

MEMÓRIA DESCRITIVA
DA
PATENTE DE INVENÇÃO
Nº 95 633

NOME: BIO MERIEUX S.A., francesa, com sede em Marcy l'Etoile, 69260 Charbonnières Les Bains, França

EPÍGRAFE: "Processo de preparação de reagentes para a detecção de microorganismos e de detecção dos microorganismos com aqueles reagentes"

INVENTORES: Daniel Monget

Reivindicação do direito de prioridade (ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883):

França, em 20 de Outubro de 1989, sob o nº 89 14087

71 679

DoG/MK/A 03 B 1108

PT



PATENTE Nº 95 633

"Processo de preparação de reagentes para a detecção de microorganismos e de detecção dos microorganismos com aqueles reagentes"

para que

BIO MERIEUX S.A., pretende obter privilégio de invenção em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se a um processo de preparação de um reagente para a detecção de microorganismos, o qual compreende a associação de um meio reaccional em fase aquosa, contendo uma fonte de carbono e uma fonte de azoto, e de um marcador constituído pela resorufina, ou por qualquer composto que possua uma estrutura química similar.

O reagente assim obtido é empregue na identificação de microorganismos, bem como na obtenção de antibiogramas e de antifungigramas.

71 679

DoG/MK/A 03 B 1108

PT



-2-

MEMÓRIA DESCRITIVA

O presente invento refere-se, de maneira geral, à detecção de microorganismos em diferentes meios ou sobre substratos diferentes, para diferentes aplicações ou fins, tais como a detecção ou identificação microbiana.

Mais precisamente, o invento refere-se aos reagentes, compreendendo um meio reaccional em fase aquosa, o qual contém pelo menos uma fonte de carbono, assim como um marcador luminescente, cuja emissão luminosa é modificável em consequência do desenvolvimento ou do metabolismo do microorganismo a detectar, introduzido no meio reaccional.

Por microorganismo entende-se, nomeadamente os micróbios, as bactérias e as leveduras.

Por "emissão luminosa", deve entender-se toda a radiação luminosa emitida sob efeito de uma excitação exterior, nomeadamente luminosa, no domínio do visível ou não, susceptível de ser modificada pelo desenvolvimento do microorganismo no meio reaccional e de ser observada, controlada ou medida por qualquer meio de detecção óptica, entre os quais a simples observação a olho nú. Deduzem-se desta definição várias propriedades luminosas, tais como a luminiscência, a fluorescência, a fosforescência, visíveis, ou não, a olho nú, por exemplo.

Desde há muitos anos que os fabricantes e profissionais de reagentes ou de processos de detecção de microorganismos, procuram uma solução que apresente o conjunto de características essenciais seguintes:

- ter um carácter universal, isto é independente do tipo ou espécie de microorganismos procurados
- ser substancialmente independente da natureza do meio ou do substrato, no qual os microorganismos são pesquisados
- apresentar uma grande sensibilidade.

Nenhum dos processos disponíveis actualmente, incluindo os



mais recentes, permite responder a todas estas exigências, como aqui mostrado a seguir.

Um primeiro processo, e o mais simples, consiste em obter uma amostra, eventualmente diluir esta de modo sucessivo e em aplicar a amostra obtida à superfície do meio nutritivo gelose. Depois de incubação durante 24 a 48 horas, procede-se, por meios manuais ou vídeo, ao controlo da presença de microorganismos e, eventualmente, à sua contagem. A técnica, que consiste em emergir as lâminas impregnadas com um meio nutritivo, directamente no meio controlado, e em controlar depois de incubação, a presença de microorganismos nas lâminas, constitui, de facto, uma variante deste primeiro processo.

Uma tal solução é pouco sensível e pouco fiável, em particular quando se empregam meios de controlo vídeo. Um tal processo implica igualmente, adaptar ou escolher o meio nutritivo em função dos microorganismos procurados.

Um segundo processo, muito próximo do primeiro, consiste em pigmentar ou colorir a amostra obtida, ou provocar a sua fluorescência com quaisquer substâncias apropriadas, tais como o laranja de acridina, e depois em observar directamente a amostra assim tratada, por exemplo ao microscópio. Essencialmente, um tal processo apresenta inconvenientes comparáveis aos do primeiro processo; em particular, uma tal solução permanece manual e a sua automatização torna-se difícil.

Um terceiro processo consiste em obter uma amostra e em pôr esta última em cultura durante um período predeterminado, e em seguida observar o meio de cultura por nefelometria ou por turbidimetria. Por outras palavras, a presença de microorganismos é revelada pela opacidade do meio de cultura. Um tal processo mostra-se muito pouco sensível, e a opacidade observada não resulta apenas da presença de microorganismos, de modo que esta solução não se mostra utilizável ou explorável em meios biológicos complexos, por exemplo as amostras de sangue.

Foram propostos vários processos mais elaborados, para de-



tectar microorganismos, por via bioquímica e fazendo uso da colorimetria ou da fluorimetria.

Um quarto processo consiste em contactar uma amostra a controlar e um reagente compreendendo um hidrato de carbono, como a glucose, e um indicador do pH. Uma vez que o desenvolvimento, ou o metabolismo, do microorganismo gera ácidos, estes modificam a coloração do indicador do pH. Verifica-se que uma tal solução é muito pouco sensível, e não tem, em qualquer caso, um carácter universal.

Um quinto processo consiste em fazer contactar uma amostra a controlar e um indicador cromogénico de oxirredução, tal como um sal de tetrazólio. Os mecanismos bioquímicos de cadeia respiratória dos microorganismos presentes, produzem substâncias redutoras, tais como o NADH (nicotinamida-adenina-dinucleótido hidrogenado); esta substância redutora conduz à redução do indicador, e portanto à modificação da sua cor. Um tal processo é muito pouco sensível e os sais de tetrazólio devem, em particular, ser utilizados em grandes quantidades. Notar-se-á assim que estes últimos são tóxicos e precipitam facilmente.

Um sexto processo consiste em utilizar substratos enzimáticos de síntese, cromogénicos ou fluorogénicos. A presença de certas enzimas ligadas ao desenvolvimento dos microorganismos conduz ao corte do substrato enzimático em dois, e na libertação da parte cromogénica ou fluorogénica, a qual pode então ser detectada.

Um tal processo não apresenta carácter universal, no sentido de que o substrato enzimático deve ser, de cada vez, adaptado ao tipo de microorganismo procurado; em particular não existe uma só e mesma enzima comum a todos os microorganismos. Por outro lado, para os meios biológicos complexos, tais como o sangue ou a urina, já contendo enzimas, este processo não permite distinguir as específicas dos microorganismos, por exemplo das bactérias ou micróbios, daquelas cuja presença é procurada.

Um sétimo processo consiste em detectar os microorganismos por intermédio do metabolito ATP (adenosina-trifosfato) em presença de um substrato luciferino e por oxidação deste último em



presença de luciferase, o que conduz à bioluminescência do substrato precipitado. Um tal processo apresenta, essencialmente, os mesmos inconvenientes do que os enunciados para o processo precedente.

Um oitavo processo é executado colocando o gás carbónico produzido pelos microorganismos em presença de uma ou várias fontes de carbono, num meio reaccional; uma tal técnica é utilizada, por exemplo, em hemoculturas para eliminar uma presença microbiana. A detecção do gás carbónico pode ser feita por radiometria, caso em que se deve utilizar uma fonte de carbono marcada com C^{14} , ou por espectrofotometria de infravermelhos. Também se pode medir a produção de gás carbónico, por controlo do aumento da pressão num sistema fechado, com o auxílio de um manómetro ou de um captor de pressão apropriado. Um tal processo é muito pouco sensível e, no caso de um marcador radioactivo, põe vários problemas de segurança e de autorização administrativa prévio do laboratório de medida.

Um último processo consiste em detectar os microorganismos por intermédio da evolução dos parâmetros eléctricos do meio reaccional, no qual os microorganismos se desenvolvem; estes parâmetros são, nomeadamente, a impedância, a condutância ou a capacitância. Com base neste processo, desenvolveram-se e colocaram-se no mercado vários biocaptadores, nomeadamente no campo agro-alimentar. Uma tal técnica é muito pouco sensível, em particular tendo em mente as exigências de diagnóstico com fins médicos. Os materiais actualmente disponíveis para esta solução são muito pouco satisfatórios.

No final desta análise das soluções anteriores em matéria de detecção de microorganismos, observar-se-á de passagem que alguns destes processos começam pela amostragem, isto é pela obtenção de uma amostra a partir de um meio ou substrato a controlar, a cultura desta amostra e, eventualmente, o levantamento do meio de cultura a intervalos regulares. Tais operações, geralmente manuais, parecem dificilmente automatizáveis.

O presente invento tem por objecto um reagente para a detecção de microorganismos com um marcador luminescente, que obvia

-6-

a maior parte dos inconvenientes precedentemente observados. Mais precisamente, o presente invento tem por objecto um reagente e um processo de detecção correspondente, que permite simultaneamente:

- uma detecção dos microorganismos, directamente no meio ou amostra a controlar,

- uma automatização acessível, tendo em conta a simplicidade do processo de análise em questão.

- um carácter universal, isto é substancialmente independente do meio no qual se procuram os microorganismos e da natureza ou espécie destes últimos,

- uma boa sensibilidade, em particular uma detecção a concentrações relativamente baixas.

Graças à verificação experimental exposta a seguir, encontrou-se um reagente que responde ao conjunto de exigências precedente.

Este procedimento experimental foi o seguinte:

sob a acção da β -glucoronidase de Escherichia coli, cultivada num caldo apropriado, é possível cortar o substrato 4-metilumbelilferil- β D-glucurónido, libertar, assim, a 4-metilumbelilferona fluorescente e, assim, detectar a bactéria precitada.

1ª experiência

Ao substituir o substrato 4-metilumbelilferil- β D-glucurónido pelo substrato resorufina- β D-glucurónido, para a pesquisa da β -glucuronidase de E. coli, no mesmo caldo, constatou-se que ainda que o novo substrato seja hidrolisado no decurso do crescimento bacteriano, na ampola, a fluorescência rosa da resorufina não se exprime; obtém-se, no máximo, uma superfície rosa na interface caldo/atmosfera gasosa, uma vez que a resorufina é solúvel em meio aquoso.

2ª experiência

Introduz-se, em ampolas esterilizadas, contendo o mesmo caldo que anteriormente, resorufina livre à concentração de 20 micromoles/litro. As ampolas são, em seguida, semeadas com diferentes estirpes bacterianas de enterobactérias, à razão de 10^6 bactérias/ml.



No início, o caldo é rosa em todas as ampolas (fluorescência de resorufina).

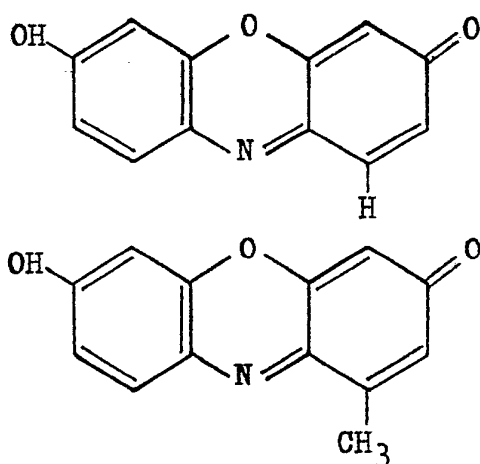
Depois de 4 horas de incubação a 37°C, o meio das ampolas que apresentam crescimento está descorado (por vezes com uma superfície rosa à superfície), enquanto que o testemunho sem bactérias continua rosa.

CONCLUSÃO DESTAS DUAS EXPERIÊNCIAS

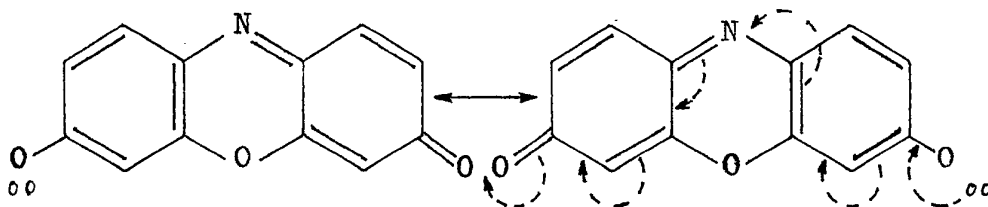
- O crescimento bacteriano em caldo, em presença de resorufina provoca o desaparecimento da fluorescência deste marcador.

- Ainda que a natureza da reacção em questão não possa ser identificada com certeza, a resorufina mostra ser um excelente indicador do crescimento bacteriano.

A partir desta verificação, o presente invento propõe, em primeiro lugar, um reagente para a detecção de microorganismos, compreendendo um meio reaccional em fase aquosa, contendo pelo menos uma fonte de carbono e uma fonte de azoto, assim como um marcador fluorescente, constituído pela resorufina ou pela orci-rufina, ou por quaisquer formas aniónicas destes compostos químicos. Estes dois produtos têm as fórmulas respectivas, apresentadas seguidamente:

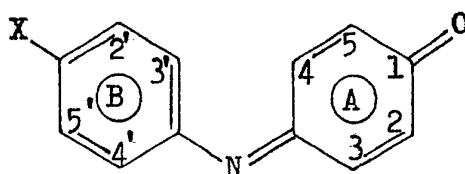


Como a fluorescência dos marcadores precitados tem por origem uma deslocalização electrónica importante entre as posições 3 e 7, produz um híbrido de ressonância com a fórmula seguinte:



O presente invento refere-se, a título de marcador, pelas estruturas quimicamente próximas, com as duas fórmulas seguintes, e que apresentavam igualmente propriedades de fluorescência, utilizáveis na detecção de microorganismos, no quadro de um reagente de acordo com o invento.

Trata-se em primeiro lugar de compostos químicos com a fórmula seguinte, sob a forma neutra ou aniónica:



na qual:

- as posições (2'), (4') e (5') estão, cada uma, ocupadas por um átomo de hidrogénio ou por um substituinte escolhido no grupo que compreende o flúor, o cloro, o bromo, os substituintes alquilo, alcoxi, carboxilato, carboxílico, amida, ciano

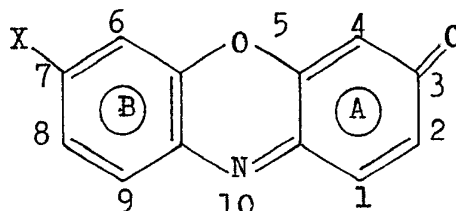
- um grupo oxi entre as posições (3') e (4)

- as posições (2), (3) e (5) são ocupadas, cada uma, por um átomo de hidrogénio ou por um substituinte escolhido no grupo compreendendo o flúor, o cloro, o bromo, os substituintes alquilo, alcoxi, carboxilato, carboxílico, amida e ciano, ou as posições (2) e (3) pertencem, em comum, ao núcleo (A) e a um núcleo insaturado

- X é uma função amino ou hidroxilo



Em seguida, refere-se aos compostos químicos, sob a forma neutra ou aniônica, que têm a fórmula seguinte:



na qual as posições (6,8,9) são ocupadas, cada uma, por um átomo de hidrogénio ou por um substituinte escolhido no grupo compreendendo o flúor, o cloro, o bromo, os substituintes alquilo, alcoxi, carboxílico, amida e ciano

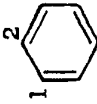
- na qual as posições (1) e (4) são ocupadas, cada uma, por um átomo ou substituintes escolhido no grupo compreendendo o hidrogénio, o flúor, o cloro, o bromo, os substituintes alquilo, alcoxi, carboxilato, carboxílico, amida e ciano; ou as posições (1) e (2) pertencem, em comum, ao núcleo (A) e a um núcleo insaturado

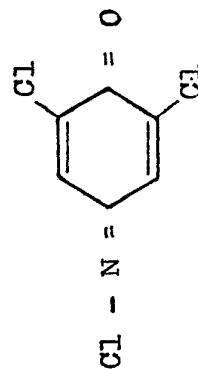
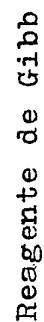
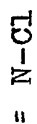
- X é uma função hidroxilo ou amina.

Os compostos com esta última fórmula geral, assim como o seu processo de obtenção, estão precisados no quadro que se segue.

(SEGUEM QUADROS 8, 8bis e 9)

substituinte nome do composto	X	1	2	4	6	8	9	OBTENÇÃO
Resorufina	OH	H	H	H	H	H	H	Condensação de quinona-monocloro-imina(2) com resorcinol; ou redução ao ar de rezazurina (3); ou aquecimento de resorcinol, nitrobenzeno e ácido sulfúrico, neutralização, depois extração com etanol
Orcirufina	OH	CH ₃	H	H	H	H	H	Condensação de quinona-monocloro-imina(2) com orcinol
Resorufamina	NH ₂	H	H	H	H	H	H	Condensação de N,N'-dicloroquinona-di-imina(1) e resorcinol
Orcirufamina	NH ₂	CH ₃	H	H	H	H	H	Condensação de N,N'-dicloroquinona-di-imina(1) e orcinol
Metilorcirufina	OH	CH ₃	H	H	H	H	CH ₃	Reacção em solução de éter de orcinol com o ácido nítrico para obter dimetil-resazurina; redução, depois oxidação ao ar da dimetil-resazurina
Pentilresorufina	OH	C ₅ H ₁₁	H	H	H	H	H	idem, metilorcirufina, a partir de olivetol (5-pentilresorcinol)
2-Cloro-resorufina	OH	H	Cl	H	H	H	H	idem, metilorcirufina, mas a partir do 4-cloro-resorcinol
6,8-Dicloro-1-metilresorufina	OH	CH ₃	H	H	Cl	Cl	H	Condensação do reagente (4) de Gibbs com orcinol

substituente nome do composto	X	1	2	4	6	8	9	OBTENÇÃO
6,8-Dibromo-1-metil- resorufina	OH	CH ₃	H	H	Br	Br	H	Condensação do reagente (4) com orcinol
3-Metoxi-resorufina	OH	OCH ₃	H	H	H	H	H	idem metilorci-rufina, mas a partir do 5-metoxi-resorcinol
2-Carboxil-resorufina	OH	H	CO ₂ H	H	H	H	H	Condensação da quinona-monocloro-imina(2) com ácido β-re-sorcinico (ácido 2,4-di-hidroxibenzoico)
Nafto-resorufina	OH			H	H	H	H	Condensação de N-monocloroquinona-mono-imina
4-Metil-resorufina	OH	H	H	CH ₃	H	H	H	Condensação
2,4,6,8-tetrabromo-re-sorufina	OH	H	Br	Br	Br	Br	H	Halogenação directa da resorufina (ou orci-rufina)
2,4,6,8-tetracloro-resorufina	OH	H	Cl	Cl	Cl	Cl	H	Halogenação directa da resorufina (ou orci-rufina)



-13-

De acordo com o presente invento as condições que se utilizam são as seguintes:

- o pH do meio reaccional está compreendido entre 6,0 e 8,0
- o indicador ou marcador está contido no meio reaccional a razão de 0,01 mg/l a 100 mg/l e, de preferência, de 1 a 10 mg/l
- a fonte de azoto do meio reaccional pode ser de qualquer natureza, por exemplo peptona ou sulfato de amónio
- a fonte de carbono pode ser de qualquer tipo, tal como a glucose, lactose ou outras.

No que se refere ao meio reaccional, contendo as fontes de azoto e de carbono necessárias aos reagentes, podem convir a maior parte dos caldos comercializados, por exemplo tripticase-soja, coração-cérebro, etc...

Um processo de detecção de acordo com o invento consiste nas seguintes etapas:

1) O reagente, compreendendo, como precedentemente, o meio reaccional e o marcador de acordo com o invento, é preparado, dividido em frascos ou ampolas, ou quaisquer outras formas de adição, e esterilizado por filtração ou em autoclave.

2) O reagente é misturado com a amostra, meio ou substrato a controlar.

3) A mistura obtida é incubada a uma temperatura entre 20° e 65°, durante um período compreendido entre 1 minuto e 7 dias, por exemplo.

4) A fluorescência do marcador é medida em intervalos regulares, com a ajuda de um fluorímetro, ou simplesmente avaliada a olho nú.

A diminuição da fluorescência, e mesmo a sua extinção total, traduz a presença de microorganismos na amostra ou substrato controlado.

O presente invento é agora descrito e pormenorizado, quanto às experiências efectuadas, em relação à resorufina. Este marcador tem, entre outras, as vantagens suplementares e importantes, seguintes:



- este produto não é tóxico
- apresenta uma grande sensibilidade, permitindo o seu emprego a concentrações muito pequenas, da ordem de 1 a 2 mg/l
- e, sobretudo, tratando-se da fluorescência, os comprimentos de onda máximos de excitação e de emissão, situam-se, respectivamente, a 572 nm e 585 nm; estes comprimentos de onda situam-se para além das radiações absorvidas pela maior parte dos meios ou amostras analisados, permanecendo, contudo, no domínio do visível, o que permite observar separadamente a fluorescência específica da resorufina, sem interferência ou perturbação do meio ambiente.

Exemplo 1 - Preparação do reagente

O meio reaccional é preparado misturando os ingredientes seguintes:

- | | |
|---|---------|
| - caldo Mueller Hinton desidratado (Difco, ref 0757-01) | 21 g |
| - glucose (Merck, ref 8337) | 5 g |
| - resorufina (Aldrich, ref 23015-4) | 2 mg |
| - água destilada | 1000 ml |
| - pH | 7,3 |

Este meio é dividido em tubos de vidro com rolhas roscadas, à razão de 6 mililitros por tubo e levados a autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Os tubos esterilizados são conservados na obscuridade, uma vez que a resorufina é sensível à luz.

O meio será utilizado nos exemplos de aplicação 2 a 4, segundo o processo geral seguinte: depois de ter junto o ou os diferentes elementos, específicos da aplicação considerada, os tubos rolhados são agitados numa estufa com um agitador Vibratest regulado para 100 rotações/minuto. A medição da fluorescência efectua-se com a ajuda de um fluorímetro LKB tipo LS-5B. Os tubos são directamente introduzidos no porta-tubos. O comprimento de onda de excitação é regulado para 572 nm e o da emissão para 585 nm. É de notar que no exemplo 4 a glucose presente no meio reac-

cional pode ser substituída por outros açúcares.

Exemplo 2: Aplicação em hemocultura

A 7 tubos de vidro, contendo o reagente preparado de acordo com o exemplo 1, junta-se sangue humano fresco, esterilizado, à razão de 1 mililitro por tubo.

O primeiro tubo é utilizado como testemunho e os outros 6 são semeados com uma das 6 estirpes microbianas seguintes:

- Ec = Escherichia coli
- Cf = Citrobacter freundii
- Pa = Pseudomonas aeruginosa
- Sa = Staphylococcus aureus
- Ef = Enterococcus faecalis
- Ca = Candida albicans

A quantidade de microorganismos introduzida no início, em cada tubo, é de 100 células viáveis por mililitro de meio. Este inóculo é controlado por contagem das colónias formadas à superfície de uma gelose com sangue, após 24 horas de incubação.

A medição da fluorescência é efectuada após 12h, 24h, 36h e 48h de incubação a 35°C. A intensidade da fluorescência é mostrada no quadro que se segue. A extinção total ou parcial da fluorescência testemunha a presença de células microbianas nas amostras de partida.

Incubação \ Estirpe	testemunho negativo	Ec	Cf	Ps	Sa	Ef	Ca
12 H	463	11	454	465	447	459	461
24 H	465	9	10	464	460	126	460
36 H	458	8	10	58	27	13	461
48 H	464	9	9	17	13	18	19

Nesta aplicação prefere-se utilizar um caldo específico para hemocultura, em lugar do caldo de Mueller-Hinton.

Exemplo 3: Aplicação no antibiograma

Introduzem-se 6 antibióticos diferentes em tubos preparados como indicado no exemplo 1. Cada antibiótico é utilizado a 2 concentrações "c" e "C", indicadas no quadro seguinte. Os tubos sem antibiótico são utilizados como testemunhos.

Cada par de tubos, correspondentes a um antibiótico nas duas concentrações "c" e "C", é semeado com uma das 3 estirpes seguintes, à razão de 10 células viáveis por mililitro:

- | | |
|--------------------------------------|------------|
| - Ec = <u>Escherichia coli</u> | ATCC 25922 |
| - Pa = <u>Pseudomonas aeruginosa</u> | ATCC 27853 |
| - Sa = <u>Staphylococcus aureus</u> | ATCC 25923 |

A medição da fluorescência é efectuada após 18 horas de incubação a 35°C. A intensidade da fluorescência é mostrada no quadro que se segue

Os resultados são simbolizados de acordo com:

- S = estirpe sensível = fluorescência máxima
- R = estirpe resistente = extinção total da fluorescência
- I = estirpe intermédia = extinção parcial da fluorescência

O antibiograma é controlado pela técnica da diluição em gelose.

(SEGUE QUADRO)



Antibiótico	Concentração em $\mu\text{g/ml}$	Ec	Pa	Sa
Testemunho	c = 0 C = 0	8 7	10 11	9 11
Penicilina	c = 0,25 C = 16	9 8 R	10 9 R	455 457 S
Piperacilina	c = 32 C = 128	460 465 S	463 450 S	459 468 S
Cefoxitina	c = 8 C = 32	439 463 S	15 9 R	448 457 S
Renamicina	c = 2 C = 16	15 458 I	13 10 R	438 447 S
Tetraciclina	c = 1 C = 4	451 465 S	15 19 R	443 459 S
Eritromicina	c = 1 C = 4	8 10 R	11 13 R	445 460 S

O antibiograma de acordo com o invento pode ser realizado em alvéolos miniatura (placa de microtitulação).

Exemplo 4: Aplicação em identificação

Apresenta-se neste exemplo a utilização de 7 açúcares diferentes para 8 estirpes microbianas, com fins de identificação:

Os 7 açúcares testados são:

- Glucose (GLU)
- Maltose (MAL)
- Sacarose (SAC)



- Lactose (LAC)
- Celobiose (CEL)
- Tre-halose (TRE)
- Melibiose (MEL)

Os testes são praticados no reagente, em tubos de vidro, preparado como indicado no exemplo 1. A glucose contida neste meio é substituída, se for caso disso, pelo açúcar correspondente, com a mesma concentração de 5 g/l.

A bateria de tubos é semeada com as 8 estirpes seguintes:

- Ca = Candida albicans
- Ct = Candida tropicalis
- Tg = Torulopsis glabrata
- Ec = Escherichia coli
- Kp = Klebsiella pneumoniae
- Pv = Proteus vulgaris
- Ah = Aeromonas hydrophila
- Va = Vibrio alginolyticus

Para cada estirpe, realiza-se uma suspensão em soro fisiológico, ajustada ao ponto 2 da escala de McFarland. Introduzem-se 200 microlitros desta suspensão nos 7 tubos contendo, cada um, os açúcares.

A medição da fluorescência é efectuada após 18 horas de incubação a 35°C. A intensidade da fluorescência é mostrada no quadro que se segue. Os resultados são simbolizados por:

- reacção negativa... (-) = fluorescência máxima
- reacção positiva... (+) = extinção da fluorescência

Os resultados obtidos são controlados com a ajuda de micro-métodos, comercializados com os testes comercializados com a marca API, pela sociedade BIO MERIEUX, sob os nomes: API 20 E, API 20 C, API 50 CH.

(SEGUE QUADRO)



Lstirpe \ Açúcar	GLU	MAL	SAC	LAC	CEL	TRE	MEL
Ca	31 +	25 +	37 +	466 -	453 -	19 +	439 -
Ct	12 +	17 +	21 +	441 -	16 +	20 +	452 -
Tg	12 +	456 -	447 -	452 -	449 -	16 +	465 -
Ec	9 +	13 +	459 -	10 +	454 -	10 +	11 +
Kp	10 +	9 +	9 +	11 +	8 +	10 +	8 +
Pv	9 +	469 +	10 +	458 -	461 -	437 -	456 -
Ah	10 +	14 -	11 +	451 -	467 -	12 +	444 -
Va	11 +	10 +	8 +	469 -	451 -	10 +	449 -

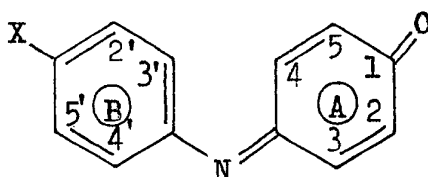
A utilização de fontes de carbono para fins de identificação, de acordo com o invento, pode ser feita em alvéolos miniatura (placas de microtitulação, por exemplo).

Em consequência, os reagentes de acordo com o invento podem ser utilizados na detecção de microorganismos em qualquer tipo de amostra biológica, tal como fluidos corporais (sangue, urina, líquido céfalo-raquidiano, etc.), produtos alimentares, água, produtos farmacêuticos, cosméticos, etc.

De modo similar ao antibiograma do exemplo 3, o invento pode ser utilizado para efectuar um anti-fungigrama, caso em que se utiliza uma pluralidade de reagentes de acordo com o invento, diferindo uns dos outros apenas pela adição de antifúngicos correspondentemente diferentes.

REIVINDICAÇÕES

1 - Processo de preparação de um reagente para a detecção de microorganismos, caracterizado por compreender a associação de um meio reaccional em fase aquosa e um marcador cuja emissão luminosa é modificável em consequência do desenvolvimento do microorganismo introduzido no meio reaccional, sendo o marcador um composto químico com a fórmula seguinte, ou uma sua forma aniónica:



na qual:

- as posições (2'), (4') e (5') são ocupadas, cada uma, por um átomo de hidrogénio ou um substituinte escolhido do grupo que compreende o flúor, o cloro, o bromo, os substituintes alquilo, alcoxi, carboxilato, carboxílico, amida, ciano,

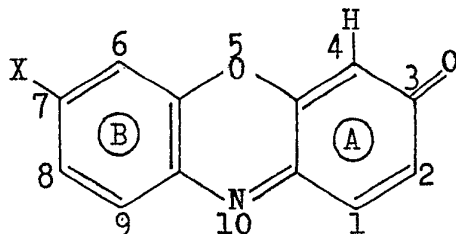
- um grupo 'oxi' liga, entre si, as posições (3') e (4)

- as posições (2), (3) e (5) são ocupadas, cada uma, por um átomo de hidrogénio ou um substituinte escolhido entre o grupo que compreende o flúor, o cloro, o bromo, os substituintes alquilo, alcoxi, carboxilato, carboxílico, amida ou ciano, ou as posições (2) ou (3) pertencem em conjunto ao núcleo (A) e a um núcleo insaturado,

- X é uma função amina ou hidroxilo.

2 - Processo de preparação de um reagente para a detecção de microorganismos, caracterizado por compreender a associação de um meio reaccional em fase aquosa e um marcador cuja emissão luminosa é modificada em consequência do desenvolvimento do microorganismo introduzido no meio reaccional, sendo o marcador um composto químico com a fórmula seguinte, ou uma sua forma aniónica:

(SEGUE FÓRMULA)



- na qual as posições (6, 8, 9) são ocupadas, cada uma, por um átomo de hidrogénio ou um substituinte escolhido do grupo que compreende o flúor, o cloro, o bromo, os substituintes alquilo, alcoxi, carboxílico, amida, ciano,

- na qual as posições (1) e (4) são ocupadas, cada uma, por um átomo ou um substituinte escolhido entre o grupo que compreende o hidrogénio, o flúor, o cloro, o bromo, os substituintes alquilo, alcoxi, carboxilato, carboxílico, amida ou ciano; ou as posições (1) e (2) pertencem em conjunto ao núcleo (A) e a um núcleo insaturado,

- X é uma função amina ou hidroxilo.

3 - Processo de preparação de um reagente para a detecção de microorganismos, caracterizado por compreender a associação de um meio reaccional em fase aquosa e de um marcador cuja emissão luminosa é modificável pelo desenvolvimento do microorganismo introduzido no meio reaccional, sendo o marcador a resorufina, a orcifurina, ou a forma aniónica destes compostos químicos.

4 - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado por o meio reaccional conter, igualmente, uma fonte de carbono.

5 - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado por o pH do meio reaccional estar compreendido entre 6,0 e 8,0.

6 - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado por o indicador estar contido no meio reaccio-

-22-

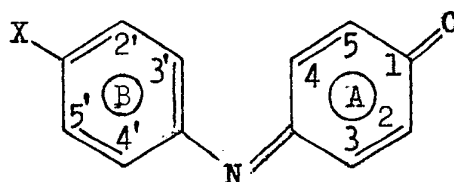
nal à razão de 0,01 mg/l a 100 mg/l e, de preferência, de 1 a 10 mg/l.

7 - Processo de produção de um conjunto para a identificação de um microorganismo, caracterizado por se associar uma pluralidade de reagentes, preparados de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, os quais diferem uns dos outros unicamente por as fontes de carbono respectivas serem diferentes.

8 - Processo de produção de um conjunto para a obtenção de um antibiograma, caracterizado por se associar uma pluralidade de reagentes, preparados de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, os quais diferem uns dos outros unicamente por se adicionarem antibióticos respectivamente diferentes.

9 - Processo de produção de um conjunto para a obtenção de um antibiograma, caracterizado por se associar uma pluralidade de reagentes, preparados de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, os quais diferem uns dos outros unicamente por se adicionarem antifúngicos respectivamente diferentes.

10 - Processo para a detecção de microorganismos que consiste em colocar um microorganismo perante um meio reaccional em fase aquosa contendo pelo menos uma fonte de carbono e um marcador do dito microorganismo, incubar o meio reaccional com o dito microorganismo, de modo a modificar uma emissão luminosa do dito marcador e observar a dita característica luminosa durante ou após a incubação, caracterizado por o marcador ser um composto químico com a fórmula seguinte ou a sua forma aniónica:



na qual:

- as posições (2'), (4') e (5') são ocupadas, cada uma, por um átomo de hidrogénio ou um substituinte escolhido do grupo que compreende o flúor, o cloro, o bromo, os substituintes alquilo,

alcoxi, carboxilato, carboxílico, amida, ciano,

- um grupo oxi liga, entre si, as posições (3') e (4)
- as posições (2), (3) e (5) são ocupadas, cada uma, por um átomo de hidrogénio ou um substituinte escolhido entre o grupo que compreende o flúor, o cloro, o bromo, os substituintes alquilo, alcoxi, carboxilato, carboxílico, amida ou ciano, ou as posições (2) ou (3) pertencem em conjunto ao núcleo (A) e a um núcleo insaturado,
- X é uma função amina ou hidroxilo.

11 - Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por a incubação se realizar durante um período compreendido entre 1 minuto e 7 dias, a uma temperatura de 20°C a 65°C.

12 - Processo de acordo com a reivindicação 10 e segundo o qual se põe o meio reaccional em contacto com uma amostra susceptível de conter o microorganismo a detectar, caracterizado por a amostra ser retirada de um dos seguintes fluidos corporais: sangue, urina ou fluido cefalo-raquidiano.

13 - Processo de acordo com a reivindicação 10 e segundo o qual se põe o meio reaccional em contacto com uma amostra susceptível de conter o microorganismo a detectar, caracterizado por a amostra ser retirada de um dos produtos seguintes: produtos alimentares, água, produtos farmacêuticos e cosméticos.

Lisboa,

. 19. JUL 1990 .

Por BIO MERIEUX S.A.

- O AGENTE OFICIAL -

