

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 372**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2010** **E 10750325 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013** **EP 2407549**

54 Título: **Detección de Trichomonas y Candida**

30 Prioridad:

10.03.2009 CN 200920088878 U

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.12.2013

73 Titular/es:

AUTOBIO DIAGNOSTICS CO., LTD. (100.0%)
No.87 Jingbei Yi Rd. National Eco&Tec
Developing Area Zhengzhou
Henan 450016, CN

72 Inventor/es:

WANG, ZEYU;
YANG, HONGYUN;
FU, GUANGYU;
WU, XUEWEI;
FENG, CHAOJIE;
YANG, YANG;
YANG, JINGJING;
XIE, YUANYUAN;
ZHENG, YEHUDAN;
LI, GUILIN y
YANG, FAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 436 372 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

Detección de *Trichomonas* y *Candida*

Campo técnico

5 La invención se refiere a un procedimiento para distinguir en una muestra una infección con *Trichomonas* de infección con *Candida*, que comprende la detección de N-acetil-β-D-hexosaminidasa y la determinación de pH en la muestra.

Técnica anterior

10 Se sabe que tres *Trichomonas* son parásitos humanos: *T. vaginalis*, encontrada en vagina, uretra y próstata y que causan vaginitis de *Trichomonas*; *T. hominis*, encontrada en el tracto intestinal y que causan trichomoniasis intestinal, y *T. tenax*, encontrada en la cavidad oral, odontoincrustantes y madrigueras de sapo, y que causan trichomoniasis oral.

15 Frecuentemente se usan los procedimientos siguientes para la detección de *Trichomonas*: Procedimiento de Caída en Pendiente, en el que se observa la motilidad de los Trichosomas, aunque los resultados varían con la temperatura; Procedimiento de Tinción con Frote, en el que muestras tratadas y no tratadas se someten a frote, se tiñen y observan al microscopio, pudiendo tener influencia sobre la observación las partículas con tamaños comparables a las de los Trichosomas y el intervalo del campo visual; el Procedimiento de Cultivo, en el que los Trichosomas de la muestra se multiplican selectivamente, se frotan y tiñen, que es intensivo en tiempo; el Procedimiento Inmunológico, usando anticuerpos específicos para detectar antígenos de *Trichomonas* tal como el ensayo fluorescente de anticuerpos, ELISA, aglutinación de látex, si bien hasta el momento no se comercializa kit alguno inmunológico de alta calidad para la detección clínica de Trichosomas.

20 La mayor parte de *Candida* encontrada en el cuerpo humano, como puede ser en la cavidad oral y el tracto urogenital, son patógenos oportunistas. Se sabe que más del 85% de los patógenos *Candida* oportunistas son *C. albicans* y *C. tropicalis*, que pueden causar enfermedades en el tracto urogenital en seres humanos.

25 Para la detección de *Candida* se usan frecuentemente los procedimientos siguientes: Microscopía Directa con Frote, en el que, para mujeres, se extrae de la vagina una muestra de frotis, secreción vaginal o película blanca lechosa de la pared vaginal, mientras que, para hombres, se recogen escamas de las lesiones de piel del pene del glande, sulcus coronario o prepucio. Se frotan las muestras y se detectan por microscopía en cuanto a esporas ovoides o micelio. Este procedimiento se basa mucho en la experiencia. Los resultados varían dentro de diferentes campos visuales y pueden interferir partículas, especialmente gotas de aceite de parafina añadido para lubricación de las muestras; el Procedimiento de Cultivo Fúngico, un procedimiento intensivo en tiempo en el que se usa un medio particular tal como agar Sabourad (tal como de Oxoid Ltd., Basingstoke, RU) para multiplicar selectivamente *Candida* en la muestra; Procedimiento de Aglutinación de Látex, en el que se hacen reaccionar anticuerpos policlonales con maná de *Candida*, aunque no se ha encontrado un producto de alta calidad para uso clínico.

35 Las enfermedades causadas por *Trichomonas* y *Candida* son difíciles de distinguir en términos de síntomas. Puesto que los agentes terapéuticos para las mismas son también diferentes, se necesita un medio diagnóstico que sea simple, rápido y eficaz.

El documento CN 101320040 A describe un kit que usa diferentes reactivos para detectar *Trichomonas* y *Candida* y propugna el uso de N-acetil-β-D-aminohehexósido como agente detector para *Candida*, y un sustrato de proteasa específico para *Trichomonas* como agente detector para *Trichomonas*.

40 El documento EP 153618 A2 divulga un medio de cultivo para la identificación específica y/o diferenciación de *Candida albicans* y levadura de *Candida tropicalis*.

Sanon y otros (2005) *Biomedicine & Pharmacotherapy* 59, 245-248 investigan algunas características bioquímicas de N-acetil-β-D-hexosaminidasa purificada de *Trichomonas vaginalis*, incluidas especificidad del sustrato y actividad de inhibidores.

45 **Sumario de la invención**

La presente invención se define en las reivindicaciones.

Un aspecto de la divulgación se refiere a un kit, especialmente:

1.1 Un kit que comprende N-acetil-aminohehexósido como agente detector de *Trichomonas*.

1.2 El kit de acuerdo con 1.1 que además comprende un indicador de pH.

50 1.3 El kit de acuerdo con 1,2, en el que el N-acetil-β-D-aminohehexósido es además opcionalmente un agente detector de *Candida*.

1.4 El kit de acuerdo con cualesquier rasgos precedentes, en el que el mencionado N-acetil-β-D-aminohexósido es N-acetil-β-D-glucosaminidina o N-acetil-β-D-aminogalactósido.

1.5 El kit de acuerdo con cualesquier rasgos precedentes, en el que el mencionado N-acetil-β-D-aminohexósido presenta un cromógeno, siendo el cromógeno preferiblemente bromoindolilo, p-nitrofenilo, 4-metilumbeliferona o un grupo naftol.

1.6 El kit de acuerdo con cualesquier rasgos precedentes, que además comprende como mínimo un agente seleccionado entre el grupo constituido por el agente detector neuraminidasa, el agente detector prolidasa, el agente peroxidasa detector de peróxido de hidrógeno, y el agente esterasa detector de leucocitos.

1.7 El kit de acuerdo con cualesquier rasgos precedentes, que además comprende una mapa de colores estándar tal como un mapa de colores estandar de NAG y/o un mapa de colores estándar de pH.

1.8 El kit de acuerdo con cualesquier rasgos precedentes, en el que se inmoviliza sobre un vehículo de fase sólida como mínimo un agente seleccionado entre N-acetil-β-D-aminohexósido, agente detector de neuraminidasa, agente detector de prolidasa, agente detector de peroxidasa y agente detector de esterasa de leucocitos, y un indicador de pH, seleccionándose preferiblemente el vehículo de fase sólida entre plásticos y papel de absorción de capacidad tal como la del papel de trapos, papel de pulpa de madera, papel de bagazo y filtro de vidrio de fibras.

1.9 El kit de acuerdo con cualesquier rasgos precedentes, que es un panel de detección combinado que comprende un medio de base del panel y un medio de cierre dispuesto en el medio de base del panel.

1.10 El kit de acuerdo con 1.9, en el que el mencionado medio de cierre es una copa de cierre combada sobre el lado de la ranura de la zona de reacción en el medio de base del panel.

1.11 El kit de acuerdo con 1.9, en el que el mencionado medio de cierre es una tira de cierre unida al lado de la ranura de la zona de reacción en el mencionado medio de base del panel.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a su uso, especialmente:

2.1 Uso de N-acetil-β-D-aminohexósido para la detección de Trichomonas.

2.2 Uso de N-acetil-β-D-aminohexósido en combinación con un indicador de pH para la determinación de la presencia de Trichomonas o Candida.

2.3 Uso de N-acetil-β-D-aminohexósido para la preparación de un kit para detectar Trichomonas.

2.4 Uso de N-acetil-β-D-aminohexósido en combinación con un indicador de pH para la preparación de un kit que se usa para la determinación de la presencia de Trichomonas o Candida.

2.5 El uso de acuerdo con cualesquier rasgos precedentes, en el que el mencionado N-acetil-β-D-aminohexósido es N-acetil-β-D-aminoglucósido o N-acetil-β-D-aminogalactósido.

2.6 El uso de acuerdo con cualquier rasgo precedente, en el que el mencionado N-acetil-β-D-aminohexósido presenta un cromógeno que preferiblemente es un grupo bromoindolilo, p-nitrofenilo, 4-metilumbeliferona o naftol.

2.7 El uso de acuerdo con cualquier rasgo precedente, en el que el mencionado N-acetil-β-D-aminohexósido se inmoviliza sobre un vehículo de fase sólida, seleccionándose el vehículo en fase sólida preferiblemente entre plásticos y papel de absorción de capacidad tal como la del papel de trapos, papel de pulpa de madera, papel de bagazo y filtro de vidrio de fibras.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un procedimiento de detección, especialmente:

3.1 Un procedimiento para la detección de la presencia de Trichomonas en una muestra, que comprende poner en contacto N-acetil-β-D-aminohexósido con la muestra.

3.2 Un procedimiento para la detección de la presencia de Trichomonas en una muestra, que comprende poner en contacto N-acetil-β-D-aminohexósido con la muestra y poner en contacto un indicador del pH con la muestra.

3.3 El procedimiento de acuerdo con cualesquier rasgos precedentes, en el que la mencionada muestra es una muestra de vagina, uretra, próstata o cavidad oral.

3.4 El procedimiento de acuerdo con cualesquier rasgos precedentes, en el que el mencionado N-acetil-β-D-aminohexósido es N-acetil-β-D-aminoglucósido o N-acetil-β-D-aminogalactósido.

3.5 El procedimiento de acuerdo con cualesquier rasgos precedentes, en el que el mencionado N-acetil-β-D-aminohexósido presenta un cromógeno que preferiblemente es un grupo bromoindolilo, p-nitrofenilo, 4-metilumbeliferona o naftol.

3.6 El procedimiento de acuerdo con cualesquier rasgos precedentes, en el que el mencionado N-acetil-β-D-

aminohexósido se inmoviliza sobre un vehículo de fase sólida, seleccionándose el vehículo en fase sólida preferiblemente entre plásticos y papel de absorción de capacidad tal como la del papel de trapos, papel de pulpa de madera, papel de bagazo y filtro de vidrio de fibras.

5 3.7 El procedimiento de acuerdo con cualesquier rasgos precedentes, en el que la reacción negativa al N-acetil- β -D-aminohexósido se determina como exenta de *Trichomonas* o *Candida*, o la reacción positiva al N-acetil- β -D-aminohexósido con un pH de no menos de 4,8 se determina como presencia de *Trichomonas*, o la reacción positiva al N-acetil- β -D-aminohexósido con un pH de no más de 4,6 se determina como presencia de *Candida*.

10 3.8 Un procedimiento de detección combinado, que comprende un procedimiento de acuerdo con cualesquier rasgos precedentes, junto con al menos una detección seleccionada entre una detección seleccionada entre el grupo constituido por detección de neuraminidasa, detección de prolidasa, detección de peróxido de hidrógeno y detección de esterasa de leucocitos.

3.9 El procedimiento de detección combinado de acuerdo con 3.8, en el que al menos una de las mencionadas detecciones de neuraminidasa, prolidasa, peróxido de hidrógeno y esterasa de leucocitos se realiza en un vehículo de fase sólida.

15 3.10 El procedimiento de acuerdo con cualesquier rasgos precedentes, en el que el resultado de como mínimo una reacción seleccionada entre la reacción de N-acetil- β -D-hexosaminidasa, reacción de neuraminidasa, reacción de prolidasa, reacción de peróxido de hidrógeno, reacción de esterasa de leucocitos e indicación del pH se determina por comparación del color de la muestra con el correspondiente mapa de colores estándar, o por lectura del color de la muestra por un lector.

20 Descripción detallada de la invención

Enzima

25 Como se ha descrito antes, N-acetil- β -D-hexosaminidasa significa una enzima clasificada como EC.3.2.1.52 de acuerdo con la designación del Comité de Nomenclatura de la International Union of Biochemistry. Actúa principalmente sobre sustrato de N-acetil- β -D-aminoglucósido y sustrato de N-acetil- β -D-aminogalactósido, hidrolizando el terminal no reductor N-acetil-D-hexosamina de N-acetil- β -D-aminohexósido. Esta enzima es una enzima inducible: la adición de análogo de los sustratos de la mencionada enzima puede inducir secreción de esta enzima. Como se describe aquí, un inductor de enzima se refiere a una sustancia que puede inducir la secreción de N-acetil- β -D-hexosaminidasa de acuerdo con la invención y puede seleccionarse entre galactosa, glucosa, fructosa y similares.

30 Esta enzima es también conocida como hexosaminidasa, β -acetilaminodesoxihexosidasa, N-acetil- β -hexosaminidasa, N-acetil- β -hexosaminidasa, β -hexosaminidasa, β -acetilhexosaminidasa, β -D-N-acetilhexosaminidasa, β -N-acetilglucosaminidasa, β -N-acetil-D-hexosaminidasa, hexosaminidasa A, N-acetilhexosaminidasa y β -D-hexosaminidasa, todas ellas contempladas en la invención.

35 Es conocido que *C. albica* y *C. tropica* tienen esta enzima. La patente china 200720089307.9 describe el uso del procedimiento de la N-acetilhexosaminasa para la detección de colpitis micótica (también llamada vaginitis candidal), cuyo contenido se incorpora aquí en su totalidad por referencia. Hasta el momento, no se da cuenta de una muestra clínica que antes de la purificación se diga que es positiva a *Trichomonas* después de detección con esta enzima.

40 El inventor ha descubierto sorprendentemente que las *Trichomonas* y la mayoría de los miembros de *Candida* se pueden detectar detectando N-acetil- β -D-hexosaminidasa.

Sustrato

45 El compuesto que es el sustrato de N-acetil- β -D-hexosaminidasa descrito en la presente memoria es conocido como β -acetilaminohexósido, N-acetil- β -D-aminohexósido, N-acetil- β -aminohexósido, β -aminohexósido, β -D-N-acetilaminohexósido, β -N-acetilaminohexósido, β -N-acetil-D-aminohexósido, N-acetilaminohexósido o β -D-aminohexósido. Cuando se usan como sustratos de la N-acetil- β -D-hexosaminidasa de acuerdo con la invención los compuestos designados como tales, están incluidos en el ámbito de la invención. En algunas realizaciones, la N-acetil- β -D-hexosaminidasa se acorta a acetilaminoglucósido o abreviadamente NAG.

En algunas realizaciones, el N-acetil- β -D-aminohexósido de acuerdo con la invención es N-acetil- β -D-aminoglucósido o N-acetil- β -D-aminogalactósido.

50 El sustrato de N-acetil- β -D-aminohexósido de acuerdo con la invención porta un cromógeno. Preferiblemente, el cromógeno es un grupo bromoindolilo (tal como 5-bromo-4-cloro-3-indolilo), p-nitrofenilo, 4-metilumbeliferona o naftol. Entre tales sustratos figuran, no limitativamente, 5-bromo-, 4-cloro-, 3-indolil-acetilaminoglucósido, p-nitrofenil-acetilaminoglucósido (PNP-NAG), p-nitrofenil-acetilaminogalactósido, y similares. Tal compuesto se puede

comprar en muchas compañías. Cuando el cromógeno es un grupo nitrofenilo o naftol, al sistema de reacción se añade una solución de freno para terminar a tiempo el desarrollo de color.

Valor del pH

5 Es sabido en la técnica que las Trichomonas son organismos anaeróbicos que producen una gran cantidad de aminas orgánicas inferiores en su metabolismo. El inventor ha encontrado que, usualmente, el pH de las muestras clínicas que contienen Trichomonas aumenta significativamente y alcanza un valor de 5,0 o más alto.

También se sabe en la técnica que el pH de una muestra que contiene Candida usualmente es inferior a 4,5. El inventor ha hecho un análisis estadístico de 1362 muestras clínicas y ha encontrado que el 94,8% de muestras infectadas con Candida tiene un pH igual o inferior a 4,6.

10 El inventor apreció infecciones coexistentes de Candida y Trichomonas que están representadas como de reacción positiva con acetilhexosaminidasa y un pH igual o ligeramente inferior a 4,6. Sin embargo, la presencia de esta situación es extremadamente baja, incluso más baja que la de una muestra infectada con Candida con pH superior a 4,6, como lo ha descubierto el inventor. Por tanto, el inventor cree que la combinación de la detección de N-acetil-β-D-hexosaminidasa con la determinación del pH se puede usar para distinguir muestras infectadas con Trichomonas de muestras infectadas con Candida.

Procedimiento de detección

20 Consecuentemente, la divulgación se refiere a un procedimiento para la detección de la presencia de Trichomonas en una muestra, que comprende poner en contacto N-acetil-β-D-aminohexósido con la muestra. El N-acetil-β-D-aminohexósido como sustrato de la N-acetil-β-D-hexosaminidasa puede detectar la presencia en la muestra de la mencionada enzima. Más específicamente, el procedimiento para la detección de Trichomonas comprende poner en contacto el agente detector N-acetil-β-D-aminohexósido que contiene cromógeno con la muestra y dejar que se revele el color. El procedimiento para la detección de Trichomonas comprende también determinar el pH de la muestra.

25 La invención se refiere también a un procedimiento para la determinación selectiva de Trichomonas y Candida en una muestra, que comprende poner en contacto N-acetil-β-D-aminohexósido con la muestra y poner en contacto un indicador de pH con la muestra para determinar si existe en la muestra Trichomonas y/o Candida. El N-acetil-β-D-aminohexósido puede detectar la presencia de N-acetil-β-D-hexosaminidasa en la muestra. El indicador de pH puede detectar la acidez o alcalinidad de la muestra.

30 En el procedimiento de acuerdo con la invención no hay límite particular en la secuencia de la etapa de detección de la enzima y la etapa de detección del pH, que también se pueden realizar simultáneamente.

En el procedimiento de acuerdo con la invención, la muestra comprende las tomadas de vagina, uretra, próstata o la cavidad oral. Por ejemplo, la muestra de vagina puede ser una muestra leucorreal, tal como una muestra tomada del fornix posterior. La muestra se puede diluir con un diluyente tal como solución salina fisiológica. La muestra a poner en contacto con el indicador de pH se puede usar sin dilución.

35 En una realización específica, se ensaya una muestra por el procedimiento de acuerdo con la invención y se determina que está exenta de infección por Trichomonas y Candida si es negativa a N-acetil-β-D-hexosaminidasa, o se determina que está infectada con Trichomonas o Candida si es positiva a N-acetil-β-D-hexosaminidasa. En la última situación, se determina seguidamente que la muestra está infectada con Trichomonas si su pH es no inferior a 5,0 (preferiblemente no inferior a 4,8), o se determina que la muestra está infectada con Candida si su pH es no mayor que 4,5 (preferiblemente no mayor que 4,6).

Kit

45 La divulgación se refiere también a un kit que comprende N-acetil-β-D-aminohexósido como agente para detectar Trichomonas. La divulgación se refiere también a un kit que comprende N-acetil-β-D-aminohexósido como agente para detectar Trichomonas y Candida. Cuando se detecta actividad de N-acetil-β-D-hexosaminidasa, se determina que están presentes Trichomonas y Candida en la muestra.

El kit puede comprender un indicador de pH, tal como al menos uno de los muchos indicadores de pH conocidos en la técnica, en especial un indicador que puede distinguir pH 4,6 y pH 4,8. Por ejemplo, tal indicador de pH puede ser verde de bromocresol, rojo de clorofenol, rojo de propilo y similares.

50 En algunas realizaciones, el kit puede comprender un mapa de colores estándar, incluido un mapa de colores estándar para reacciones enzimáticas (tal como un mapa de colores estándar para reacciones enzimáticas de NAG y otras reacciones enzimáticas que se mencionan más adelante), y/o un mapa de colores estándar para ensayo del pH.

En otras realizaciones el kit puede estar equipado con un sensor que capta un cambio de color, tal como un sensor

que puede captar el cambio de color de un agente que detecta NAG, y/o un sensor que capta el cambio del indicador de pH, o el kit puede estar equipado con un dispositivo conectado a dispositivos electrónicos tales como un ordenador. El cambio causado por contacto del agente detector de NAG y/o el indicador de pH puede ser captado por el mencionado sensor. Se puede transmitir una señal desde el sensor al mencionado dispositivo electrónico. Un programa ejecutado en el dispositivo electrónico puede reconocer la señal y dar el resultado de la reacción de NAG y/o el ensayo de pH. Por tanto, el kit puede comprender también un medio que puede leer el ordenador, tal como un CD, para instalar el correspondiente software de reconocimiento y análisis.

Además, el kit puede comprender un reactivo para dilución de la muestra, tal como una solución salina fisiológica, y/o un reactivo para terminación de la reacción, como puede ser una solución acuosa de 5-10 mg/ml de NaOH.

Fase sólida

En algunas realizaciones, la detección de acuerdo con la invención se puede realizar, completamente o parcialmente, en una fase sólida. A este fin, el agente detector y/o una sustancia de acuerdo con la invención se puede inmovilizar sobre un vehículo en fase sólida. Por ejemplo, se puede inmovilizar N-acetil-β-D-aminohexósido en una parte del vehículo de fase sólida y el indicador de pH se puede inmovilizar sobre otra parte del vehículo en fase sólida; alternativamente, sólo el N-acetil-β-D-aminohexósido se inmoviliza sobre el vehículo en fase sólida y el indicador de pH no se inmoviliza.

El mencionado vehículo en fase sólida puede ser un papel con capacidad de adsorción, por ejemplo, papel de filtro, papel de trapos, papel de pulpa de madera, papel de bagazo y filtro de fibra de vidrio; también puede ser una membrana de poliéster, membrana de nailon, etc.; y también de plástico con capacidad de adsorción.

Consecuentemente, el kit puede ser un medio de detección en fase sólida, tal como un panel de detección, una tira de detección, un bloque de detección y similar. El vehículo en fase sólida puede además cubrirse horizontalmente o embeberse internamente en un medio de base de plástico.

Preparación del kit

La divulgación se refiere también a un procedimiento para la preparación del kit descrito aquí, en el que la preparación de la zona de detección del N-acetil-β-D-aminohexósido comprende añadir una solución de N-acetil-β-D-aminohexósido que contiene cromógeno a un vehículo en fase sólida que tiene capacidad de adsorción, o sumergir en la mencionada solución la fase sólida con capacidad de adsorción, someterla luego a secado, como puede ser secado en vacío, secado en caliente, secado por deshumidificación, etc. Preferiblemente, la mencionada solución de NAG que contiene cromógeno es una solución de NAG que contiene 1-3 mg/ml de cromógeno en solución fisiológica salina tamponada con fosfato (PBS). En una realización específica, la mencionada solución en PBS de NAG que contiene cromógeno se prepara como sigue: NAG que contiene cromógeno se disuelve en disolventes orgánicos tales como metanol, etanol, dimetilsulfóxido (DMSO) o dimetilformamida (DMF), se disuelve luego en un tampón 10-50 mM de PBS (pH 5,0-6,0) que contiene el inductor de enzima descrito antes y se mezclan íntimamente.

En una realización específica del kit, como indicador de pH se usa verde de bromocresol. El verde de bromocresol se puede disolver en etanol absoluto y mezclar íntimamente obteniéndose una solución de 1-3 mg/ml. Además, la solución de verde de bromocresol preparada se puede añadir al vehículo en fase sólida tal como una pieza de papel, o una pieza de papel se puede sumergir en la mencionada solución de verde de bromocresol y secar (como por secado en vacío, secado en caliente, secado por deshumidificación, y similar), obteniéndose el papel de detección del valor de pH.

Uso

La divulgación también se refiere al uso de N-acetil-β-D-aminohexósido para la detección de Trichomonas. La invención también se refiere al uso de N-acetil-β-D-aminohexósido para la preparación de un kit para la detección de Trichomonas. Más específicamente, la divulgación se refiere al uso de N-acetil-β-D-aminohexósido para la preparación de un medio para detectar Trichomonas.

La invención también se refiere al uso de N-acetil-β-D-aminohexósido en combinación con un indicador de pH para la detección de Trichomonas o para la detección selectiva de Trichomonas y Candida. La divulgación también se refiere al uso de N-acetil-β-D-aminohexósido en combinación con un indicador de pH para la preparación de un kit para detectar la presencia de Trichomonas y/o Candida.

Combinación con otros procedimientos y kits para la detección de vaginitis

Factores que no son Trichomonas ni Candida pueden causar enfermedades de la vagina en mujeres. Son ejemplos comunes la vaginosis bacteriana (abreviadamente BV), también denominada vaginitis no específica, vaginitis Gardnerella, vaginitis vaginalis Haemophilus, que se puede diagnosticar detectando la generación de H₂O₂ y la actividad de neuraminidasa y prolidasa. Aparte de la vaginosis bacteriana, la vaginosis candidica (también

denominada colpitis micótica), vaginitis de *Trichomonas*, se pueden diagnosticar otras vaginitis de causa desconocida por detección de la actividad de esterasa de leucocitos. Véase, por ejemplo, patente china 200720080307.9.

5 Por tanto, el procedimiento y el kit para detectar *Trichomonas* y/o *Candida* se puede combinar además con el procedimiento corriente y el kit para detectar otras vaginitis (tal como vaginosis bacteriana y vaginitis de causa desconocida) de la técnica para generar productos simples y convencionales tales como paneles de detección combinados, que facilitarán no sólo a las instituciones médicas sino a los usuarios finales, a determinar a fondo y rápidamente la propiedad de la enfermedad vaginal y seleccionar pronto medicamentos eficaces para tratamiento de la enfermedad.

10 A este fin, el kit puede comprender adicionalmente otros agentes detectores, agentes conocidos para la detección de la enfermedad vaginal tales como agente detector de neuraminidasa, agente detector de prolidasa, agente detector de peróxido de hidrógeno y agente detector de esterasa de leucocitos, y otros similares.

15 En una realización específica, al menos uno de los mencionados agentes detectores, agente detector de neuraminidasa, agente detector de prolidasa, agente detector de peróxido de hidrógeno y agente detector de esterasa de leucocitos, se puede inmovilizar sobre un vehículo en fase sólida. Un ejemplo de inmovilización es añadir una solución de los agentes detectores al vehículo en fase sólida en la mencionada solución, o sumergir el vehículo de fase sólida en la mencionada solución, a lo que sigue el secado mediante vacío, calentamiento, deshumidificación y similares.

20 A los fines mencionados, la divulgación se refiere a un panel de detección combinada que comprende un medio panel básico y un medio de cierre dispuesto en el medio panel de base, medio panel de base que está equipado separadamente con una zona de reacción de N-acetilhexosaminidasa y una zona de reacción con reactivo de pH, dentro, estando el sustrato de N-acetilhexosaminidasa inmovilizado en la zona de reacción de la N-acetilhexosaminidasa.

25 Opcionalmente, el mencionado medio panel de base puede tener una zona de reacción de neuraminidasa y una zona de reacción de prolidasa, estando el sustrato de neuraminidasa inmovilizado en la zona de reacción de neuraminidasa y el sustrato de prolidasa inmovilizado en la zona de reacción de prolidasa.

El mencionado medio panel de base puede tener opcionalmente una zona de reacción de peróxido de hidrógeno en la que la peroxidasa está inmovilizada.

30 El mencionado medio panel de base opcionalmente puede disponer de una zona de reacción de esterasa de leucocitos, en la que el sustrato de esterasa de leucocitos está inmovilizada.

El medio de cierre mencionado es una caperuza abrochada al lado de la ranura del medio panel de base, o una tira de cierre unida al lado del cierre de la zona de reacción del medio panel de base. Se pueden emplear otras formas (tales como gotas) que son adecuadas para carga de líquidos.

35 Un aspecto de la divulgación se refiere a un procedimiento de detección combinado que comprende la detección de *Trichomonas* y/o la detección de *Candida* como se ha descrito antes, y que comprende además un procedimiento de detección al menos seleccionado entre el grupo constituido por agente detector de neuraminidasa, agente detector de prolidasa, agente detector de peróxido de hidrógeno y agente detector de esterasa de leucocitos y similares. Los mencionados agente detector de neuraminidasa, agente detector de prolidasa, agente detector de peróxido de hidrógeno y agente detector de esterasa de leucocitos son conocidos en la técnica.

40 Consecuentemente, en una realización específica, al menos una detección con los mencionados agentes de detección de neuraminidasa, de prolidasa, de peróxido de hidrógeno y esterasa de leucocitos se realiza en un vehículo en fase sólida, por ejemplo, todas se realizan en un vehículo en fase sólida.

45 En una realización específica, cinco marcadores vaginales: N-acetilhexosaminidasa, neuraminidasa, prolidasa, peróxido de hidrógeno y esterasa de leucocitos se integran en un panel de detección combinado con detección del pH. Estos marcadores se ensayan juntos para facilitar la diagnosis del estado de salud de la vagina de la mujer.

La secreción vaginal se toma de acuerdo con medios convencionales a los que se puede aportar una solución de procesamiento de la muestra. La muestra se gotea a cada zona de reacción del panel de detección combinado, se mezcla íntimamente y se deja que se revele el color y, si desea, suplementando la mezcla con una solución reveladora para revelar el color. La presencia o el tipo de vaginosis se puede determinar combinando el valor del pH de la muestra con el cambio del color y/o la claridad del color en las ranuras. Por ejemplo, la reacción de la N-acetilhexosaminidasa tiene un color amarillo en condiciones alcalinas; la reacción de la prolidasa tiene color amarillo; la reacción de la neuraminidasa aparece de color rojo brillante o púrpura actuando la solución reveladora del color; el peróxido de hidrógeno por catálisis de la peroxidasa puede oxidar un sustrato cromógeno generando un producto rojo; y la esterasa de leucocitos es azul. La oscuridad del color aparecido es proporcional a la actividad de cada enzima o la concentración de peróxido de hidrógeno. En el ensayo práctico, algo de la zona de reacción se

55

suplementa con un agente de revelado de color pertinente o un agente de ajuste del pH.

Como se ha descrito antes, un papel de detección combinado que incluye meramente una zona de reacción de N-acetilhexosaminidasa y una zona de reacción de reactivo del pH, con los correspondientes ingredientes inmovilizados en las ranuras es suficiente para distinguir la infección de *Trichomonas* y de *Candida*. La adición de zonas de reacción de neuraminidasa, prolidasa, peróxido de hidrógeno y/o esterasa de leucocitos en el panel de detección combinado facilita la detección de estos marcadores bioquímicos de vagina para distinguir vaginosis bacteriana, colpitis miótica, vaginitis trichomonas y vaginitis de otras causas.

Ejemplos

Ejemplo 1. Preparación de papel de detección

Se disolvió en metanol p-nitrofenil N-acetil- β -D-aminoglucósido (comprado a Shanghai Kayon Biological Technology Co. Ltd., nº. de catálogo M0110) y luego se disolvió en solución salina de fosfato (pH 5,5) que contiene D-galactosa a una concentración de 1 mg/ml y se mezcló íntimamente. La solución de NAG se añadió a piezas de papel de 5 mm de ancho a 15 μ l/pieza y se secó durante la noche, obteniéndose el papel de detección de NAG.

Se disolvió en agua pura hidróxido sódico para alcanzar una concentración de 8 mg/ml y se mezcló íntimamente, obteniéndose la solución de freno.

Se disolvió verde de bromocresol en alcohol absoluto para alcanzar una concentración de 2 mg/ml y se mezcló íntimamente. Se añadió a piezas de papel de 5 mm de ancho a 15 μ l/pieza y se secó durante la noche, obteniéndose el papel de detección del pH.

Ejemplo 2. Detección del valor del pH

Hasta 2009 se han obtenido más de 10000 muestras de muestras leucorreales de pacientes externos que visitan el departamento de ginecología del tercer hospital afiliado a la Universidad de Zhengzhou. El valor del pH de estas muestras se detectó con el papel de detección preparado antes. Los resultados revelaron que todas las muestras con infección de *Trichomonas* tenían un pH de no menos de 4,8, mientras que todas las muestras con infección de *Candida* tenían un pH de no más de 4,6.

Ejemplo 3. Detección de enzima en combinación con detección del pH

Las muestras se tomaron por frotis estéril del fornix posterior de cada una de 212 pacientes externas que visitaron el tercer hospital afiliado a la Universidad de Zhengzhou.

1. Detección de acuerdo con la invención

Las muestras se mojaron directamente en el papel de detección del pH para lectura del pH y luego se diluyeron con solución fisiológica salina y se pusieron en el papel de detección de NAG preparado antes. El papel de detección de NAG se calentó a 37°C durante 15 min y se añadió a gotas una solución de reactivo de freno. El papel de detección de NAG apareció con un color amarillo, sugiriendo la presencia de actividad de la N-acetil- β -D-hexosaminidasa.

2. Detección convencional

Se tomaron otras dos muestras y se cultivaron en medio cromógeno de *Candida* (HiCrome *Candida* Differential Agar, Himedia Laboratories Pvt Limited, India) y medio de *Trichomonas* (*Trichonomas* Médium, OXOID Limited, RU), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Resultados

1. *Trichomonas*

(1). Sensibilidad. Entre 9 muestras que se determinó que eran positivas a *Trichomonas* por el procedimiento de cultivo, se determinó que 8 eran también positivas por el procedimiento de detección combinado de acuerdo con la invención. La sensibilidad del procedimiento de acuerdo con la invención para detección de *Trichomonas* de acuerdo con la invención es de 88,9% (8/9).

(2). Especificidad. Entre 203 muestras que se determinó que eran negativas a *Trichomonas* por el procedimiento de cultivo, se determinó que 198 muestras eran también negativas por el procedimiento de detección combinado de acuerdo con la invención. La especificidad del procedimiento de la invención para la detección de *Trichomonas* es de 97,7% (198/203).

2. *Candida*

(1). Sensibilidad. Entre 34 muestras que se determinó que eran positivas a *Candida* por el procedimiento de cultivo, se determinó que 26 muestras eran también positivas por el procedimiento de detección combinado de acuerdo con la invención. La sensibilidad del procedimiento de acuerdo con la invención para detección de *Trichomonas* de

acuerdo con la invención es de 76,5% (26/34).

(2). Especificidad. Entre 178 muestras que se determinó que eran negativas a Candida por el procedimiento de cultivo, se determinó que 149 muestras eran también negativas por el procedimiento de detección combinado de acuerdo con la invención. La especificidad del procedimiento de la invención para la detección de Candida es 85,6% (149/178).

Ejemplo 4. Preparación de un kit de detección combinado

El papel de detección de NAG y el papel de detección del pH se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo 3. Se adsorbieron individualmente en diferentes piezas de papel de acuerdo con un procedimiento conocido en la técnica reactivos convencionales para detectar neuraminidasa, prolidasa, peróxido de hidrógeno y esterasa de leucocitos. Estas piezas se fijaron individualmente en un panel de plástico o se unieron a una tira larga de papel.

Ejemplo 5. Detección ginecológica combinada

Protocolo 1

Se tomaron muestras de secreción vaginal, se diluyeron y se gotearon sobre varias piezas de papel preparado en el Ejemplo 4, con solución de revelado de color que se goteó sobre el papel de neuraminidasa.

Después de 1 min se leyó el pH por comparación con el mapa de color estándar.

Luego se incubó el panel entero de plástico o la tira larga de papel a 37°C durante 15 min.

Se goteó sobre el papel de NAG la solución de freno. Después de 30 s, se leyeron los resultados que no eran el pH.

Protocolo 2

Se diferencia del Protocolo 1 meramente en que el pH se lee usando un lector. Por esta razón, la muestra no se cargó en la zona de detección del pH antes de la incubación. Después de la incubación se cargó la muestra diluida o no diluida.

Resultados

Para el papel de peróxido de hidrógeno, la ausencia de revelado de color o un revelado de color ligero indica positivo, otra manifestación indica negativo. Para el papel de NAG, papel de neuraminidasa, papel de prolidasa y papel de esterasa de leucocitos, la ausencia de revelado de color o un revelado de color ligero indica positivo, otra manifestación indica negativo.

Discusión

Por ejemplo, si el papel de N-acetilhexosaminidasa aparece como positivo, se diagnostica vaginitis de trichomonas si el papel inmovilizado con reactivo de pH muestra un $\text{pH} \geq 4,8$, mientras que se diagnostica colpitis micótica si el $\text{pH} \leq 4,6$. Si el papel de N-acetilhexosaminidasa aparece como negativo y el papel de prolidasa aparece como positivo, ello puede indicar BV. Si el papel de neuroaminidasa aparece como positivo, puede ser BV. Si el papel de peróxido de hidrógeno aparece como positivo, ello indica desequilibrio de flora vaginal y puede ser BV. Si todos los papeles mencionados ahora aparecen como negativos, excepto que el papel de esterasa de leucocitos aparece como positivo, ello indica otros tipos de vaginitis.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para distinguir en una muestra infección con *Trichomonas* de infección con *Candida*, que comprende la detección de N-acetil- β -D-hexosaminidasa y la determinación de pH en la muestra.
- 5 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la mencionada muestra se determina que está infectada con *Trichomonas* si (i) es positiva a N-acetil- β -D-hexosaminidasa y (ii) su pH es de no menos de 4,8.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la mencionada muestra se determina que está infectada con *Candida* si (i) es positiva a N-acetil- β -D-hexosaminidasa y (ii) su pH es de no más de 4,6.