

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



PATENTE DE INVENCION

P.- 64.508
Case 2-Spain

ES	11	NUMERO	A1
	21	453.758	
	22	FECHA DE PRESENTACION	
		29-11-1976	

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
643.465	22-12-75	EE.UU.

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07C/C12K	

54 TITULO DE LA INVENCION

"UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UNA SOLUCION ESTABLE DE REACTIVO DE OXIDASA PARA LA DETERMINACION DE COLONIAS MICROBIANAS"

71 SOLICITANTE (S)

SMITHKLINE CORPORATION

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

1500 Spring Garden Street, Filadelfia, Pensilvania 19101, Estados Unidos de America

72 INVENTOR (ES)

Betty Anne Bowie y Joseph Frank Pagano

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ

Esta invención se refiere a composiciones de reactivo de oxidasa anhidras, novedosas, particularmente útiles en la confirmación de colonias de *Neisseria* que producen la enzima citocromo-oxidasa.

5 Es bien conocido el empleo de una composición de reactivo de oxidasa para confirmar la presencia de colonias de *Neisseria*, tales como *Neisseria gonorrhoeae* o *Neisseria meningitidis*. El Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos ha establecido criterios para identificación de presunción y confirmatoria de *N. gonorrhoeae*. Para la 10 diagnóstico de presunción, el organismo cultivado sobre un medio selectivo para *N. gonorrhoeae* debe identificarse como diplococos positivos a la oxidasa, Gram negativos, que exhiben morfología de colonia típica. Para confirmación ulterior de la diagnosis, deben también realizarse fermentaciones de azúcar y/o pruebas de anticuerpo fluorescentes. 15

De conformidad con los procedimientos normales de laboratorio para probar *N. gonorrhoeae*, se obtienen muestras con un isopo estéril. Los lados y la punta del isopo se hacen rodar después sobre un medio selectivo. Un medio de 20 cultivo sólido, típico, para usarse en el cultivo de *N. gonorrhoeae* es descrito por Martín J. E., Jr. y Lester A. en HSMHS Health Reports 86: 30-33, 1971. El medio se incuba después durante 24-48 horas y se inspecciona para el crecimiento de colonias. Las colonias de *N. gonorrhoeae* que se sospecha que existen se someten a una prueba de oxidasa para determinar si se produce la enzima citocromo-oxidasa. 25 Una reacción de prueba positiva a la oxidasa se reconoce por el desarrollo de un color púrpura oscuro en 5 a 30 segundos. Si el examen cuidadoso del medio no revela ningún cre 30

cimiento, se aplica el reactivo de oxidasa al medio completo. Esto ayuda a la visualización de las colonias de punta de alfiler positivas a la oxidasa que podrían de otro modo ser pasadas por alto. El crecimiento de las colonias positivas a la oxidasa provee una evidencia preliminar segura de N. gonorrhoeae. Para identificación positiva, las colonias no tratadas sobre el medio o un segundo cultivo no tratado, se someten a procedimientos de confirmación en el laboratorio, adicionales, es decir, fermentación de azúcar y prueba fluorescente de anticuerpos.

El reactivo de oxidasa de la técnica anterior y comercial utilizado para confirmar la presencia de colonias de Neisseria, consiste de una solución acuosa al 1% de diclorhidrato de N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina. La solución es muy inestable. Tiene un color azul claro cuando se prepara recientemente y pasa a un color negro dentro de 2 o 3 días y no es ya efectiva para la determinación de la oxidasa debido al deterioro rápido de la sal de diamina. Por esta razón, se recomienda que se prepare diariamente la solución de reactivo comercial.

Debido a la naturaleza inestable del reactivo de oxidasa de la técnica anterior, se recomienda también que se mantenga bajo una atmósfera de nitrógeno y en un frasco de vidrio herméticamente sellado si no va a ser usada rápidamente. Además, el color azul natural del reactivo que se profundiza por reposo, produce confusión con el color púrpura profundo obtenido cuando el reactivo se aplica a los organismos de Neisseria y confunde al laboratorista.

Es por lo tanto el objeto de la presente invención preparar una solución estable, incolora, de reactivo de oxidasa.

dasa para la detección de colonias microbianas, que tenga una duración de almacenamiento relativamente larga.

5 La composición novedosa de reactivo de oxidasa de esta invención resuelve inesperadamente los problemas de estabilidad asociados con el reactivo de oxidasa de la técnica anterior.

10 La composición de reactivo de oxidasa de esta invención es incolora y estable. Por ejemplo, la composición de reactivo de esta invención permanece incolora hasta 8 semanas y retiene actividad excelente. La solución puede colocarse en botellas de gotero y se elimina la necesidad de empacarlas bajo atmósfera de nitrógeno.

15 Además, la composición anhidra, estable de reactivo de oxidasa de esta invención provee también un contraste mucho mejor entre las colonias y el medio. El empleo de una solución incolora como material de partida simplifica grandemente la visualización y la interpretación de las colonias que se vuelven de un color púrpura oscuro en presencia de la solución de reactivo.

20 La composición anhidra, estable de reactivo de oxidasa de esta invención está constituida de tetrametil o dimetil-p-fenilendiamina y sulfóxido de dimetilo. La fenilendiamina estará en una cantidad de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 1% en peso de la composición. Preferiblemente, la fenilendiamina estará presente en una cantidad de aproximadamente 0,2% a aproximadamente 0,5%. Muy ventajosamente, la composición de reactivo estable de esta invención contendrá N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina.

30 Esta invención incluye también sales de adición farmacéuticamente aceptables, no tóxicas, de las bases ante

riormente definidas, con ácidos orgánicos e inorgánicos. Tales sales se preparan fácilmente por métodos conocidos en la técnica. La base se hace reaccionar ya sea con la cantidad estequiométrica del ácido orgánico o inorgánico en un solvente miscible, acuoso, tal como acetona o etanol, con aislamiento de la sal por concentración y enfriamiento, o un exceso del ácido en un solvente no miscible, acuoso, tal como éter etílico o cloroformo, con la sal deseada separándose directamente. Son ilustraciones de tales sales orgánicas, aquellas con ácidos maléico, fumárico, benzóico, succínico, acético, propiónico, tartárico, salicílico, cítrico, esteárico y palmítico. Son ilustraciones de tales sales inorgánicas, aquellas con ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico y nítrico. Estas sales pueden también prepararse mediante el método clásico de doble composición de las sales apropiadas que es bien conocido en la técnica.

Los siguientes ejemplos ilustran específicamente la composición colorante de esta invención y harán obvia para todo experto en la técnica, la práctica completa del método de la invención.

EJEMPLO 1

Ingredientes

Cantidades

N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina	0,300 g
Sulfóxido de dimetilo, c.s.	100,000 ml

La base libre se disuelve en el sulfóxido de dimetilo para producir una solución clara, incolora.

EJEMPLO 2

	<u>Ingredientes</u>	<u>Cantidades</u>
5	Diclorhidrato de N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina	0,500 g
	Sulfóxido de dimetilo, c.s.	100,000 ml

10 La sal diclorhidrato se disuelve en el sulfóxido de dimetilo para producir una solución incolora, clara.

EJEMPLO 3

	<u>Ingredientes</u>	<u>Cantidades</u>
15	N,N--dimetil-p-fenilendiamina	1,0 g
	Sulfóxido de dimetilo, c.s.	100,0 ml

20 La base se disuelve en el sulfóxido de dimetilo.

REIVINDICACIONES

25

30 Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen

en las reivindicaciones siguientes:

5 1ª.- Un procedimiento para preparar una solución estable de reactivo de oxidasa para la determinación de colonias microbianas, que comprende disolver N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina o N,N-dimetil-p-fenilendiamina o sus sales ácidas de adición en sulfóxido de dimetilo en el que la concentración de fenilendiamina es de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 1,0%.

10 2ª.- El procedimiento de la reivindicación 1ª, caracterizado porque la diamina es N,N,N'-N'-tetrametil-p-fenilendiamina.

3ª.- El procedimiento de la reivindicación 2ª, caracterizado porque la diamina está presente en una cantidad de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 0,5%.

15 4ª.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 2ª, caracterizado porque la diamina está presente como la sal diclorhidrato.

20 5ª.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 1ª, caracterizado porque la diamina es N,N-dimetil-p-fenilendiamina.

6ª.- "UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UNA SOLUCION ESTABLE DE REACTIVO DE OXIDASA PARA LA DETERMINACION DE COLONIAS MICROBIANAS".

25 Tal y como se ha descrito en la memoria que antecede, y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de ocho hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 09.DIC.1976

5

P.A.

Alberto de Elzaburu
Por Poder.



10

15

20

25

30

MPB.-