	2	+
4	<i>E. faecium</i>	Verde	4	+	Negro	4	+	Violeta con reflejos metálicos	4	+
5	<i>E. faecalis</i>	Verde	4	+	Negro	4	+	Violeta con reflejos metálicos	4	+
6	<i>E. gallinarum</i>	Verde	4	+	Negro	4		Violeta con reflejos metálicos	4	
7	<i>S. aureus</i>	I		+	I		+	I		+
8	<i>E.coli</i>	I		+	I		+	I		+

- Los resultados expuestos en la tabla 6 muestran que las especies Gram negativas y beta-glucosidasa positivas hidrolizan preferentemente el sustrato a base de indoxilo mientras que las especies Gram positivas y beta-glucosidasa positivas hidrolizan preferentemente los sustratos a base de flavonoides. Debido a este hecho es posible separar bacterias Gram positivas y Gram negativas que presentan la misma actividad enzimática. En efecto,
- 5 la diferenciación de los grupos depende de la diferencia de hidrólisis entre los sustratos, pero igualmente de la diferencia entre las señales producidas por la hidrólisis de cada uno de los sustratos.

Ejemplo 5: Utilización de un sustrato de p- naftolbenceína-beta-glucurónido (pNB-β-GUR) con un sustrato a base de indoxilo, el 6-cloro-3-indolil-beta-glucurónido (Rosa-β-GUR) para discriminar bacterias Gram + y bacterias Gram – que poseen actividad beta-glucuronidasa.

- 10 Un volumen de 200 ml de agar Columbia fundido a 50°C, se añadió a diferentes composiciones de sustratos resumidas en la tabla 7 que figura a continuación.

Tabla 7

	Medio 1	Medio 2	Medio 3
pNB-β-GUR		50 mg/l	50 mg/l
Rosa-β-GUR	200 mg/l	-	200 mg/l

Los medios constituidos de este modo se distribuyeron en placas de Petri.

- 15 Diferentes cepas de microorganismos fueron sembradas a la dosis valorada de 10 µl, sobre cada medio, a partir de suspensiones valoradas de 0,5 McFarland, Todos los cultivos fueron incubados 24 horas a 37°C.

- Los resultados de crecimiento y de coloración obtenidos en 24 horas de incubación se exponen en la tabla 5, en la que Co significa crecimiento, C significa color, I significa incoloro, In significa intensidad de coloración, la señal ++ significa crecimiento muy bueno, la señal + significa crecimiento bueno de la cepa, la señal +/- significa crecimiento mediano de la cepa, y la señal – significa ausencia de crecimiento de la cepa. 1 corresponde a una intensidad de coloración débil, 2 mediana, 3 fuerte y 4 muy fuerte.
- 20

Tabla 8

		Medio 1			Medio 2			Medio 3		
		C	In	Co	C	In	Co	C	In	Co
1	<i>E. coli</i>	Rosa	1	+	I		+	Rosa	1	+
2	<i>E. coli</i>	Rosa	3	+	I		+	Rosa	3	+
3	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Rosa	1	+	Anaranjado	1	+	Anaranjado	1	+
4	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Rosa	2	+	Anaranjado	2	+	Anaranjado	2	+
5	<i>S. enteritidis</i>	I		+	I		+	I		+

- Los resultados que figuran en la tabla 8 muestran que las especies Gram negativas y beta-glucuronidasa positivas hidrolizan preferentemente el sustrato a base de indoxilo, mientras que las especies Gram positivas y beta-glucuronidasa positivas hidrolizan preferentemente los sustratos a base de p-naftolbenceína. Debido a este hecho es posible separar bacterias Gram positivas y Gram negativas que presentan la misma actividad enzimática.
- 25

Ejemplo 6 : Utilización de un sustrato a base de alizarina, el alizarina-beta-N-acetilglucosaminida (Aliz-β-NAG) con un sustrato a base de indoxilo, el .5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-N-acetilglucosaminida (X-β-NAG) para discriminar bacterias y levaduras que poseen actividad hexosaminidasa.

30

Un volumen de 200 ml de agar Columbia fundido a 50°C, se añadió a diferentes composiciones de sustratos resumidas en la tabla 9.

Tabla 9

	Medio 1	Medio 2	Medio 3
Aliz-β-NAG	50 mg/l		50 mg/l
X-β-NAG	-	100 mg/l	100 mg/l

Los medios constituidos de este modo se distribuyeron en placas de Petri. Diferentes cepas de microorganismos fueron sembradas a la dosis valorada de 10 μl, sobre cada medio, a partir de suspensiones valoradas de 0,5 McFarland, Todos los cultivos fueron incubados 24 horas a 37°C.

Los resultados de crecimiento y de coloración obtenidos en 24 horas de incubación se exponen en la tabla 6, en la que Co significa crecimiento, C significa color, I significa incoloro, In significa intensidad de coloración, la señal ++ significa crecimiento muy bueno, la señal + significa crecimiento bueno de la cepa, la señal +/- significa crecimiento mediano de la cepa, y la señal – significa ausencia de crecimiento de la cepa. 1 corresponde a una intensidad de coloración débil, 2 mediana, 3 fuerte y 4 muy fuerte.

Tabla 10

		Medio 1			Medio 2			Medio 3		
		C	In	Co	C	In	Co	C	In	Co
1	<i>Candida albicans</i>	Violeta	2	+	Verde	2	+	Azul	3	+
2	<i>C. albicans</i>	Violeta	2	+	Verde	2	+	Azul	3	+
3	<i>E. faecalis</i>	Violeta	3	+	Verde	1	+	Violeta	3	+
4	<i>Enterobacter sakasaki</i>	Violeta	3	+	Verde	2	+	Violeta	3	+
5	<i>E. coli</i>	I		+	I		+	I		+

Los resultados expuestos en la tabla 10 muestran que las bacterias hexosaminidasa positivas hidrolizan preferentemente el sustrato a base de alizarina, mientras que las levaduras hexosaminidasa positivas hidrolizan preferentemente los sustratos a base de indoxilo. Debido a este hecho es posible separar bacterias de levaduras que presentan la misma actividad enzimática, utilizando dos sustratos para esta misma actividad cuya afinidad de la enzima de cada grupo es diferente.

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Procedimiento para la identificación de un primer grupo de microorganismos y de un segundo grupo de microorganismos que expresan una misma actividad enzimática, que comprende las etapas siguientes:
- 5 a) la incubación de dichos primer y segundo grupos de microorganismos en un medio de reacción que comprende un primer sustrato enzimático y un segundo sustrato enzimático, cuyos primer y segundo sustratos enzimáticos están metabolizados por una misma actividad enzimática.
- b) la identificación de dichos grupos de microorganismos.
- 2.- Utilización de un medio de reacción que comprende al menos un primer sustrato enzimático y al menos un segundo sustrato enzimático, cuyos primer y segundo sustratos enzimáticos están metabolizados por una misma actividad enzimática, para la identificación de un primer grupo de microorganismos y un segundo grupo de microorganismos que expresan una misma actividad enzimática.
- 10 3.- Procedimiento según la reivindicación 1 o utilización según la reivindicación 2, según el cual dicha misma actividad enzimática se escoge entre las actividades enzimáticas siguientes: oxidasa, esterasa y peptidasa.
- 4.- Procedimiento según la reivindicación 1 o utilización según la reivindicación 2, según el cual:
- 15 • dicho primer grupo de microorganismos es un grupo de *S. aureus* y dicho segundo grupo es un grupo de *E. faecalis*,
- dicha misma actividad enzimática es una actividad alfa-glucosidasa,
- dichos primer y segundo sustratos son a base de indoxilo.
- 5.- Procedimiento según la reivindicación 1 o utilización según la reivindicación 2, según el cual:
- 20 • dichos primer y segundo grupos de microorganismos son salmonelas de serotipos diferentes
- dicha misma actividad enzimática es una actividad esterasa,
- dichos primer y segundo sustratos son a base de indoxilo.
- 6.- Procedimiento según la reivindicación 1 o utilización según la reivindicación 2, según el cual
- 25 • dicho primer grupo de microorganismos es un grupo de bacterias Gram + y dicho segundo grupo de microorganismos es un grupo de bacterias Gram -,
- dicha misma actividad enzimática es una actividad beta-glucosidasa,
- dicho primer sustrato es un derivado de un flavonoide.
- 7.- Procedimiento según la reivindicación 1 o utilización según la reivindicación 2, según el cual:
- 30 • dicho primer grupo de microorganismos es un grupo de bacterias Gram + y dicho segundo grupo de microorganismos es un grupo de bacterias Gram -,
- dicha misma actividad enzimática es una actividad beta-glucuronidasa,
- dicho primer sustrato es a base de naftol y dicho segundo sustrato es a base de indoxilo.
- 8.- Procedimiento según la reivindicación 1 o utilización según la reivindicación 2, según el cual:
- 35 • dicho primer grupo de microorganismos es un grupo de levaduras y dicho segundo grupo de microorganismos es un grupo de bacterias,
- dicha misma actividad enzimática es una actividad hexosaminidasa,
- dicho primer sustrato es a base de alizarina y dicho segundo sustrato es a base de indoxilo.
- 9.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 8, según el cual el medio de reacción comprende al menos otro sustrato metabolizado por al menos otra actividad enzimática, cuya otra actividad enzimática está escogida preferentemente entre una actividad  $\beta$ -D-glucuronidasa,  $\beta$ -glucosidasa, triptofanasa o desaminasa.
- 40

10.- Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 2, 3 a 8, según la cual el medio de reacción comprende al menos otro sustrato metabolizado por al menos otra actividad enzimática, cuya otra actividad enzimática está escogida preferentemente entre una actividad  $\beta$ -D-glucuronidasa,  $\beta$ -glucosidasa, triptofanasa o desaminasa.