

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 824**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/04** (2006.01)

**C12Q 1/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2010 E 10762956 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014 EP 2459738**

54 Título: **Nuevos sustratos enzimáticos de nitrorreductasa**

30 Prioridad:

**30.07.2009 FR 0903761**

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

**30.01.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FABREGA, OLIVIER;  
JAMES, ARTHUR;  
ORENGA, SYLVAIN;  
PERRY, JOHN;  
SALWATURA, VINDHYA LAKSHIKA y  
STANFORTH, STEPHEN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 527 824 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

## Nuevos sustratos enzimáticos de nitrorreductasa

5 La presente invención se refiere a nuevos sustratos enzimáticos para la detección de actividad nitrorreductasa. Estos sustratos son utilizables en las aplicaciones que comprenden una etapa de reducción enzimática que produce una señal fisicoquímica, en particular en microbiología, bioquímica, inmunología, biología molecular, histología, etc.

10 Existen actualmente muy numerosos medios que permiten la detección de microorganismos. Esta detección se puede basar en particular en la utilización de sustratos particulares, específicos de una enzima del microorganismo que se desea detectar. De manera general, los sustratos sintéticos de enzimas están constituidos de tal manera que el sustrato y el producto de su metabolismo por la enzima diana poseen unas propiedades fisicoquímicas diferentes, que permiten distinguirlos y evaluarlos si todo o parte del sustrato se ha convertido en producto por la enzima. Por ejemplo, el producto del metabolismo enzimático puede ser cromógeno o fluorescente. Así, en el caso de las bacterias mediante la selección de los sustratos, según haya reacción o no, es posible caracterizar la naturaleza de un microorganismo. Se puede particularmente utilizar una actividad nitrorreductasa para revelar un grupo, un género o una especie de bacterias. Puede asimismo ser utilizado para seguir el metabolismo reductor de microorganismos, por ejemplo unido a su crecimiento o a la inhibición de este crecimiento.

20 La capacidad de ciertas bacterias para reducir los compuestos nitro-aromáticos se conoce desde hace numerosos años. Asnis (1957) ha detallado el aislamiento de una flavoproteína a partir de extractos de *E. coli* que era capaz de reducir el ácido p-nitrobenzoico. A partir de este informe, la actividad nitroaril-reductasa se identificó en diversas variedades de organismos. Esto incluye los aerobios estrictos tales como *Pseudomonas spp.* (Won *et al.* 1974) y *Nocardia spp.* (Villanueva 1964), los anaerobios estrictos tales como *Clostridium spp.* (Ancermaier & Simon 1983) y *Veillonella spp.* (McCormick *et al.* 1976), o también los hongos (Masuda & Ozaki 1993) y los parásitos eucarióticos (Douch 1975). Existe una gama de sustratos que se consideran como susceptibles de ser reducidos por las nitroaril-reductasas bacterianas. Se trata sobretodo de compuestos nitroaromáticos tales como el ácido p-nitrobenzoico, el p-nitrofenol, la p-nitroanilina y el 2,4,6-trinitrotolueno (McCormick *et al.* 1976).

30 De manera general, la detección de la actividad enzimática nitrorreductasa se realiza mediante unos métodos indirectos tales como el seguimiento de la desaparición del sustrato o de un cofactor. Por ejemplo, Kitamura *et al.* (1983) han estudiado la reducción del metil p-nitrobenzoato y de una gama de otros compuestos aromáticos nitrados con unos extractos de *E. coli*. Sin embargo, este método es poco sensible y no es adecuado para una detección en medio heterogéneo. Se puede citar también la solicitud WO 00/28073 que describe un sustrato fluorógeno a base de nitrocoumarina para la detección directa de las actividades nitroaril-reductasa. Este tipo de compuesto nitroaromático es capaz de producir, después de la reducción, un compuesto muy fluorescente que es por lo tanto fácilmente detectable. Sin embargo, este sustrato no es muy adecuado para una detección en medio heterogéneo. Otros sustratos enzimáticos de nitrorreductasa son descritos en la solicitud de patente FR2916762.

40 La presente invención propone por lo tanto mejorar los sustratos de nitrorreductasa que permitan la detección de microorganismos. Comparativamente a los sustratos existentes, estos nuevos sustratos son de síntesis fácil, y pueden ser utilizados en particular en medios gelificados para la detección de microorganismos ya que producen una coloración que no se difunde en el medio de reacción.

45 Además, la presente invención contribuye a mejorar el estado de la técnica por que los compuestos según la invención permiten la detección de microorganismos que presentan conjuntamente una actividad nitrorreductasa y un metabolismo que conlleva una variación de pH del medio.

50 Antes de avanzar en la descripción de la invención, se dan a continuación las definiciones a fin de facilitar la descripción de la invención.

55 Por sustrato enzimático, se entiende un sustrato que puede ser modificado por una enzima en un producto que permite la detección, directa o indirecta, de un microorganismo, de una célula o de un orgánulo. En el caso de los sustratos de nitrorreductasa, este sustrato comprende en particular una función nitrato que está parcial o totalmente reducida por la actividad enzimática a ser revelada, modificando la reducción de esta función nitrato algunas propiedades fisicoquímicas de la molécula, permitiendo supervisar esta reducción.

60 Los sustratos según la invención son adecuados para una utilización en citometría de flujo, ya que, al permanecer el producto de la reducción principalmente localizado en la célula que expresa la actividad enzimática, es posible calcular específicamente las células que expresan esta actividad, incluso separarlas del resto de la muestra.

Los sustratos según la invención son también muy adecuados para una utilización en histoenzimología, ya que al permanecer el producto de reducción principalmente localizado en el medio de la reducción, es posible identificar específicamente las células u orgánulos que expresan esta actividad dentro de un tejido.

65

Debido a su baja toxicidad, los sustratos según la invención son muy adecuados para el seguimiento de actividad nitrorreductasa en cultivo celular.

5 Los sustratos según la invención son particularmente muy adecuados para una utilización en el medio de detección y/o de identificación, ya que producen una coloración o una fluorescencia que no se difunde en el medio de reacción. En la presente solicitud, el término coloración se utiliza para cubrir una coloración en el espectro visible, absorción de luz, o una fluorescencia, absorción a una longitud de onda ( $\lambda_{ex}$ ) y emisión a una longitud de onda superior ( $\lambda_{em}$ ,  $\lambda_{em} > \lambda_{ex}$ ).

10 Los sustratos de la invención pueden ser salificados, es decir en forma de sal tal como cloruro, bromuro, yoduro potasio o trifluoroacetato.

15 Por indicador de pH, se entiende una sustancia química cuyo color y/o fluorescencia varía en función de las modificaciones de pH del medio, estando dichas modificaciones relacionadas o no con el metabolismo del o de los microorganismos en crecimiento sobre dicho medio.

Por nitrorreductasa, se entiende una enzima que puede reducir total o parcialmente un grupo  $\text{NO}_2$ .

20 Por grupo alquilo, se entiende una cadena de grupos hidrocarbonados saturados, tales como en particular un alquilo de  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ , es decir un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. A título de ejemplo, se puede citar el metilo, el etilo, el propilo, el isopropilo, el butilo, el t-butilo, el pentilo, el iso-pentilo y el hexilo.

25 Por grupo arilo, se entiende un grupo funcional (o sustituyente) que deriva de un núcleo aromático tal como un núcleo aromático de  $\text{C}_6$ - $\text{C}_{10}$ , en particular fenilo, bencilo, 1-naftilo o 2-naftilo.

30 Por grupo carboxilo, se entiende en particular un grupo funcional compuesto de un átomo de carbono, unido por un doble enlace a un primer átomo de oxígeno, y por un enlace simple a un segundo átomo de oxígeno, él mismo cargado negativamente o unido a un átomo de hidrógeno. En función del  $\text{pK}_a$  de la molécula y del pH del medio, el grupo carboxilo puede estar en forma ionizada, es decir sin H unido al segundo átomo de oxígeno, que está entonces cargado negativamente.

35 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, de una célula o de un orgánulo. Este medio de reacción puede ser utilizado en citometría de flujo, histoenzimología, cultivo celular, etc. o como medio de detección y/o de identificación de microorganismos.

40 El medio de reacción puede ser sólido, semi-sólido o líquido. Por medio sólido, se entiende por ejemplo un medio gelificado. El agar es el agente gelificante tradicional en microbiología para el cultivo de los microorganismos, pero es posible utilizar gelatina o agarosa. Están disponibles en el comercio un cierto número de preparaciones, como por ejemplo el agar Columbia, la gelosa tripcasa-soja, la gelosa Mac Conkey, la gelosa Sabouraud o más generalmente las descritas en el Handbook of Microbiological Media (CRC Press).

45 El medio de reacción puede comprender uno o varios elementos en combinación, tales como unos aminoácidos, unas peptonas, unos hidratos de carbono, unos nucleótidos, unos minerales, unas vitaminas, unos antibióticos, unos tensioactivos, unos tampones, unas sales de fosfato, de amonio, de sodio, de metales.

50 El medio puede comprender también un colorante. A título indicativo, se puede citar como colorante el azul de Evans, el rojo neutro, la sangre de carnero, la sangre de caballo, un opacificante tal como el óxido de titanio, la nitroanilina, el verde malaquita, el verde brillante...

El medio de reacción puede ser un medio de detección y/o de identificación, es decir un medio de revelación o un medio de cultivo y de revelación. En el primer caso, el cultivo de los microorganismos se efectúa antes de la inoculación y, en el segundo caso, el medio de detección y/o de identificación constituye también el medio de cultivo.

55 Por muestra biológica, se entiende una muestra clínica, procedente de una extracción de líquido biológico o una muestra alimenticia, procedente de cualquier tipo de alimento o una muestra cosmética o farmacéutica procedente de cualquier preparación cosmética o farmacéutica. Esta muestra puede así ser líquida o sólida y se puede citar de manera no limitativa, una muestra clínica de sangre, de plasma, de orinas, de heces, de extracciones de la nariz, de la garganta, de la piel, de heridas, de líquido cefalorraquídeo, una muestra alimenticia de agua, de bebidas tales como la leche, un zumo de frutas; de yogur, de carne, de huevos, de verduras, de mahonesa, de queso; de pescado, etc., una muestra alimenticia procedente de una alimentación destinada a los animales, tal como en particular una muestra procedente de harinas animales. La muestra puede también proceder de una extracción del entorno clínico, de la cría o de la producción alimenticia, cosmética o farmacéutica. Por extracción de entorno, se entiende en particular una extracción de la superficie, del líquido, de la materia prima o del producto. Por muestra, se entiende por lo tanto la extracción en sí misma (legra, heces, alimentos, etc.) tanto como colonias de microorganismos

procedentes de dicha extracción (por ejemplo después del aislamiento sobre un medio de cultivo gelificado, o en un caldo de enriquecimiento inoculado con dicha extracción).

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

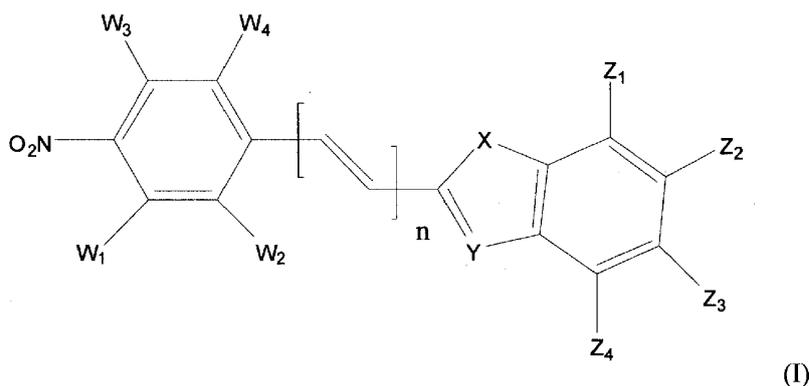
10 A título de bacterias Gram negativas, se pueden citar las bacterias de los géneros siguientes: *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Morganella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Acinetobacter*, *Branhamella*,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

15 A título de bacterias Gram positivas, se pueden citar las bacterias de los géneros siguientes: *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Clostridium*, *Gardnerella*, *Kocuria*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Falkamia*, *Gemella*, *Pediococcus*, *Mycobacterium* y *Corynebacterium*.

20 A título de levaduras, se pueden citar las levaduras de los géneros siguientes: *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces* y *Trichosporon*.

Preferiblemente, pertenecen a los géneros *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*.

25 Para ello, la invención se refiere a la utilización de un compuesto de la fórmula (1) siguiente, como sustrato enzimático para la detección de una actividad nitrorreductasa:



30 según la cual:

- $W_1$ ,  $W_2$ ,  $W_3$  y  $W_4$  son independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, alcoxi, tiometilo, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo (incluyendo sus ésteres o amidas) o cualquier combinación de estos

35 •  $n = 0, 1$  o  $2$

- X es NR, CZ<sub>5</sub>Z<sub>6</sub>, S u O, siendo R H, alquilo, aralquilo, arilo, alcanico o alquilsulfónico, siendo Z<sub>5</sub> y Z<sub>6</sub> un alquilo

40 • Y es N o N<sup>+</sup>R, siendo R alquilo, aralquilo, arilo, alcanico o alquilsulfónico

- siendo Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> y Z<sub>4</sub>, independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, arilo, alcoxi, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo, sulfonilo, incluyendo los ésteres o amidas de carboxilo o sulfonilo

45 y sus sales.

Según otro modo de realización de la invención, esta se refiere a la utilización de un compuesto de la fórmula (I) tal como se ha indicado anteriormente, como sustrato enzimático para la detección de una actividad nitrorreductasa, e indicador de una variación de pH.

50 Según un modo preferido de realización de la invención,  $n = 1$

Según un modo preferido de realización de la invención,  $W_1$ ,  $W_2$ ,  $W_3$  y  $W_4$  son independientemente H.

Según un modo preferido de realización de la invención, X es S o CZ<sub>5</sub>Z<sub>6</sub>, preferiblemente CCH<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>.

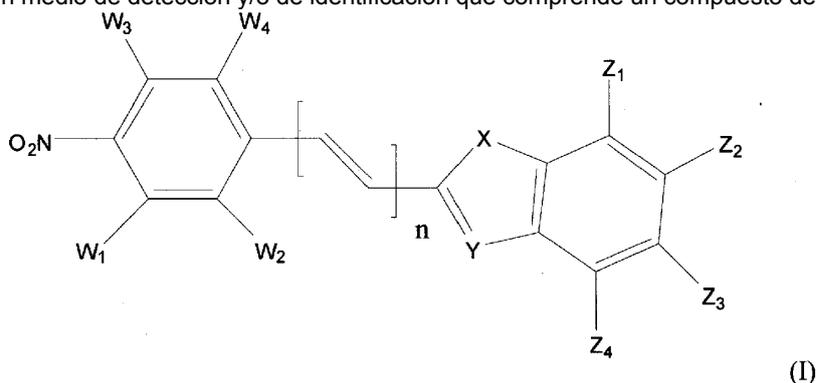
Según un modo preferido de realización de la invención, Y es N o N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>.

Según un modo preferido de realización de la invención, Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> y Z<sub>4</sub>, son H.

Según un modo preferido de realización de la invención, dicho compuesto se selecciona de entre 2-(4'-nitroestiril)-benzotiazol, cloruro de 2-(4'-nitroestiril)-N-metil-benzotiazolio, dibromuro de 2-(4'-nitroestiril)-1,3,3-trimetil-indolinio.

La invención se refiere asimismo a un procedimiento para la detección en unos microorganismos de una actividad nitrorreductasa, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:

a) Disponer en un medio de detección y/o de identificación que comprende un compuesto de la fórmula (I)



según la cual:

- W<sub>1</sub>, W<sub>2</sub>, W<sub>3</sub> y W<sub>4</sub> son independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, alcoxi, tiometilo, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo (incluyendo sus ésteres o amidas) o cualquier combinación de estos

- n = 0, 1 o 2

- X es NR, CZ<sub>5</sub>Z<sub>6</sub>, S u O, siendo R H, alquilo, aralquilo, arilo, alcanoico o alquilsulfónico, siendo Z<sub>5</sub> y Z<sub>6</sub> un alquilo

- Y es N o N<sup>+</sup>R, siendo R H, alquilo, aralquilo, arilo, alcanoico o alquilsulfónico

- siendo Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> y Z<sub>4</sub>, independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, arilo, alcoxi, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo, sulfonilo, incluyendo los ésteres o amidas de carboxilo o sulfonilo

y sus sales;

b) inocular el medio con una muestra biológica a ensayar,

c) dejar incubar, y

d) revelar la presencia de al menos una actividad nitrorreductasa.

Según otro modo de realización de la invención, esta se refiere también a un procedimiento para la detección de una actividad nitrorreductasa en los microorganismos, y de una variación de pH, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:

a) disponer de un medio de detección y/o de identificación que comprende el compuesto de la fórmula (I) tal como se indica antes;

b) inocular el medio con una muestra biológica a ensayar;

c) dejar incubar;

d) observar un cambio de color y/o de fluorescencia del medio de detección y/o de identificación, que revela la presencia de al menos una actividad nitrorreductasa, y una variación de pH en dicho medio de detección y/o de identificación.

Según un modo preferido de realización de la invención,  $n = 1$

Según un modo preferido de realización de la invención,  $W_1$ ,  $W_2$ ,  $W_3$  y  $W_4$  son independientemente H.

Según un modo preferido de realización de la invención, X es S o  $CZ_5Z_6$ , preferiblemente  $CCH_3CH_3$ .

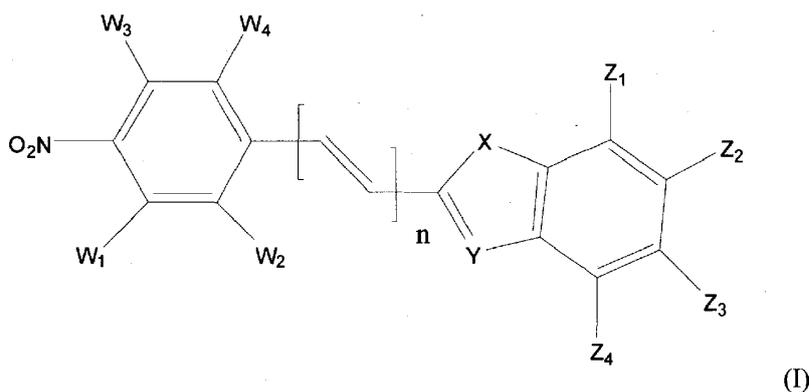
Según un modo preferido de realización de la invención, Y es N o  $N^+CH_3$ .

Según un modo preferido de realización de la invención,  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$  y  $Z_4$ , son H.

Según un modo preferido de realización de la invención, dicho compuesto se selecciona entre: 2-(4'-Nitroestiril)-benzotiazol, cloruro de 2-(4'-nitroestiril)-N-metil-benzotiazolio, dibromuro de 2-(4'-nitroestiril)-1,3,3-trimetil-indolinio.

La inoculación de los microorganismos se puede realizar mediante todas las técnicas de inoculación conocidas por el experto en la materia. Una etapa de incubación se puede realizar a una temperatura para la cual la actividad enzimática que se desea detectar es óptima, que el experto en la materia puede seleccionar fácilmente según la actividad enzimática a detectar. La etapa d) puede efectuarse por un examen visual, por colorimetría o fluorimetría. Durante la etapa d), se puede revelar la presencia de la actividad nitrorreductasa, sola o en combinación con al menos otra actividad enzimática.

La invención se refiere asimismo a un medio de detección y/o de identificación de microorganismos que comprende un compuesto de fórmula (I) siguiente:



según la cual:

- $W_1$ ,  $W_2$ ,  $W_3$  y  $W_4$  son independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, alcoxi, tiometilo, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo (incluyendo sus ésteres o amidas) o cualquier combinación de estos

- $n = 0, 1$  o  $2$

- X es NR,  $CZ_5Z_6$ , S u O, siendo R H, alquilo, aralquilo, arilo, alcanico o alquilsulfónico, siendo  $Z_5$  y  $Z_6$  un alquilo

- Y es N o  $N^+R$ , siendo R, alquilo, aralquilo, arilo, alcanico o alquilsulfónico

- siendo  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$  y  $Z_4$ , independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, arilo, alcoxi, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo, sulfonilo, incluyendo los ésteres o amidas de carboxilo o sulfonilo

y sus sales.

Según un modo preferido de realización de la invención,  $n = 1$

Según un modo preferido de realización de la invención,  $W_1$ ,  $W_2$ ,  $W_3$  y  $W_4$  son independientemente H.

Según un modo preferido de realización de la invención, X es S o  $CZ_5Z_6$ , preferiblemente  $CCH_3CH_3$ .

Según un modo preferido de realización de la invención, Y es N o  $N^+CH_3$ .

Según un modo preferido de realización de la invención,  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $Z_3$  y  $Z_4$  son H.

Según un modo preferido de realización de la invención, dicho compuesto se selecciona entre: 2-(4'-Nitroestiril)-benzotiazol, cloruro de 2-(4'-nitroestiril)-N-metil-benzotiazolio, dibromuro de 2-(4'-nitroestiril)-1,3,3-trimetil-indolinio.

5 Preferiblemente, dicho medio de reacción es un medio de detección y/o de identificación de microorganismos, comprendiendo dicho medio al menos una molécula utilizada a título de sustrato enzimático tal como se ha definido anteriormente.

10 Preferiblemente, dicho compuesto está a una concentración comprendida entre 1 y 1000 mg/l, preferiblemente entre 10 y 500 mg/l.

15 Preferiblemente, dicho medio de reacción es un medio de detección y/o de identificación de microorganismos, comprendiendo dicho medio además por lo menos un compuesto cuyo metabolismo conlleva una variación de pH. Preferiblemente, dicho compuesto es un azúcar, un aminoácido o un ácido orgánico. Preferiblemente, dicho compuesto es una pentosa, una hexosa, un diósido, un triósido o un poliósido. Preferiblemente, dicho compuesto está en una concentración comprendida entre 0,1 y 100 g/l, preferiblemente entre 1 y 50 g/l. Preferiblemente, dicho compuesto está en una concentración comprendida entre 5 y 30 g/l.

20 Según un modo particular de realización de la invención, dicho medio de detección y/o de identificación según la invención comprende además al menos otro sustrato enzimático, específico de una actividad enzimática diferente de la actividad nitrorreductasa detectada por la molécula según la invención.

25 El metabolismo enzimático del o de los otros sustratos genera una señal detectable, diferente de la señal generada por el compuesto según la invención utilizado a título de sustrato enzimático, como por ejemplo unos productos coloreados o fluorescentes diferentes, para permitir la demostración, como la detección y/o la identificación y/o la cuantificación de uno o más microorganismos. A título de otro sustrato específico, se puede utilizar cualquier otro sustrato clásicamente utilizado en la detección de los microorganismos. La concentración del otro sustrato enzimático específico está generalmente comprendida entre 0,01 y 1 g/l. El experto en la materia podrá determinar fácilmente tal concentración en función del sustrato utilizado. A título indicativo, es posible combinar los compuestos según la invención con unos sustratos enzimáticos de peptidasa, de osidasa, de esterasa o de reductasa.

30 Según un modo particular de realización de la invención, dicho medio de detección y/o de identificación según la invención comprende además al menos otro sustrato enzimático específico de la actividad nitrorreductasa. Mediante la selección particular de sustratos, es entonces posible identificar unos grupos de microorganismos que expresan una misma actividad enzimática. La concentración del otro sustrato enzimático específico está generalmente comprendida entre 0,01 y 1 g/l. El experto en la materia podrá determinar fácilmente tal concentración en función del sustrato utilizado.

35 Según un modo particular de realización de la invención, dicho medio de detección y/o de identificación según la invención comprende además al menos un indicador metabólico, específico de una actividad metabólica diferente de la detectada por el compuesto según la invención.

40 Este indicador metabólico puede ser en particular una fuente de carbono o de nitrógeno asociada o no a un reactivo que revela su metabolismo.

45 Los siguientes ejemplos son dados a título explicativo y no tienen ningún carácter limitativo. Permitirán entender mejor la invención.

### Ejemplos

50 Ejemplo – Utilización de sustratos de fórmula I según la invención para detectar una actividad nitrorreductasa

#### a) Sustratos de nitrorreductasa

55 Se sintetizó el 2-(4-nitroestiril)-1,3,3-trimetil-indolinio yodado, a partir de 1,3,3-trimetil-indolinio yodado según el método de Bahner *et al.* (C. Bahner, J. Dale, J. Fain, E. Franklin, J. Goan, W. Stump, M. West y J. Wilson, Journal of Organic Chemistry, 1957, 22, 1110).

#### b) Preparación del medio

60 Se disolvieron 40 mg del sustrato en 4 ml de Dimetilsulfóxido y se añadieron 400 ml de medio Columbia previamente autoclavado. El medio se repartió en cajas de Petri de 90 mm de diámetro a razón de 20 ml por caja.

#### c) Inoculación e incubación

65 Se inoculan diez cepas de microorganismos procedentes de colecciones y que pertenecen a diferentes especies de bacterias y levaduras en focos de aproximadamente 10 000 unidades que forman colonias.

Los medios son incubados durante 24 horas a 37°C, después las colonias formadas son examinadas visualmente.

d) Lectura de los resultados

5

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla siguiente.

	Crecimiento	Coloración
E. coli NCTC 10418	++	-
S. marcescens NCTC 10211	++	-
Ps. aeruginosa NCTC 10662	++	-
B. cepacia 1222	+	-
Y. enterocolitica NCTC 11176	++	-
S. typhimurium NCTC 74	+	-
C. freundii 46262 (wild)	++	-
M. morgani 462403 (wild)	++	-
E. cloacae NCTC 11936	++	Rosa pálido
P. rettgeri NCTC 7475	++	Rosa pálido

e) Conclusiones

10

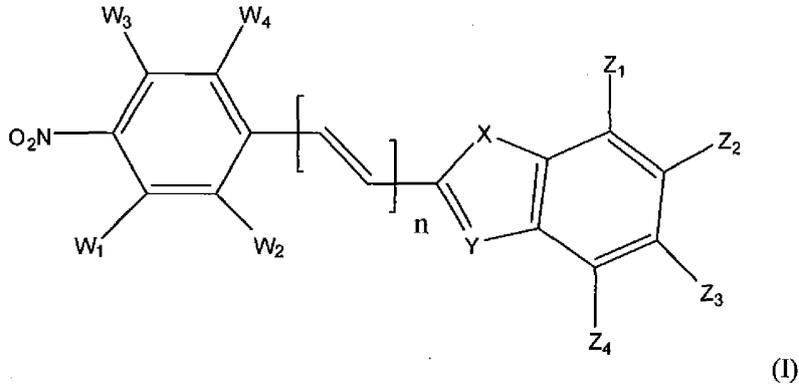
En los medios según la invención, es posible detectar una actividad nitrorreductasa de microorganismos *E. cloacae* y *P-rettgeri* gracias a la coloración de las colonias.

15

Mediante las diferentes variaciones de estructura de los sustratos de nitrorreductasa según la invención, es posible distinguir diferentes grupos de microorganismos y obtener diferentes colores de colonias. Además, al no difundirse la coloración en el medio de reacción, es posible distinguir y contar las células o colonias que expresan la actividad nitrorreductasa independientemente de las que no lo expresan.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de un compuesto de la fórmula (I) siguiente, como sustrato enzimático para la detección de una actividad nitrorreductasa:

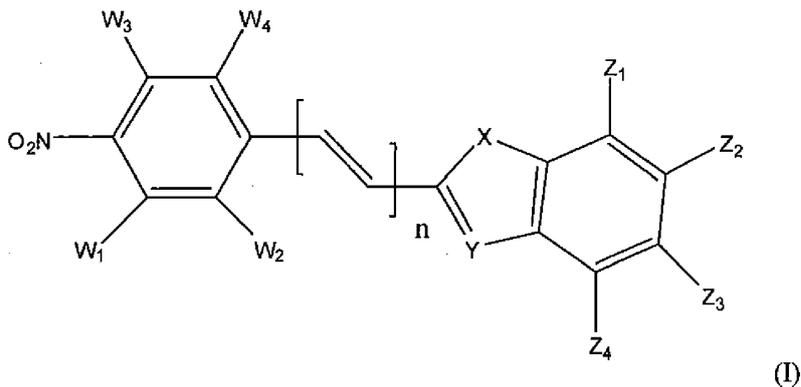


según la cual:

- $W_1$ ,  $W_2$ ,  $W_3$  y  $W_4$  son independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, alcoxi, tiometilo, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo (incluyendo sus ésteres o amidas) o cualquier combinación de estos
- $n = 0, 1$  o  $2$
- X es NR, CZ<sub>5</sub>Z<sub>6</sub>, S u O, siendo R H, alquilo, aralquilo, arilo, alcanoico o alquilsulfónico, siendo Z<sub>5</sub> y Z<sub>6</sub> un alquilo
- Y es N o N<sup>+</sup>R, siendo R alquilo, aralquilo, arilo, alcanoico o alquilsulfónico
- siendo Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> y Z<sub>4</sub>, independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, arilo, alcoxi, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo, sulfonilo, incluyendo los ésteres o amidas de carboxilo o sulfonilo

y sus sales.

2. Utilización de un compuesto de la fórmula (I) siguiente, como sustrato enzimático para la detección de una actividad nitrorreductasa y un indicador de una variación de pH:



según la cual:

- $W_1$ ,  $W_2$ ,  $W_3$  y  $W_4$  son independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, alcoxi, tiometilo, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo (incluyendo sus ésteres o amidas) o cualquier combinación de estos
- $n = 0, 1$  o  $2$
- X es NR, CZ<sub>5</sub>Z<sub>6</sub>, S u O, siendo R H, alquilo, aralquilo, arilo, alcanoico o alquilsulfónico, siendo Z<sub>5</sub> y Z<sub>6</sub> un alquilo

- Y es N o N<sup>+</sup>R, siendo R alquilo, aralquilo, arilo, alcanoico o alquilsulfónico
- siendo Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub>, Z<sub>4</sub>, Z<sub>5</sub> y Z<sub>6</sub>, independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, arilo, alcoxi, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo, sulfonilo, incluyendo los ésteres o amidas de carboxilo o sulfonilo

5

y sus sales.

3. Utilización de un compuesto de fórmula I según la reivindicación 1 o 2, según la cual n = 1

10

4. Utilización de un compuesto de fórmula I según una de las reivindicaciones anteriores, según la cual W<sub>1</sub>, W<sub>2</sub>, W<sub>3</sub> y W<sub>4</sub> son independientemente H.

15

5. Utilización de un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, según la cual X es S o CZ<sub>5</sub>Z<sub>6</sub>, preferiblemente CCH<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>.

20

6. Utilización de un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, según la cual Y es N o N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>.

25

7. Utilización de un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores según la cual Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> y Z<sub>4</sub>, son H.

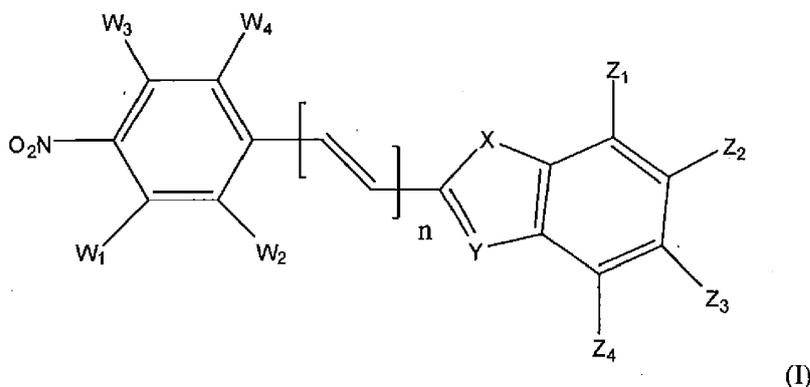
8. Utilización de un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1 o 2, según la cual dicho compuesto se selecciona entre 2-(4'-Nitroestiril)-benzotiazol, cloruro de 2-(4'-nitroestiril)-N-metil-benzotiazolio, dibromuro de 2-(4'-nitroestiril)-1,3,3-trimetil-indolinio.

30

9. Procedimiento para la detección en microorganismos de una actividad nitrorreductasa, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:

a) Disponer en un medio de detección y/o de identificación que comprende un compuesto de la fórmula (I)

30



según la cual:

35

- W<sub>1</sub>, W<sub>2</sub>, W<sub>3</sub> y W<sub>4</sub> son independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, alcoxi, tiometilo, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo (incluyendo sus ésteres o amidas) o cualquier combinación de estos

- n = 0, 1 o 2

40

- X es NR, CZ<sub>5</sub>Z<sub>6</sub>, S u O, siendo R H, alquilo, aralquilo, arilo, alcanoico o alquilsulfónico, siendo Z<sub>5</sub> y Z<sub>6</sub> un alquilo

- Y es N o N<sup>+</sup>R, siendo R alquilo, aralquilo, arilo, alcanoico o alquilsulfónico

45

- siendo Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> y Z<sub>4</sub>, independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, arilo, alcoxi, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo, sulfonilo, incluyendo los ésteres o amidas de carboxilo o sulfonilo

y sus sales;

50

b) inocular el medio con una muestra biológica a ensayar,

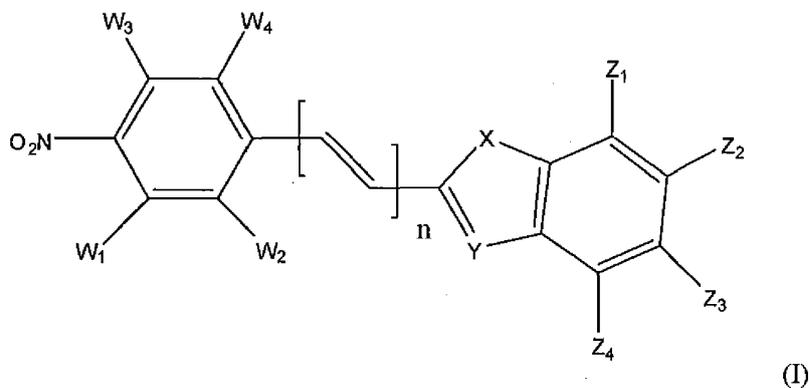
c) dejar incubar, y

d) revelar la presencia de al menos una actividad nitrorreductasa.

10. Procedimiento para la detección de una actividad nitrorreductasa en microorganismos y de una variación de pH, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:

5

a) Disponer en un medio de detección y/o de identificación que comprende un compuesto de la fórmula (I)



10 según la cual:

- $W_1$ ,  $W_2$ ,  $W_3$  y  $W_4$  son independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, alcoxi, tiometilo, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo (incluyendo sus ésteres o amidas) o cualquier combinación de estos

15 •  $n = 0, 1$  o  $2$

- X es NR, CZ<sub>5</sub>Z<sub>6</sub>, S u O, siendo R H, alquilo, aralquilo, arilo, alcanico o alquilsulfónico, siendo Z<sub>5</sub> y Z<sub>6</sub> un alquilo

20 • Y es N o N<sup>+</sup>R, siendo R alquilo, aralquilo, arilo, alcanico o alquilsulfónico

- siendo Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> y Z<sub>4</sub>, independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, arilo, alcoxi, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo, sulfonilo, incluyendo los ésteres o amidas de carboxilo o sulfonilo

25 y sus sales;

b) inocular el medio con una muestra biológica a ensayar,

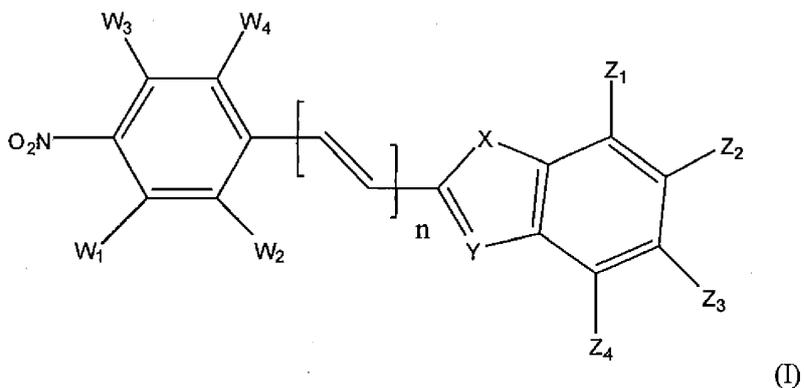
c) dejar incubar, y

30

d) observar un cambio de color y/o de fluorescencia del medio de detección y/o de identificación, que revela la presencia de al menos una actividad nitrorreductasa, y una variación de pH en dicho medio.

11. Medio de detección y/o de identificación de microorganismos que comprende un compuesto de fórmula (I) siguiente:

35



según la cual:

40

•  $W_1$ ,  $W_2$ ,  $W_3$  y  $W_4$  son independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, alcoxi, tiometilo, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo (incluyendo sus ésteres o amidas) o cualquier combinación de estos

•  $n = 0, 1$  o  $2$

5

• X es NR, CZ<sub>5</sub>Z<sub>6</sub>, S u O, siendo R H, alquilo, aralquilo, arilo, alcanoico o alquilsulfónico, siendo Z<sub>5</sub> y Z<sub>6</sub> un alquilo

10

• Y es N o N<sup>+</sup>R, siendo R alquilo, aralquilo, arilo, alcanoico o alquilsulfónico

• siendo Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub> y Z<sub>4</sub>, independientemente H, Br, Cl, F, I, alquilo, arilo, alcoxi, perfluoroalquilo, nitro, ciano, carboxilo, sulfonilo, incluyendo los ésteres o amidas de carboxilo o sulfonilo

15

y sus sales

12. Medio de detección y/o de identificación de microorganismos según la reivindicación 11, que comprende además al menos un compuesto cuyo metabolismo conlleva una variación de pH de dicho medio, siendo dicho compuesto un azúcar, un aminoácido o un ácido orgánico.