

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



(10) ES (11) (12)	NUMERO 283487	(18) Y
	FECHA DE PRESENTACION 13.12.83/3.	

MODELO DE UTILIDAD

16 JUN. 1985

(30) PRIORIDADES:		
(31) NUMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
8235550	14.12.82	GRAN BRETAÑA.....

(43) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL
	C12 Q 1/00

(64) TITULO DE LA INVENCION
SONDA PARA PRUEBA DE DIAGNOSTICO.

(71) SOLICITANTE (S)
OXOID LIMITED

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Wade Road, Basingstoke, HAMPSHIRE, RG24 OPW, GRAN BRETAÑA.-

(72) INVENTOR (ES)
DERWENT SWAINE, de nacionalidad británica.

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE
DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU.

RESUMEN DESCRIPTIVO

Una sonda de diagnóstico para comprobar la presencia de una enzima en una muestra incluye un mango y una punta, la cual tiene una forma tal que pueda ser aplicada a la muestra y que lleva un agente reactivo destinado a reaccionar con la enzima, generando así una señal de color. La sonda puede ser una varilla o un palillo de papel enrollado o de materia plástica con poros abiertos. La muestra puede ser una colonia bacteriana que crece en un gel nutritivo. La realización de la prueba requiere unos segundos, como máximo unos minutos, y no requiere incubación.

DESCRIPCION GENERAL DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a sondas de prueba para diagnóstico destinadas a comprobar la presencia de enzimas.

En los laboratorios de microbiología, una técnica de diagnóstico corriente consiste en disponer un agente reactivo químico elegido en un porta objeto de microscopio, transferir al porta objeto una muestra de la cual se piensa que contiene un microorganismo, incubar la mezcla de muestra-agente reactivo, y observar si se produce una reacción química. Es posible utilizar un anillo de platino para transferir la muestra al porta objeto y mezclarla con el agente reactivo.

Aunque ampliamente utilizada, esta técnica de diagnóstico es algo fastidiosa, y también potencialmente peligrosa

cuando estan implicadas bacterias patógenas. Una técnica más sencilla y más segura sería bien recibida por los laboratorios de microbiología.

5 En las memorias de las patentes Britanicas n^os.
779514, 1082459, 11365001 y 1406180 se describen sondas para pruebas bacterianas. Estas sondas llevan un medio nutritivo y eventualmente también un agente reactivo de cambio de color. Estan destinadas a ser puestas en contacto con una muestra que contiene posiblemente bacterias y a continuación se incuban hasta que las bacterias puedan ser observadas e identificadas. Una prueba de este tipo requiere horas, o más generalmente días. Por el contrario, la sonda de la presente invención es útil cuando las bacterias han sido incubadas ya, y la identificación de las enzimas se efectua en cuestión de segundos o minutos.

10

15

En las memorias de patente de Gran Bretaña n^o. 1246080 y 1361577 se describe una prueba de nitrito que implica la utilización de un tira de diagnóstico que soporta varios agentes reactivos. Un cultivo bacteriano se pone en suspensión en un tubo de solución salina, y la tira se sumerge en el tubo. La utilización de un tubo que contiene una solución salina es fastidiosa cuando es preciso realizar numerosas pruebas, y la solución salina diluye la muestra, haciendo así que la prueba sea menos sensible. Además, la prueba no es una prueba para enzimas sino para un producto inorgánico

20

25

1 específico de metabolismo bacteriano.

En las pruebas para enzimas de la técnica anterior se ha utilizado agentes reactivos líquidos que habían sido almacenados a granel o que habían sido preparados recientemente. Una técnica implica la aplicación de una gota del agente reactivo a la colonia bacteriana que crece en un gel nutritivo para observar un eventual cambio de color; sin embargo, esto acarrea la destrucción de la colonia. En otra técnica, se impregna un trozo de papel con el agente reactivo y se aplica a la zona impregnada una muestra de la colonia; esta técnica es sucia y puede dar lugar, cuando se rasca el papel, a la formación de un aerosol de bacterias, posiblemente patógenas. Una tercera técnica consiste en suspender un anillo de la colonia en un tubo que contiene un medio nutritivo y un agente reactivo de color; sin embargo este procedimiento es también lento y fastidioso. Otra técnica más consiste en impregnar un disco de papel con el agente reactivo y presionar el disco brevemente sobre la colonia que crece en un gel nutritivo; sin embargo, esto da lugar a la destrucción de la colonia; por otra parte el agente reactivo entra inevitablemente en contacto con el medio nutritivo, y a menudo se ha comprobado que esto afecta la prueba de diagnóstico.

25 La presente invención proporciona una sonda de prueba para diagnóstico, que permite comprobar la presencia

1 de una enzima en una muestra, incluyendo la sonda un
mango y una punta la cual tiene una forma tal que pueda
ser aplicada a la muestra y que lleva un agente reactivo
destinado a reaccionar con la enzima, generando así una
5 señal que indica la presencia de la enzima en la muestra.

Para comprobar la presencia de una enzima en una
muestra mediante la utilización de una sonda de prueba
para diagnóstico del tipo definido más arriba, será necesá-
rio aplicar a la muestra la punta de la sonda que lleva
10 el agente reactivo, permitir que la reacción se efectúe
entre el agente reactivo y la enzima, y observar la señal
indicativa de la presencia de la enzima en la muestra. Un
ejemplo de una sonda de prueba para diagnóstico de acuerdo
con la invención es un palillo de material poroso inerte
15 del cual una extremidad ha sido inmersa en una solución de
un agente reactivo deseado para depositar sobre ella (o en
ella) una cierta cantidad del agente reactivo.

La sonda presenta un mango que está destinado a per-
mitir la manipulación de la sonda, y cuya forma y cuyo ta-
20 maño no son críticos. Cuando la sonda es un palillo, una
extremidad del palillo puede constituir el mango y la otra
extremidad puede constituir la punta. Se hará referencia al
dibujo adjunto que representa una vista en perspectiva de
una sonda de prueba para diagnóstico de acuerdo con la inven-
25 ción que está constituida por un palillo de papel enrolla-

1 do sobre si mismo de 60 mm. de largo, y que incluye una
parte de mango 10 y una punta 12 que ha sido inmersa en
un agente reactivo.

5 La punta de la sonda deberá preferentemente ser
suficientemente larga para que cualquier señal generada
en ella pueda ser observada clara y rápidamente; por otra
parte deberá ser suficientemente pequeña para que pueda
situarse y aplicarse con precisión en una muestra de tamaño
10 reducido, por ejemplo una colonia bacteriana pequeña
en una placa de gel de agar. La punta tendrá generalmente
un diámetro de algunos milímetros, por ejemplo 0,5 a 10 mm,
aunque no es necesario, desde luego, que su sección trans-
versal sea circular.

15 Es preferible, aunque no absolutamente necesario,
que la sonda se soporte por si sola y que sea substancial-
mente rígida durante su utilización. Esta preferencia es
particularmente importante cuando la punta de la sonda está
destinada a ser aplicada contra un gel o contra una muestra
sólida, ya que en este caso una sonda blanda, tal como una
20 hoja de papel, no sería apropiada.

La muestra es preferentemente una colonia bacte-
riana, preferentemente una colonia que ha crecido en un gel
nutritivo, tal como un gel de agar. En una colonia de este
tipo, las enzimas producidas por las bacterias están presen-
25 tes en forma concentrada y fácilmente detectable. La sonda

1 para prueba según la invención puede aplicarse a la colonia
sin destruirla totalmente, y sin tocar el gel nutritivo
en el cual está creciendo. Por tanto, la prueba de diagnósti-
co no está afectada por el gel nutritivo; y si el resultado
5 de la prueba es interesante, la colonia permanece intacta
para su identificación ulterior.

El agente reactivo situado sobre (o en el inte-
rior de) la punta de la sonda se elige para que reaccione
con la enzima cuya presencia se sospecha en la muestra.
10 para generar una señal observable. Una señal conveniente es
un cambio de color. Se conocen y se utilizan en diagnósticos
microbiológicos numerosas reacciones de cambio de color.
véase por ejemplo "Biochemical Test for Identification of
Medical Bacteria" por J.F. McFadden, publicado por Williams
15 and Wilkins, U.S.A. Cuando la presencia de la enzima ha de
ser señalizada por un cambio de color, la punta de la sonda
tendrá preferentemente un color, por ejemplo blanco, que per-
mita observar fácilmente este cambio.

20 Estos cambios de color se producen rápidamente,
por ejemplo en pocos segundos o como máximo en cuestión
de minutos. La incubación de las bacterias en contacto con
la sonda no es necesario, y por tanto el agente reactivo
no incluye un medio nutritivo bacteriano.

25 La reacción de la enzima puede ser producida de
diferentes maneras. Por ejemplo, la reacción puede hacerse

1 con un agente reactivo elegido de modo que proporcione
directamente un producto coloreado. En variante, el agente
reactivo puede ser una mezcla de substancias, en la cual
la reacción de una de ellas puede generar un cambio de
5 color en otra. En efecto, en el ejemplo 3 que sigue, la
reacción de la ureasa sobre la urea genera amoníaco que
eleva el pH y hace pasar el rojo de fenol de amarillo a
rojo.

La punta de la sonda es preferentemente, aunque
10 no necesariamente, porosa o absorbente. Los poros de tamaño
capilar permiten que una punta de pequeñas dimensiones...
absorbe una gran cantidad de agente reactivo, o más adelan-
te, de muestra. Sin embargo, también es necesario, aunque
la punta sea transparente o translúcida a la señal emitida
15 que una proporción substancial del agente reactivo, y más
adelante de la muestra, este presente en la superficie de
la punta en lugar de estar en el interior de ella. Teniendo
en cuenta la naturaleza hidrófila/hidrofoba y las propieda-
des de mojado del material con el cual está hecha la punta
20 de la sonda, es posible, mediante experimentación, encontrar
la porosidad óptima para cada aplicación.

La punta ha de ser inerte para el agente reactivo
y para cualquier agente químico presente en la muestra. Los
materiales apropiados incluyen materias plásticas, particular-
25 mente las que tienen poros abiertos, productos a base de

1 celulosa tales como papel o cartón enrollado, y productos
a base de fibras aglomeradas como el fieltro.

Las sondas para pruebas de diagnóstico a las
cuales se refiere la invención son productos económicos que
5 se desechan después de una sola utilización. Unos productos
económicos apropiados son palillos de papel enrollado como
los que se utilizan para dulces en palillo, y varillas de
materias plásticas porosas tales como polietileno o polipropi-
10 pileno. Las varillas de polietileno y de polipropileno poroso
con un tamaño medio de poros de 10 a 250 micrones pueden ob-
tenerse en el comercio. Un agente reactivo deseado puede
aplicarse a las extremidades de estos palillos o de estas
15 varillas sumergiéndolas manualmente o con métodos más perfec-
cionados. Las sondas se suministran preferentemente en forma
estéril, y pueden estar envueltas individualmente o empaque-
tadas.

Los ejemplos que siguen ilustran la invención. En
cada uno de los ejemplos 1 a 3, la sonda era una varilla de
20 polietileno poroso de aproximadamente 7 cm de largo y 4 mm.
de diámetro. En los ejemplos 4 y 5 se han utilizado palillos
de papel enrollado (palillos para dulces).

EJEMPLO 1

25 Se realizó una sonda sumergiendo una extremidad
de una de estas varillas en una solución de 1 mg de Nitro-
cefina en 2 ml. de etanol, y dejando secar. La extremidad

1 de la sonda se aplicó a una colonia de una cepa bac-
teriana resistente a la penicilina creciendo en gel de agar.
La beta-lactamasa, formada por las bacterias, reaccionó
con la nitrocefina e hizo que la punta de la sonda pase
5 de amarillo pálido a rojo brillante. Este cambio necesitó
unos pocos segundos. Por consiguiente, la sonda era conve-
niente para comprobar la presencia de beta-lactamasa en
una muestra.

10 La nitrocefina es una cefaloesporina cromogénica
desarrollada por Glaxo Research Limited, (codificada 87/312;
ácido 3-(2,4 dinitrostiril-(6R, 7R)-7B (2-tienilacetamido)
-cef-3em-4-carboxílico, isomero E).

EJEMPLO 2

15 Se preparó una sonda sumergiendo una extremidad
de una varilla en un agente reactivo a base de agua inclu-
yendo m-dimetil-p-fenilenodiamina, oxalato, ácido ascorbi-
co y alfa-naftol. La sonda resultante era apropiada para
comprobar la presencia de oxidasa de citocromo, en la pre-
sencia del cual la punta pasó de incolora a rojo oscuro/negro.

EJEMPLO 3

20 Se preparó una sonda sumergiendo una extremidad
de una varilla en un medio acuoso conteniendo extracto de
levadura, una solución tampón de fosfato, urea y rojo de
fenol. La sonda resultante era apropiada para comprobar
25 la presencia de ureasa, en la presencia de la cual la punta

1 pasa de amarillo a rojo.

EJEMPLO 4

5 Se preparó una sonda sumergiendo una extremidad de un palillo en un agente reactivo a base de agua incluyendo L-fenilalanina y cloruro férrico. La sonda resultante era conveniente para comprobar la presencia de enzima de deaminasa de fenilalanina, en la presencia de la cual la punta pasa de incolora a verde.

EJEMPLO 5

10 Se preparó una sonda sumergiendo una extremidad de un palillo en un agente reactivo a base de agua conteniendo ornitina, 0,004 ml de una solución tampón de citrato de ácido de potasio, fosfato de piridoxal, y rojo de bromofurool. La sonda resultante era apropiada para comprobar la presencia de decarboxilasa de ornitina, en la presencia de la cual la punta pasa de amarillo a rosa-rojo.

15 En resumen, el presente Modelo de Utilidad que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

20 1.- Sonda para prueba de diagnóstico que estando destinada a servir de medio para comprobar la presencia de una enzima en una muestra, caracterizado porque está constituida por un cuerpo alargado de escaso grosor en el que se define un mango de asido y una punta de configuración adecuada para su fácil aplicación a la muestra, incorporando dicha punta,

25

1 un agente reactivo susceptible de reaccionar con la en-
zima, en orden a generar una señal de cambio de color que
dica la presencia de la enzima en la muestra.

5 2. Sonda para prueba de diagnóstico, según la
reivindicación 1, caracterizada porque tiene la forma de un
palillo de material a base de celulosa que lleva el agente
reactivo en una extremidad.

10 3. Sonda para prueba de diagnóstico, según la
reivindicación 2, caracterizada porque el palillo es un
palillo de papel enrollado sobre sí mismo.

4. Sonda para prueba de diagnóstico, según la rei-
vindicación 1, caracterizada porque tiene la forma de una
varilla de materia plástica sintética porosa que lleva el
agente reactivo en una extremidad.

15 5. Sonda para prueba de diagnóstico, según una
cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque
la sonda se soporta por sí misma y es substancialmente
rígida durante su utilización.

20 6. Sonda para prueba de diagnóstico, según una
cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque
la punta tiene un diámetro de 0,5 mm a 10 mm.

7. Se reivindica por último como objeto sobre el
que ha de recaer el modelo de utilidad que se solicita: SONDA
PARA PRUEBAS DE DIAGNOSTICO.

1 Todo conforme queda descrito y reivindicado en
la presente memoria descriptiva que consta de trece páginas
mecanografiadas y dibujos adjuntos.

Madrid, 13 Diciembre 1.983

BERNARDO UNGRIA

P.P.



A handwritten signature in dark ink, appearing to be 'Bernardo Ungria', written over a horizontal line. The signature is stylized and cursive.

5

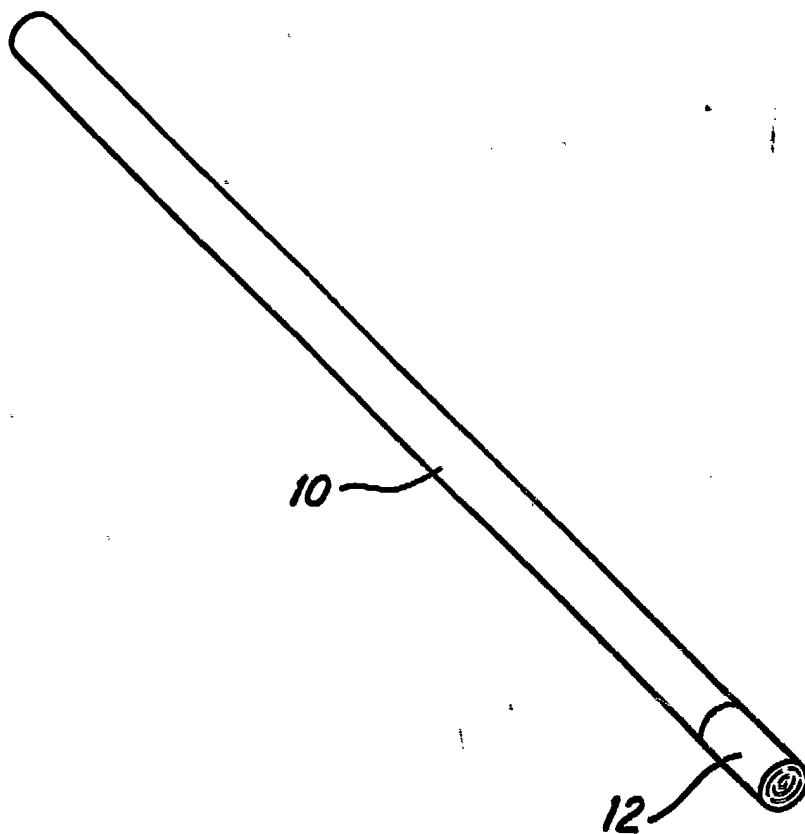
10

15

20

25

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....



ESCALA VARIABLE
Madrid, 13 Diciembre 1983
BERNARDO UNGRIA
P.P.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Bernardo Ungria', written over a large, irregular scribble.