

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 353**

51 Int. Cl.:

G01N 33/52 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/25 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2011 PCT/US2011/001192**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013 WO13006148**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2011 E 11869164 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2729804**

54 Título: **Método que utiliza sustratos de enzimas que producen productos fluorescentes insolubles y cromógenos, y el uso en combinación con sustratos de enzimas que producen productos solubles**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.06.2018

73 Titular/es:

**ROTH, GEOFFREY N. (50.0%)
19676 Riverview Drive
Goshen, IN 46526-9129, US y
ROTH, JONATHAN N. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ROTH, GEOFFREY N. y
ROTH, JONATHAN N.**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 671 353 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

Método que utiliza sustratos de enzimas que producen productos fluorescentes insolubles y cromógenos, y el uso en combinación con sustratos de enzimas que producen productos solubles

5

Antecedentes de la invención

10

Las pruebas microbianas actuales son cualitativas las cuales plantean problemas definidos. Dos problemas notables son la lentitud para lograr los resultados, y el alto costo y la disponibilidad de ciertos reactivos usados en diversas formulaciones de prueba.

15

20

25

30

35

40

En los últimos años, el uso de indicadores cromogénicos, fluorogénicos y no cromogénicos de enzimas se ha usado cada vez más debido a la facilidad de uso y la detección rápida, especialmente en el campo de la microbiología. Edberg patentó (Patente de los Estados Unidos núm. 4,925,789) el uso de un fluorógeno soluble (metilumbeliferona-fluorescente azul) para la detección de beta-galactosidasa y un cromógeno soluble (nitrofenol-amarillo) para la detección de beta glucuronidasa. Esta prueba es en un caldo. Sin embargo, la literatura (ver Brenner las Patentes de los Estados Unidos núms. 6,063,590; 6,306,621; y 6,670,145) ha enseñado que los fluorógenos y cromógenos que producen productos solubles no son buenos para su uso en agar tradicional u otras pruebas de placas tipo gel o para pruebas de filtración de membrana porque el indicador soluble no se queda con la colonia microbiana por lo que es fácil de detectar, pero se extiende a través de la placa por lo que uno no puede decir lo que se (o no se) supone que indica. Una respuesta a este problema vino con el descubrimiento de que los sustratos de indolil, especialmente los sustratos indolil halogenados, pueden escindirise enzimáticamente para producir colores insolubles que permanecerán con una colonia microbiana, y hacen que su detección sea simple. Ley (Patente de los Estados Unidos núm. 4,923,804) aprovechó esta idea y patentó el uso de indolil beta glucuronidasa para detectar E. coli con filtración de membrana. Roth (Patente de los Estados Unidos núm. 5,210,022) fue el primero en usar dos colores de cromógenos insolubles para detectar dos enzimas diferentes a la vez, y ponerlas en práctica. Ferguson (Patente de los Estados Unidos núm. 5,358,854) sintetizó la nueva cloroindolil galactósido para Roth detectar coliformes, y Roth combinó esto con bromo-cloro-glucurónido para detectar y diferenciar E. coli y otros coliformes de manera simultánea. Otro enfoque propuesto usó un fluorógeno soluble y un cromógeno insoluble, pero el uso de sustratos fluorogénicos y/o cromogénicos solubles en un gel sólido o prueba de filtración de membrana se ha visto como indeseable, de nuevo, debido a la naturaleza difusible de sus productos (ver Patentes de Brenner). El documento de patente núm. WO90/12888 describe un método para probar la presencia de un microorganismo particular caracterizado por una enzima particular, que usa un sustrato formador de colorante y/o generador fluorogénico en la superficie de un miembro de soporte sólido que forma un precipitado coloreado o subproducto fluorescente cuando se escinde por la enzima. El documento de patente núm. US6063590 describe un método para la detección de coliformes totales y E. coli, que comprende colocar la muestra objetivo en un caldo que contiene al menos un cromógeno o fluorógeno. El documento de patente núm. WO01/09371 describe un método para realizar una pluralidad de pruebas microbiológicas en cualquier orden al mismo tiempo. El documento de patente núm. US2007/172963 describe un ensayo de flujo lateral para detectar la presencia de un analito en una muestra objetivo líquida, que abarca una región de referencia del analito no difusible, inmovilizado.

45

Resumen de la invención

50

Esta invención se refiere, al menos en parte, a la prueba microbiana y tendrá aplicación en la detección de elementos tales como organismos a través del uso de sustratos fluorogénicos y cromogénicos de enzimas.

55

La invención se define en las reivindicaciones y hace uso de una almohadilla absorbente como una base sobre la cual, en un lado, se coloca un material de diagnóstico con sustratos fluorogénicos y cromogénicos de enzima. Una muestra que contiene un elemento objetivo específico, tal como un organismo, se aplica al material de diagnóstico para provocar después de la incubación que una enzima se absorba al menos en parte a través de la almohadilla. La luz ultravioleta y la luz visible se usan para ver ambos lados de la almohadilla para detectar las apariencias fluorescentes y cromogénicas que representan el elemento objetivo.

60

El material de diagnóstico puede proporcionar tanto una apariencia de fluoróforo como cromóforo en un lado de la base.

65

Como consecuencia, es un objeto de esta invención proporcionar un método para detectar organismos específicos de manera rápida.

Otro objeto de esta invención es proporcionar un método de prueba microbiana que sea económico y proporcione resultados precisos.

Otros objetos serán evidentes al leer la siguiente descripción.

Breve descripción de las figuras

70

El archivo de la patente o la solicitud contiene al menos un dibujo/fotografía ejecutada a color.

La Figura 1 es una vista esquemática de un contenedor de prueba usado en esta invención;

La Foto 1 muestra colonias que crecen en la superficie superior del filtro;

La Foto 2 muestra las colonias en la Foto 1 que se observan a la luz ultravioleta;

La Foto 3 muestra las colonias en la Foto 1 que se observan desde la parte inferior del filtro;

5 La Foto 4 muestra seis especies de bacterias diferentes en el filtro;

La Foto 5 muestra las bacterias en la Foto 4 que se observan a una luz ultravioleta;

La Foto 6 muestra las bacterias en la Foto 4 que se observan desde la parte inferior del filtro;

La Foto 7 muestra las bacterias en la Foto 4 sometidas a una enzima de fluorescencia;

La Foto 8 muestra las bacterias en la Foto 7 que se observan a la luz ultravioleta; y

10 La Foto 9 muestra las bacterias en la Foto 7 que se observan desde la parte inferior del filtro.

Descripción detallada de la invención

15 Se ha demostrado que es beneficioso en ciertas pruebas de elementos, tal como para bacterias, usar un fluorógeno o cromóforo que produce un fluorógeno o cromóforo soluble cuando se escinde por su enzima específica. Esto se realiza mejor en una prueba de superficie sólida si la placa de petri o el contenedor tiene una almohadilla absorbente muy delgada, usada como una base, colocada en la parte inferior de la placa debajo del gel o sosteniendo el caldo de prueba. Tan pronto como se inicia la prueba, y el microbio comienza a producir las enzimas, descomponen los sustratos fluorogénicos, cromogénicos y/o no cromogénicos para liberar los productos solubles, que inmediatamente comienzan a moverse hacia abajo a través de la almohadilla absorbente, donde pueden detectarse muy rápidamente.

20 La delgadez de la almohadilla absorbente es crucial con respecto a la velocidad ya que una almohadilla más delgada minimiza el tiempo de difusión del fluoróforo o cromóforo desde el punto de producción a través del filtro a medida que avanza por la almohadilla absorbente hasta el punto donde puede observarse fácilmente como una mancha distinta en la parte inferior de la almohadilla lo más rápido posible. Independientemente del tipo de almohadilla usada, es importante que los resultados se lean por medio del conteo de las manchas (que representan el fluorógeno o cromógeno soluble) presentes en la parte inferior de la almohadilla.

25 Las almohadillas más delgadas además pueden ser menos costosas que las almohadillas de tamaño regular. En cualquier caso, el tipo, a diferencia de su grosor, de la almohadilla usada (excepto por cuestiones de toxicidad) nunca ha sido un problema en la literatura. Actualmente, una almohadilla de tipo gruesa estándar se usa universalmente para toda la filtración de membrana. Las almohadillas rara vez, o nunca, se usan en las pruebas de agar y gel en la actualidad. Se sugiere que un espesor de almohadilla entre 400 y 1000 micrómetros proporcionará una prueba adecuada en un período de tiempo razonablemente rápido.

30 La observación del material objetivo soluble (fluoróforo o cromóforo) al observar la parte inferior de la almohadilla es particularmente importante cuando se usa más de un fluorógeno o cromógeno en el medio de prueba. Esto es cierto porque recientemente se descubrió que diferentes sustratos fluorogénicos/cromogénicos de enzimas poseen diferentes propiedades. Por ejemplo, los sustratos fluorogénicos de enzimas generalmente producen solo un producto fluorogénico soluble (fluoróforo) cuando actúan sobre su enzima específica, y generalmente los sustratos cromogénicos de enzimas producen solo un producto cromogénico (cromóforo) cuando actúan sobre su enzima específica. Sin embargo, las propiedades anteriormente descritas en las que un único sustrato de enzima exhibe la producción tanto de un producto fluorogénico como de un producto cromogénico cuando actúan después con su enzima específica se describen y caracterizan en la presente descripción como sustratos dobles de enzimas.

35 Interesantemente, el producto fluorogénico de estos sustratos dobles de enzimas es insoluble. Es decir, no se difunde fuera de la entidad que causa su producción, sino que se retiene dentro de esa entidad. Esta propiedad le da características, distintivas y capacidades que son muy diferentes de los fluorógenos solubles conocidos previamente que se han usado en las pruebas de diagnóstico. Por ejemplo, un fluorógeno clásico tal como 4-metilumbeliferil-B-D-glucuronido (MU-gluc) puede combinarse con un sustrato doble de enzima tal como 6-cloro-3-indolil-beta-D-galactósido (Red Gal®) en un único medio para probar la presencia de dos tipos de células, un tipo que es MU-gluc positivo y el otro galactósido (Gal) positivo. En esta situación, cualquier célula MU-gluc positiva producirá el producto MU fluorescente soluble que puede verse y contarse en la parte inferior de la almohadilla, mientras que las células Gal positivas producirán una fluorescencia insoluble que solo es visible desde la superficie del filtro donde las colonias celulares están creciendo.

40 Así, esta invención se refiere a la detección de los elementos, tales como organismos, mediante el uso de sustratos fluorogénicos y cromogénicos de enzimas que, después de la exposición del material objetivo, experimentan escisión enzimática para producir un producto fluorescente (fluoróforo) o producto cromogénico (cromóforo) que se dibuja a través de una almohadilla absorbente subyacente donde, en la parte inferior de la almohadilla, puede identificarse visualmente, tal como mediante exposición a la luz ultravioleta, si es necesario.

45 Existen muchos tipos de pruebas de diagnóstico para las cuales puede usarse este nuevo método. Por ejemplo, para aprovechar la velocidad y la economía, si uno está probando E.coli, la prueba más simple implicaría el uso de la placa de Petri o contenedor de cualquier tamaño con una base que en este caso es solo una almohadilla absorbente delgada que cubre el fondo con una mezcla vertible que se gelificará. Una almohadilla de espesor normal funcionará si la

5 velocidad de prueba no es crucial, pero si se desean resultados rápidos, debe usarse una almohadilla delgada. Los sustratos fluorogénicos de enzimas con nutrientes adicionales se vierten en la parte superior de la almohadilla. Por ejemplo, si la almohadilla se empapa con una solución que contiene ya sea 4-metilumbeliferil-beta-D-galactósido (MUG) (50-100 microgramos/mL) o MUG con diversos nutrientes, por ejemplo, caseína o extractos de levadura. Después se filtra la muestra de prueba y se coloca en la almohadilla empapada en nutrientes (el nutriente puede ser MUG solo), la placa de Petri se incuba hasta que pueda(n) verse la(s) mancha(s) fluorescente(s) con la ayuda de luz ultravioleta a través de la parte inferior de la placa de petri.

10 La fotografía 1 es una imagen de la placa de petri con varias colonias de colores. La fotografía 2 es una imagen de las colonias bajo luz ultravioleta. Observe la fluorescencia tanto de las colonias de E. coli como de no E. coli. La fotografía 3 es una imagen de la parte inferior de la placa, que muestra las manchas verdaderas de E. coli de las colonias correspondientes. Las lecturas falsas esencialmente se eliminan. Además pueden incorporarse detectores que liberan cromógenos insolubles y fluorógenos de diferentes colores para las mismas o diferentes enzimas, y que se leerían desde la parte superior de la placa de petri. Di-beta-glucurónido fluorosceína, y/o trifluormetilumbeliferil-beta-glucurónido, y/o cualquier detector fluorogénico de enzima basado en cumarina puede usarse en lugar de o con MUG para intensificar y acelerar la prueba, y/o cambiar el color fluorescente.

20 A continuación se incluye información para acompañar una serie de fotos que ilustran los principios y resultados del material presentado en el texto.

25 La Foto 1 muestra un crecimiento de 18 horas de bacterias E. coli (colonias azules) y bacterias no E.coli (colonias rosadas) que crecen en la superficie de un filtro de membrana de microporos que descansa sobre una almohadilla absorbente empapada con el medio de cultivo líquido Coliscan® MF que contiene el sustrato fluorogénico de enzima 4-metilumbeliferil-beta-D-glucurónido (MUG gluc).

30 La Foto 2 muestra la misma placa y la misma vista que se muestra en la Foto 1, pero se observa bajo la luz UV de onda larga directa en una habitación oscura. Debe notarse que las colonias coinciden en posición y número en la placa. Además se debería señalar que prácticamente todas las colonias son fluorescentes y que las colonias de E. coli muestran una ligera "borrosidad" alrededor de los bordes debido a la difusión del fluoróforo soluble desde la MUG gluc. Las otras colonias exhiben bordes más definidos debido a que los fluoróforos que los colorean se retienen dentro de las células o son intracelulares.

35 La Foto 3 es la misma placa que se ve en las Fotos 2 y 3, pero la placa se gira y se ve desde la parte inferior para que las manchas fluorescentes brillantes que representan la E.coli se muestren como una imagen especular del patrón de las primeras dos fotos. Nótese que no se ve la fluorescencia de la no E.coli, ya que no se difunde desde las colonias hacia abajo en la almohadilla.

40 La foto 4 muestra ocho horas de crecimiento de seis diferentes especies de bacterias manchadas en la superficie de un filtro de membrana de microporos que descansa sobre una almohadilla absorbente empapada con el medio de crecimiento líquido vendido bajo el nombre de Coliscan® MF y fabricado por Micrology Laboratories de Goshen, Indiana, que no contiene MUG gluc. Por lo tanto, ningún sustrato fluorogénico previamente conocido está en este medio. Los organismos son: A) E. coli (6 en punto); B) Citrobacter freundii (8 en punto); C) Klebsiella pneumoniae (10 en punto); D) Enterobacter aerogenes (12 en punto); E) Salmonella typhimurium (2 en punto); y F) Aeromonas hydrophila (4 en punto).

45 La Foto 5 es la misma placa y la misma vista que se muestra en la Foto 4, pero se observa bajo luz UV de onda larga directa en una habitación oscura. Observe que A, B, C y D presentan fluorescencia azul brillante. Esta fluorescencia está presente a pesar del hecho de que ningún sustrato de enzima fluorogénico previamente conocido estaba en la fórmula del medio de crecimiento.

50 La foto 6 es la misma placa que se ve en las fotos 4 y 5, pero la placa se gira y se ve desde la parte inferior, por lo que es obvio que la fluorescencia presente en los cultivos se ausente cuando se ve desde la parte superior. Esto es una indicación de que la fluorescencia es intracelular (insoluble) y no se difunde hacia abajo en la almohadilla empapada con el medio de crecimiento.

55 La Foto 7 muestra ocho horas de crecimiento de las mismas seis especies, en las mismas posiciones en el filtro, de bacterias como se muestra en la Foto 4, pero en este caso la almohadilla absorbente se empapa con un medio líquido vendido con el nombre ECA Check® y fabricado por Micrology Laboratories de Goshen, Indiana, que contiene el sustrato enzimático fluorogénico MUG gluc.

60 La Foto 8 es la misma placa y la misma vista que se muestra en la Foto 7, pero se observa bajo luz UV de onda larga directa en una habitación oscura. Observe que A, B, C, D y F muestran fluorescencia en esta vista superior. La pregunta es si la fluorescencia se debe a la MUG gluc o algún otro factor. Esta pregunta se resuelve en la Foto 9.

65 La Foto 9 es la misma placa que 7 y 8, pero la placa se gira y se ve desde abajo, por lo que es obvio que cualquier fluorescencia observada proviene del fluoróforo soluble de MUG gluc. En este caso, solo en A (E.coli) se muestra la

fluorescencia, que es correcta. Ninguna de las otras especies bacterianas debe exhibir fluorescencia. Esto demuestra que bajo las condiciones de prueba B, C, D y F pueden considerarse positivas para la glucuronidasa si se observa desde la parte superior, como lo establece el protocolo estándar. Tal consideración puede ser un error.

5 En cualquiera de los ejemplos anteriores, o en otra prueba, cualquier combinación de sustratos de enzimas, enzimas o géneros bacterianos puede usarse o probarse para lograr la identificación o diferenciación. Por ejemplo, los fluorogénicos (basados en derivados de la cumarina como metilumbeliferona o triflorometilumbeliferona, o flourosceína, o resorufina o rezasurina, sales fluorescentes de tetrazolio, carboxi fluorosceína, carboxi rodamina, tetrametilrodamina, carboximetilumbeliferona u otras moléculas de fluorógeno no tóxicas), cromogénicos (sustratos de enzimas indoxilo, sustratos de nitrofenilo, sustratos de aminonaftilo o alfa naftol, sustratos de fenoltaleína, salicina, esculina, sales de tetrazolio visibles u otras moléculas de cromógeno no tóxicas), y cualquier combinación de enzimas tales como glicosidasas, peptidasas, aminopeptidasas, oxidasas, fosfatasas, sulfatasas, ADNasas, ARNasas, girasas, topoisomerasas, fosfoglicosidasas, arilfosfatasas, arilsulfatasas, hemolisinas, triptófanosas, coagulasas, enzimas metabolizadoras de aminoácidos, esterases, eterasas, descarboxilasas, deaminasas, aminosas, amidasas, peroxidasas, lipasas, arilamididasas, caprilasas y cualquier otras enzimas microbianas que pueden detectarse cromogénica o fluorogénicamente o no cromogénicamente, lo que indica que pueden usarse cualquier combinación de microbios, tal como cualquier género o géneros de bacterias u hongos.

20 El dibujo 1 muestra la física del nuevo método, no dibujado a escala. Representa un contenedor abierto con bacterias que crecen en una superficie. A representa un filtro de membrana, si está presente. B es una almohadilla o gel absorbente o ambos. A y B constituyen la base en este caso. C representa la difusión lateral de moléculas solubles de fluoróforo o cromóforo a medida que las fuerzas (capilaridad, absorbanca) las impulsan al fondo de la placa de Petri. D representa una molécula de fluoróforo o cromóforo soluble. E representa E. coli, fluorescente bajo luz UV/negra debido al(los) fluoróforo(s) soluble(s). Puede ser visible debido a los cromóforos solubles o insolubles. F representa bacterias que no producen fluoróforo(s) soluble(s) y/o cromóforo(s) soluble(s) ya que no poseen la enzima adecuada. Tanto E como F pueden emitir fluorescencia o ser visibles en la parte superior de la superficie debido al(los) sustrato(s) que liberan el(los) cromóforo(s) insoluble(s) y/o fluoróforo(s) insoluble(s). La parte inferior del contenedor es G. H es el ancho de la mancha fluorescente que se ve a través del fondo de la placa, y puede representarse en el dibujo más ancho que el tamaño real a propósito de esta explicación. I es el grosor de la almohadilla o gel absorbente o ambos. J es la mancha fluorescente que se ve a través del fondo de la placa, tan pronto como es visible en cualquier punto durante su recorrido a través de la almohadilla o gel o ambos, así como cuando finalmente llega al fondo de la almohadilla o gel, o ambos. K es la fuerza que presiona los fluoróforos/cromóforos hacia abajo a través de la almohadilla. Cuanto menor sea el valor de I., más delgada será la almohadilla absorbente, y menor será la distancia que el fluoróforo/cromóforo tiene que atravesar y cuanto antes se vea J, menor será la C y menor será la H (mancha más pequeña) y más pronto serán detectables los resultados de la prueba. D debe ser soluble al menos en un grado moderado para que esto ocurra.

40 Como se mencionó anteriormente, esta invención se refiere además particularmente a la detección de entidades mediante el uso de un nuevo grupo definido de sustratos de enzimas que se denominarán como sustratos dobles de enzimas. Se caracterizan por su capacidad de expresar actividad enzimática tanto en la producción de un producto coloreado (cromóforo) visible a la luz ambiental como en la producción de un producto fluorescente (fluoróforo) visible bajo radiación UV de onda larga. Estos productos pueden estar presentes de manera simultánea o en intervalos de tiempo separados durante el período de actividad de la enzima. Hasta el presente descubrimiento de esta nueva propiedad de actividad doble, se asumió y aceptó generalmente que los sustratos de enzimas para el diagnóstico pueden producir productos fluorescentes o cromogénicos, o no fluorescentes o no cromogénicos; sin embargo, ninguno se ha descrito como productor de propiedades tanto fluorescentes como cromogénicas, las cuales son útiles en aplicaciones de diagnóstico.

50 Los sustratos dobles de enzima pueden usarse con gran ventaja solos o en combinación con otros sustratos que son exclusivamente de naturaleza fluorescente o cromogénica o no cromogénica.

55 El sustrato de enzimas doble prototípico que participó en el inicio de esta invención es 6-cloro-3-indolil-β-D-galactósido (Red Gal®) que se sintetizó y usó por primera vez, tal como se describió anteriormente en este documento. El hecho de que este y los compuestos relacionados contienen la capacidad doble única no se ha reconocido ni utilizado hasta la llegada de esta invención. Aunque Red Gal® se usará con fines ilustrativos de aplicaciones y usos novedosos en esta discusión, no se pretende limitar el alcance de los compuestos relacionados que comparten esta doble naturaleza.

60 Antes de esta invención, Red Gal® se ha usado ampliamente como un sustrato cromogénico de enzima en medios de diagnóstico para identificar entidades basadas en la producción de un producto insoluble rojo/rosa después la escisión por la enzima galactosidasa. No se tomó nota de alguna posible producción de productos fluorescentes que puedan ser útiles en el proceso de diagnóstico.

Los siguientes son ejemplos del uso de sustratos dobles:

Medio basal

65

Un medio nutritivo que consiste de los siguientes ingredientes:

ES 2 671 353 T3

- a. peptona
 - b. extracto de levadura
 - 5 c. fosfato dipotásico
 - d. cloruro sódico
 - e. inhibidores selectivos (opcional - pueden incluir antibióticos, sales biliares o compuestos relacionados)
 - 10 f. agente gelificante (opcional - puede incluir agar, pectina, alginato u otras gomas)
 - g. agua desionizada o destilada
 - 15 h. material regulador
- Ejemplo 1
- 20 El medio basal + 6-cloro-3-indolil-beta-D-glucurónido (Gluc Rojo);
- a. Medio basal más Gluc Rojo se añade para saturar una almohadilla delgada que cubre la parte inferior de una pequeña placa de Petri;
 - 25 b. Una muestra acuosa que contiene entidades a cuantificar e identificar (en este caso E. coli y otras bacterias coliformes) se filtra a través de un filtro de microporos que después se transfiere (parte superior hacia arriba) para descansar sobre la superficie de la almohadilla fina;
 - c. Esta placa inoculada se incuba después a 35 °C;
 - 30 d. A las 12-14 h de incubación, se debe abrir la placa y colocar el lado abierto de la placa bajo una onda UV larga (3540 Å) en la oscuridad y observar (preferentemente con aumento de 10X);
 - e. Las unidades formadoras de colonias de E. coli brillarán con un color fluorescente azul brillante. Cuando la placa se observa a la luz ambiental (no UV), será probable que no haya colonias visibles aparentes. La observación de la parte inferior del disco bajo luz UV indica que no hay fluorescencia y, por lo tanto, no hay producción de fluoróforos solubles;
 - 35 f. Se vuelve a colocar la tapa y la placa retorna a la incubadora hasta que hayan transcurrido entre 22-26 horas y se repite el proceso de observación. En este momento bajo UV, habrá poca o ninguna fluorescencia observable, pero bajo luz ambiental, las colonias de E. coli (que se mostraron solo como manchas fluorescentes antes) serán visibles como puntos rojos/rosados.
 - 40
- Ejemplo 2
- 45 El medio basal + Gluc Rojo + 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactósido (X-Gal);
- a. El medio basal más Gluc Rojo y X-Gal se agrega para saturar una almohadilla delgada que cubre la parte inferior de una pequeña placa de Petri;
 - b. Una muestra acuosa que contiene entidades a cuantificar e identificar (en este caso E. coli y otras bacterias coliformes) se filtra a través de un filtro de microporos que después se transfiere (parte superior hacia arriba) para descansar sobre la superficie de la almohadilla fina;
 - 50 c. Esta placa inoculada se incuba después a 35 °C;
 - 55 d. A las 12-14 h de incubación, se debe abrir la placa y colocar el lado abierto de la placa bajo una onda UV larga (3540 Å) en la oscuridad y observar (preferentemente con aumento de 10X);
 - e. La placa aparecerá como se describe en la etapa d del Ejemplo 1 anterior;
 - 60 f. Se vuelve a colocar la tapa y la placa retorna a la incubadora hasta que hayan transcurrido entre 22-26 horas y se repite el proceso de observación. En este momento habrá poca o ninguna fluorescencia observable, pero bajo luz ambiental, las colonias de E. coli serán visibles como puntos azul oscuro/púrpura y las otras colonias coliformes serán visibles como puntos verdes (verde azulado).
- 65 Ejemplo 3

ES 2 671 353 T3

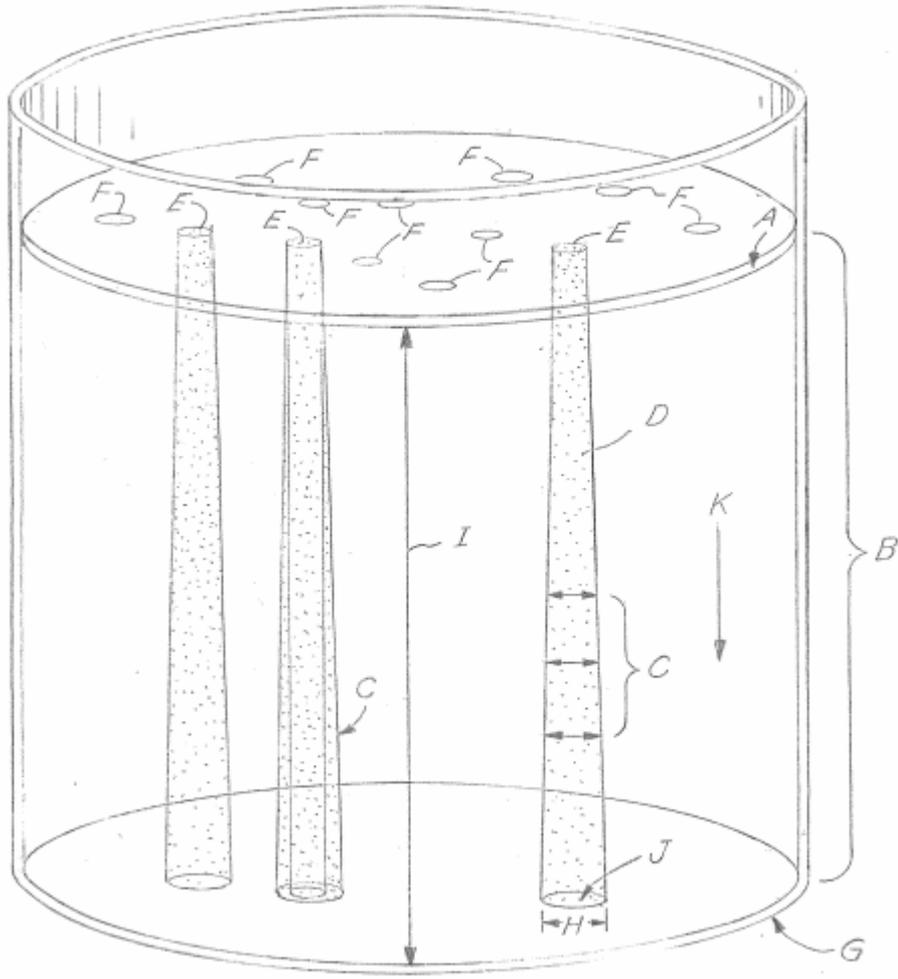
El medio basal + Gluc Rojo + 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactósido (X-Gluc) + Gal Rojo + Gluc MU

- 5 a. El medio basal más Gluc-X y Gal Rojo, y Glu Mu se añade para saturar una almohadilla delgada que cubre la parte inferior de una pequeña placa de Petri;
- 10 b. Una muestra acuosa que contiene entidades a cuantificar e identificar (en este caso E. coli y otras bacterias coliformes) se filtra a través de un filtro de microporos que después se transfiere (parte superior hacia arriba) para descansar sobre la superficie de la almohadilla fina;
- 15 c. Esta placa inoculada se incuba después a 35 °C;
- 20 d. Invierta la placa y colóquela bajo una luz UV. Observará puntos fluorescentes azules brillantes que representan cada unidad formadora de colonias de E. coli. Estas manchas son causadas por el producto soluble de Gluc MU que se ha difundido a través de la almohadilla saturada con el medio;
- 25 e. Ahora gire la placa con el lado derecho hacia arriba, retire la tapa y colóquela debajo de la luz UV. Observará manchas azules fluorescentes que representan la población total de coliformes (que incluyen la E. coli). Esta fluorescencia es una combinación del producto insoluble de Gal Rojo (que afecta a todos los coliformes, que incluyen la E. coli) y el producto soluble de Gluc MU (que afecta solo la E. coli). Las propias colonias pueden o no ser visibles, lo más probable es que las colonias de E. coli puedan mostrarse como puntos muy pequeños, de color azul pálido, con los otros coliformes aún no visibles;
- 30 f. Se vuelve a colocar la tapa y la placa se retorna para incubar hasta que transcurran un total de 22-26 horas y la placa se vuelve a examinar. En este momento, las manchas fluorescentes en la parte inferior de la placa (que representan las colonias de E. coli) serán considerablemente más grandes y pueden superponerse entre sí, dependiendo de qué tan próximas estén las colonias una de la otra. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la fluorescencia persiste;
- 35 g. Al girar la placa con el lado derecho hacia arriba y examinar, se observará que debajo de la UV, las colonias coliformes que no E. coli anteriormente fluorescentes han perdido su fluorescencia, pero las E. coli retienen la fluorescencia y se han diseminado significativamente. Además, en la luz ambiental de la sala, las colonias coliformes no E. coli son ahora visibles como puntos rojos/rosados, mientras que las colonias de E. coli son de color azul oscuro/púrpura;
- 40 Existe una diferencia fundamental en la expresión y la existencia entre los fluoróforos solubles y los compuestos fluorogénicos estándar y los fluoróforos insolubles de los compuestos fluorogénicos de enzima doble. Los fluoróforos solubles, después de la formación, persisten en el ambiente y continúan difundiéndose o extendiéndose a través del área de prueba circundante desde el punto de origen. No permanecen confinados dentro de la entidad en la que se produjeron. Los fluoróforos insolubles, después de la formación, existen o persisten solo mientras no se complementen entre sí o con cualquier otra entidad química; generalmente, un período no mayor de 24 horas, y no se difunde desde su punto de origen. Ellos permanecen confinados dentro de la entidad donde se producen.
- 45 Los sustratos dobles de enzimas son miembros del sustrato de enzimas basado en Indolilo cromogénico. Sus características funcionales no están limitadas a este grupo específico de compuestos. El sustrato de enzimas doble prototípico usado en los ejemplos mencionados anteriormente fue 6-cloro-3-indolil-beta-D-galactósido y se descubrió que la fluorescencia insoluble se debía a la cadena lateral en el indolilo en la posición #6. Así puede usarse cualquier halógeno (flúor, cloro, bromo, yodo). Por lo tanto, puede sintetizarse una amplia gama de sustratos con una doble capacidad enzimática.
- 50 La invención no se limita a los detalles dados anteriormente, sino que se puede modificar de acuerdo con las siguientes reivindicaciones.

Reivindicaciones

1. Un método para detectar organismos objetivo específicos que comprende las etapas:
 - a) obtener una muestra que contiene dichos organismos objetivo específicos;
 - b) añadir un material de diagnóstico con sustratos fluorogénicos y cromogénicos de enzimas a un medio y a una almohadilla absorbente que puede absorber dicho medio en donde dicha almohadilla absorbente sirve como una base;
 - c) poner en contacto dicha muestra con dicho material en un lado de dicha almohadilla absorbente para originar una reacción enzimática después de la incubación mediante la cual se produce una enzima por organismos objetivos si dichos organismos objetivo están presentes y que convierte dichos sustratos de enzimas, algunos productos derivados de dicha reacción enzimática siendo visibles y al menos uno de dichos productos es difusible en agua; y
 - d) visualizar dicho lado y el lado opuesto de dicha almohadilla absorbente y detectar cualquier apariencia de producto fluorescente que represente dichos organismos objetivo específicos y cualquier apariencia cromogénica que represente dichos organismos objetivo específicos, mientras que dichos organismos se ponen en contacto con dicho material de diagnóstico.
2. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque la luz UV se usa para detectar dicha apariencia de producto fluorescente y la luz visible se usa para detectar dicha apariencia cromogénica.
3. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque dicho material incluye al menos uno de un fluorógeno basado en cumarina, un fluorógeno basado en naftilo, un fluorógeno basado en fluorosceína, un sustrato basado en nitrofenilo o un fluorógeno basado en metilumbeliferilo.
4. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque dicho organismo objetivo incluye microorganismos.
5. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque la muestra se pasa primero a través de una membrana y dichos organismos objetivo se retienen en un lado de una membrana, un lado opuesto de dicha membrana que se pone en contacto con dicha base.
6. El método de la reivindicación 1 caracterizado porque, al ver dicho lado y el lado opuesto de dicha almohadilla absorbente, los productos solubles e insolubles se visualizan desde diferentes lados de la almohadilla absorbente.

Figura 1



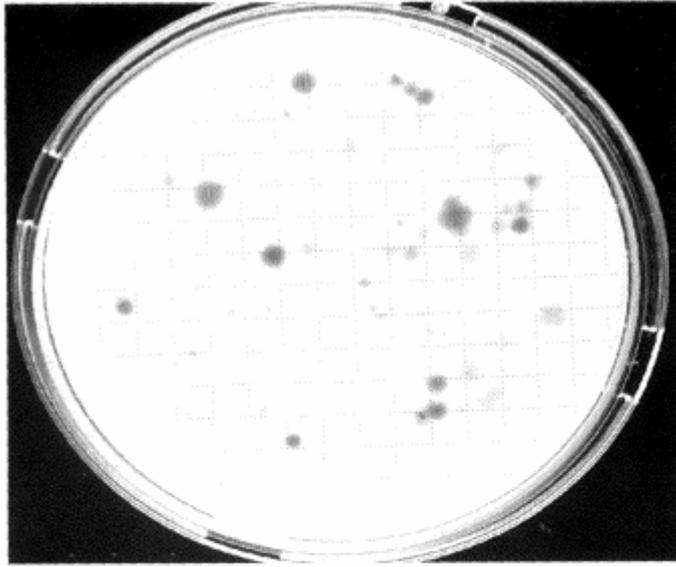


Foto 1

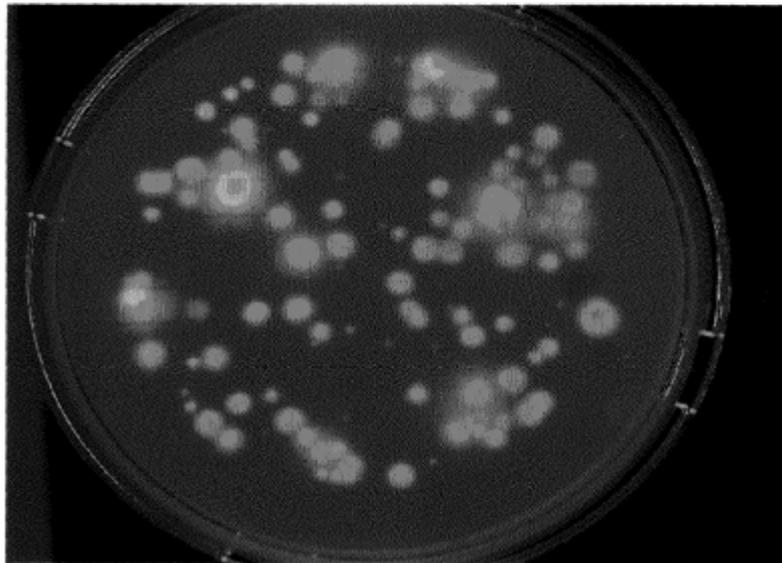


Foto 2

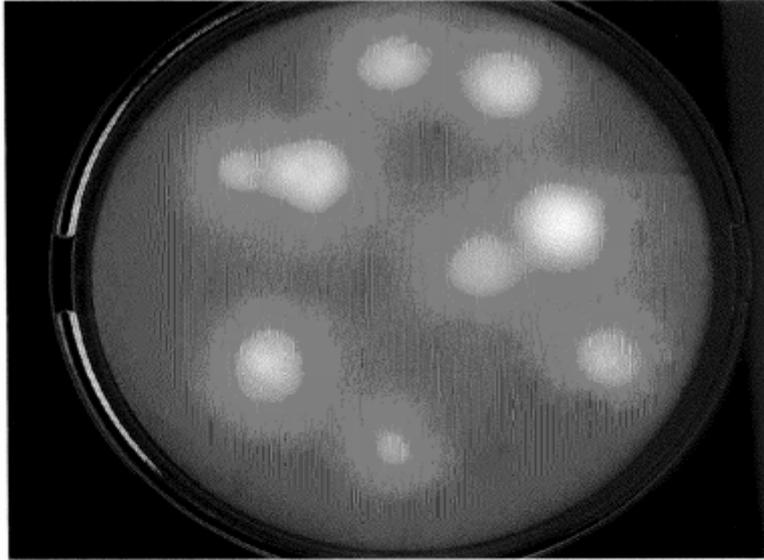


Foto 3

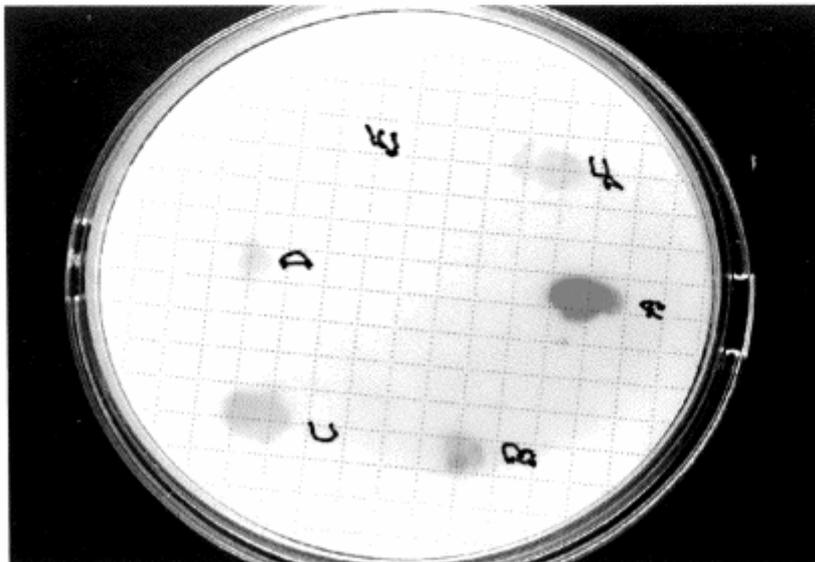


Foto 4

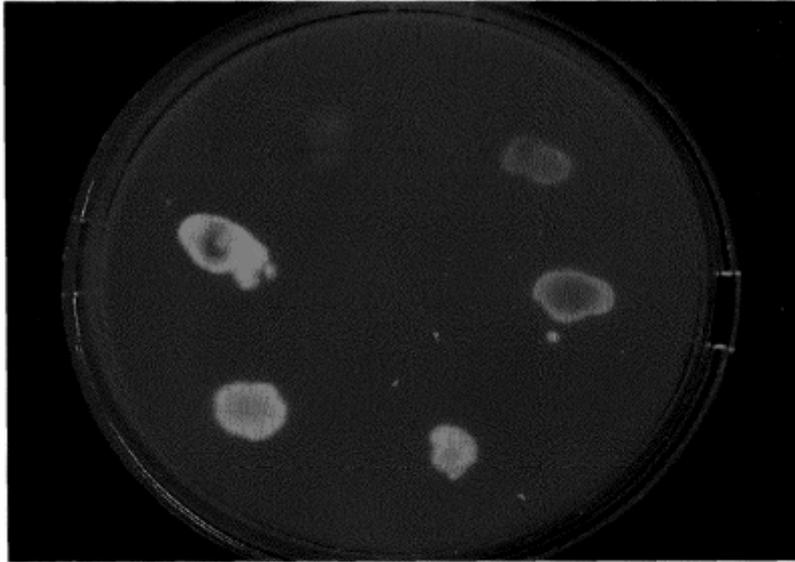


Foto 5

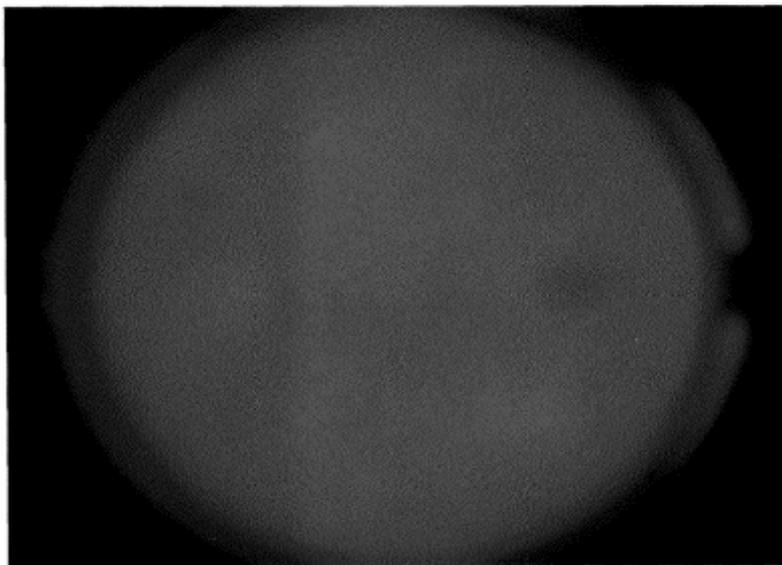


Foto 6

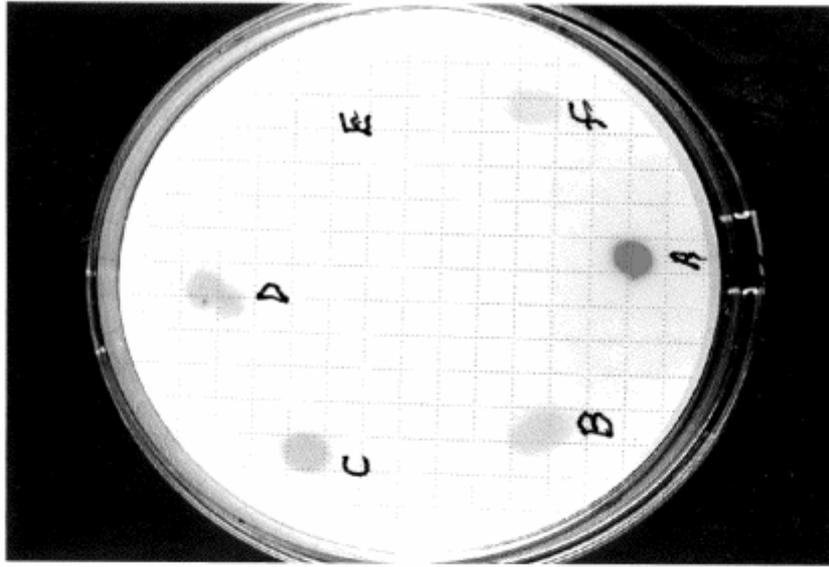


Foto 7

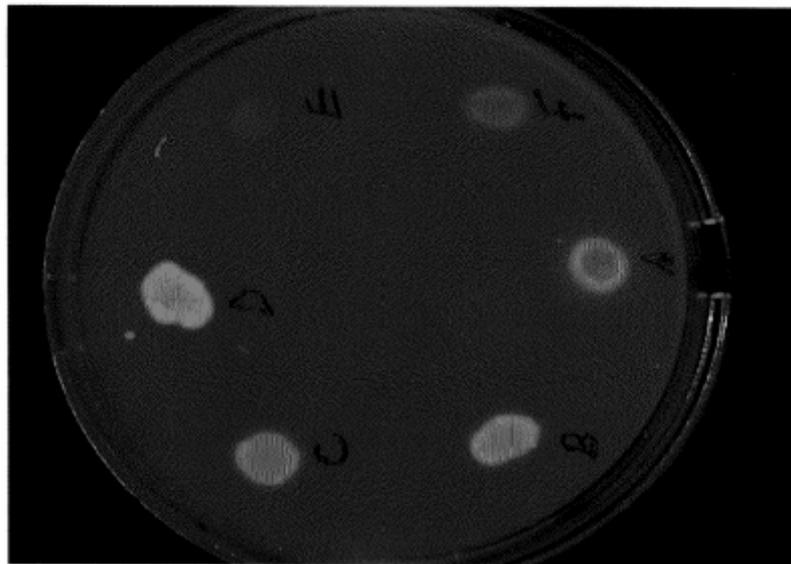


Foto 8

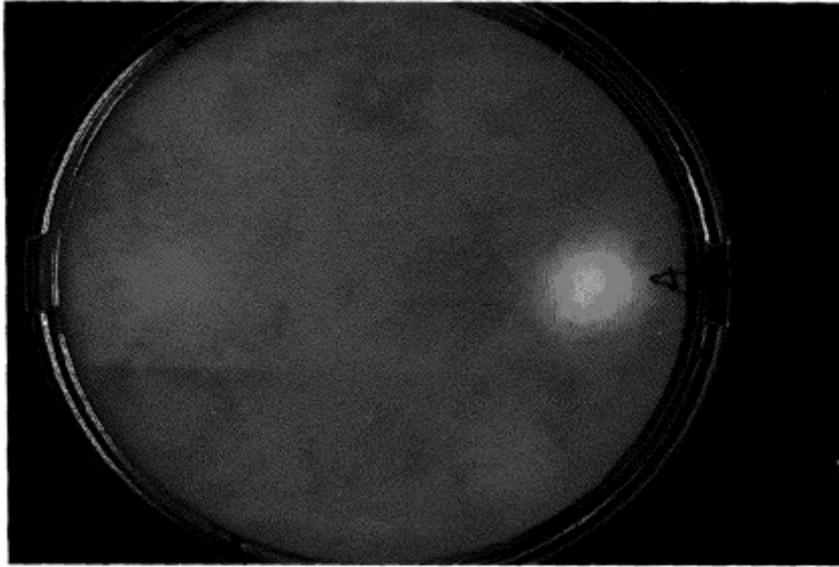


Foto 9