



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 298 292**

⑤1 Int. Cl.:

C12Q 1/06 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

G01N 21/00 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **01993670 .7**

⑧6 Fecha de presentación : **08.11.2001**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1337658**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **27.08.2003**

⑤4 Título: **Procedimiento de detección de microorganismos viables.**

③0 Prioridad: **09.11.2000 IL 139593**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2008

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2008

⑦3 Titular/es: **Biogem Optical Ltd.**
P.O. Box 50207, Textile Center
2, Kafman Street
Tel Aviv 68012, IL

⑦2 Inventor/es: **Shaw, Erich y**
Robin, Jean Claude

⑦4 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Procedimiento de detección de microorganismos viables.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento y composiciones para la detección y enumeración rápida de baja concentración de microorganismos viables usando sustancias orgánicas o inorgánicas que están ocluidas en un vidrio de sol-gel poroso.

10 **Antecedentes de la invención**

Un objetivo principal de la investigación de la detección de microorganismos es desarrollar detectores baratos, rápidos, fiables y sensibles. Actualmente se encuentran disponibles procedimientos de laboratorio convencionales para la detección de microorganismos. La inmensa mayoría de procedimientos se basan en el uso de medios de agar sobre los cuales se desarrollan microorganismos específicos a la largo de un período de tiempo. El período de incubación normal está comprendido entre 24 a 48 horas. Después que el microorganismo multiplica su presencia puede ser identificado y cuantificado.

El principal inconveniente de los ensayos existentes es el tiempo requerido para la obtención de sus resultados. La contaminación bacteriana en los manantiales de agua da como resultado el cierre de manantiales y sistemas de agua y requiere el uso de alternativas de suministro de agua más costosas. Es necesaria la detección rápida de microorganismos con el fin de permitir períodos de parada más cortos. En el sector médico, se requieren ensayos de identificación bacteriana y de sensibilidad a antibióticos en cualquier situación médica en la cual han a ser administrados antibióticos. El tiempo requerido para la obtención de los resultados del ensayo está comprendido entre 72 a 96 horas. La reducción de este período de tiempo producirá mejores resultados y una más rápida recuperación del paciente. En la industria alimenticia y de bebidas, las materias primas y los productos manufacturados se inspeccionan de manera rutinaria para determinación de la contaminación bacteriana. El período de incubación requerido para los resultados del ensayo no permite el tratamiento inmediato del procedimiento y ocasiona retrasos tanto en la fabricación como en el suministro de los productos. La reducción del período de tiempo de retención puede dar como resultado ahorros en infraestructura y mano de obra.

En los últimos años, se han desarrollado varios procedimientos con el fin de identificar y enumerar bacterias en 1,5 hasta 11,0 horas. Los procedimientos que son relativamente simples requieren una gran cantidad de bacterias (por encima de 10^4 en 1 ml de muestra), en tanto que los procedimientos que pueden detectar números pequeños de bacterias son costosos y no pueden usarse como sistemas de gran escala.

La patente de EE.UU. 5.811.251 describe un sistema para el recuento del número de microorganismos viables en base a un sistema CCD. Sin embargo, este sistema no puede diferenciar entre diferentes tipos de bacterias y proporciona únicamente un número total de bacterias. Las patentes de EE.UU. 5.972.641 y EE.UU. 5.518.894 describen unos sistemas de detección de coliformes rápidos que usan unos procedimientos estadísticos para la determinación del número de bacterias. Dichos procedimientos requieren hasta 11 horas para la obtención de resultados en un número bajo de bacterias. Otras patentes describen un procedimiento para la detección de microorganismos que usan fluorescencia y fuente de luz láser (patentes de EE.UU. 5.891.394, EE.UU. 5.858.697, EE.UU. 5.763.203, EE.UU. 5.751.839 y EE.UU. 5.663.057). Las desventajas de dichos procedimientos es el uso de una fuente de luz láser costosa y la detección de microorganismos directamente a partir del filtro el cual no es liso y causa problemas durante el análisis. Además, estos sistemas no son portátiles y son relativamente costosos.

Igualmente, se han usado procedimientos de inmunoensayo para la detección de ciertos tipos de microorganismos (Lee y otros, *App. Environ. Microbiol.*, vol. 56, págs. 1541-1546). En estos procedimientos, se usan anticuerpos específicos marcados con un colorante fluorescente o radiactivo para detectar los microorganismos. Sin embargo, los inmunoensayos son limitados dado que requieren la producción de anticuerpos contra cada microorganismo de interés, lo cual consume tiempo y es costoso.

“Sol-gel” es el término usado para indicar vidrio inorgánico fabricado a temperaturas ambiente basado en óxidos de metal. Un cierto procedimiento que implica materiales cerámicos en los cuales la fase sol (solución) se transforma en una fase gel a través de hidrólisis, condensación y polimerización. Los materiales de partida comunes para la preparación sol-gel son ormosilos u óxidos de metales. En los últimos años se ha aplicado el sol-gel a organosilanos para crear “vidrio a temperatura ambiente”. Los materiales de tipo sol-gel comprenden poros que varían desde decenas de angstroms hasta decenas de nanómetros, y muestran unas grandes relaciones de área a masa, por ejemplo, de cientos de metros cuadrados por gramo. Los materiales sol-gel son transparentes incluso a longitudes de onda UV, y son sencillos de preparar en diferentes formas, tales como polvos, bloques monolíticos, hojas delgadas, fibras, etc.

El uso de materiales a base de sol-gel para ocluir diversas moléculas orgánicas en un medio matriz ha sido descrita en la técnica (Avnir y otros, *Supramolecular architecture in two and three dimensions*, Bein T. (ed.), American Chemical Society Symposium Series XXX, 1992). Usando dicha tecnología, las moléculas orgánicas son ocluidas a temperaturas ambientes dentro de la matriz sol-gel sin deteriorar la estructura de la molécula orgánica relativamen-

te sensible. Además, la molécula ocluida retiene casi todas las características físicas y químicas originales, y está disponible para reactivos exteriores como un resultado del sistema de poros masivo dentro del sol-gel.

La patente de EE.UU. número 6.022.748 describe un procedimiento para la detección directa de analitos que usan cambios de color en respuesta a la unión selectiva de los analitos a una superficie. Dicha detección se produce en material biopolímero inmovilizado encapsulado dentro de un vidrio de óxido de metal que usa el procedimiento sol-gel. Las desventajas de este procedimiento son que únicamente pueden detectarse o contarse grandes cantidades de bacterias, dado que únicamente los altos recuentos son capaces de causar un cambio de color visible en el sol-gel. Además, este procedimiento no puede diferenciar entre microorganismos viables y no viables, dado que se basa en la unión de los microorganismos a la superficie sol-gel, independientemente de si dichos microorganismos son viables o no.

Armon y otros (*J. of Biotechnology*, vol.51, págs. 279-285) describe un procedimiento para la detección de grandes cantidades de bacterias de *E. coli* esparciéndolas sobre gel-sol dopado con compuestos específicos, fijándose dichos compuestos dentro de las bacterias, lo que consecuentemente causa que las bacterias resplandezcan a longitudes de onda específicas. Sin embargo, este procedimiento no proporciona un procedimiento adecuado para el recuento de bacterias presentes en una muestra dada. Además, no es posible la detección de un número bajo de microorganismos usando dicho procedimiento.

La técnica no ha conseguido hasta ahora proporcionar un procedimiento rápido para el recuento de microorganismos, que sea suficientemente sensible como para proporcionar un recuento fiable a bajas concentraciones de microorganismos.

Es un fin de esta invención el proporcionar un procedimiento rápido y sensible para la detección de microorganismos viables.

Es otro objeto de la invención el proporcionar un procedimiento y composiciones útiles para proporcionar una enumeración de microorganismos encontrados en muestras de bajo recuento.

Es un fin de esta invención el proporcionar un procedimiento rápido y sensible para la detección de microorganismos viables.

Es otro objeto de la invención el proporcionar un procedimiento y composiciones útiles para proporcionar una enumeración de microorganismos encontrados en muestras de bajo recuento.

Otros objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción que sigue.

Sumario de la invención

De manera sorprendente, se ha encontrado ahora, y este es un objeto de la presente invención, que se pueden detectar y enumerar microorganismos viables a una concentración inferior a 10^3 ml^{-1} en un período de 2 horas, usando sustancias orgánicas o inorgánicas que están ocluidas en vidrio sol-gel poroso (denominadas aquí en adelante como "marcadores", por motivos de brevedad).

La presente invención se refiere a procedimientos para la detección y enumeración de microorganismos viables usando sustancias orgánicas o inorgánicas que están incorporadas en vidrio sol-gel poroso (marcadores). Los microorganismos metabolizan dichos marcadores y, de esta forma, emiten radiación, electromagnetismo o fluorescencia detectable. Con ello, se obtiene una visualización rápida de microorganismos viables sobre el vidrio sol-gel. La superficie sol-gel es extremadamente lisa y transparente y permite un punto focal casi uniforme para el barrido microscópico de alta resolución.

De acuerdo con la invención, la etapas se llevan a cabo de acuerdo con la reivindicación 1.

Las bacterias coliformes que pueden detectarse de acuerdo con la presente invención son realmente un amplio grupo de bacterias que incluyen *E. coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, y *Citrobacter spp.* Las bacterias coliformes se identifican mediante la actividad de una enzima, β -galactosidasa E.C.3.2.1.23), usando las sustancias fluorógenas o cromógenas 3-carboxiumbeliferil β -D-galactopiranosido (CUG) o 4-clorometil-6,8-difluoroumbeliferil β -D-galactopiranosido (CMDi FUG).

De acuerdo con la presente invención, los *E. coli* se identifican mediante la detección de la actividad de una enzima específica de *E. coli*, β -glucuronidasa (GUS o EC 3.2.1.31), usando las siguientes sustancias fluorógenas o cromógenas: 4-metilumbeliferil β -D-galactopiranosido (MUG), fluoresceína di β -D-galactopiranosido (FDG), sal de litio de 6,8-difluoro-4-metilumbeliferil β -D-glucuronido (DiFMUGGlcU), 2-dodecilresorufina, Elf-97, fluoresceína di β -glucuronido (FDGlcU), 5-(pentafluorobenzoilamino) fluoresceína di β -glucuronido (PFB-FDGlcU) y β -trifluorometilumbeliferil β -D-glucuronido.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, se incorpora un material antibiótico dentro de la mezcla sol-gel para la identificación de la resistencia antibiótica bacteriana. Puede apreciarse que la emisión de fluorescen-

cia a partir de bacterias a pesar de la presencia de un antibiótico específico, indica que dicha bacteria es resistente al antibiótico. Puede indicarse una resistencia parcial cuando la presencia del antibiótico específico conduce a una reducción parcial en el número de bacterias fluorescentes. Los antibióticos siguientes se agregan a la mezcla sol-gel: Cloranfenicol, Eritromicina, Tetraciclina, Estreptomicina, Polimixina, Acido Nalidíxico, Novobiocina, Trimetoprina, Rifanapicina y Penicilina.

De acuerdo con la presente invención, es posible proporcionar los marcadores como liposomas; películas; multicapas; formas de tipo trenza, lamelar, espiral, tubular y de fibra; varillas solvatadas; anillos solvatados; y combinaciones de las mismas. De acuerdo con la presente invención es posible, igualmente, detectar microorganismos dañados o estresados mediante la incorporación de piruvato o K_2SO_4 dentro del sol-gel. Es sabido en la técnica que puede usarse piruvato o K_2SO_4 para revivir o mejorar bacterias coliformes dañadas cloradas (*Enumeration and differentiation of chlorine-stressed total coliform bacteria*, Robert A. Duncanson - Ph.D. dissertation - University of Rhode Island, 1993).

De acuerdo con la presente invención es posible agregar polilisina o sustancias similares a una concentración de entre 10 hasta 100 partes por millón a la solución sol-gel para permitir la potenciación de la absorción de bacterias.

Todas las anteriores y otras características y ventajas de la invención se comprenderán con más detalle a partir de los ejemplos ilustrativos y no limitativos siguientes de realizaciones preferidas de los mismos.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra un sistema para la identificación y enumeración de microorganismos, de acuerdo con una realización preferida de la invención;

la Figura 2 es una imagen de fluorescencia de bacterias de *E. coli* sobre una superficie sol-gel con una ampliación X400; y

la Figura 3 es un diagrama de flujo de un procedimiento de acuerdo con una realización preferida de la invención.

Descripción detallada de realizaciones preferidas

De acuerdo con una realización preferida, el sistema para la enumeración de bacterias comprende los componentes siguientes mostrados en la Figura 1: captador de imágenes convencional acoplado con un ordenador, software de tratamiento y control, y aparato para el control del motor y la luz, indicados de manera conjunta como (1), cámara con matriz CCD convencional con una velocidad de imágenes de 30 imágenes por segundo y unas dimensiones de imágenes de 640x480 (2), un microscopio de epi-fluorescencia o fluorescencia con una ampliación de 400 y/o 1000 y con un sistema de auto-foco (3), una fuente de luz (4), un separador del haz (5), una tabla x-y mecánica (6) sobre la cual se coloca un filtro (7).

En otra realización preferida de la invención, en lugar de usar un sistema CCD convencional, se usa una CCD Line Approach que comprende una cámara de línea CCD. Dimensiones de la línea: 512 píxeles. Velocidad de la línea: 70 kHz equivalentes a 135 imágenes de 512 x 512 píxel² por segundo. Hardware de sincronización de la señal de diseño a la medida. Hardware de tratamiento de la señal digital/analógica de diseño a la medida.

Por motivos de claridad, y como una ayuda para la comprensión de la invención, tal como se describen y reivindican aquí, las abreviaturas siguientes son tal como se definen a continuación:

CFU - unidad de formación de colonia.

MUG - 4-metilumbeliferil β -D-galactopiranosido.

FDG - fluoresceína di- β -D-galactopiranosido.

CUG - 3-carboxiumbeliferil β -D-galactopiranosido.

Ejemplo 1

Preparación de portaobjetos de vidrio recubiertos con sol-gel

Los portaobjetos de microscopio convencional se lavaron en agua jabonosa mediante agitación suave durante 30 minutos y, a continuación, se aclararon inicialmente con agua corriente, seguido de un aclarado adicional con agua tri-distilada. A continuación, los portaobjetos se secaron durante una noche en un incubador a 36°C. A continuación, los portaobjetos de microscopio limpios se almacenaron en papel suave para uso posterior.

Una solución de partida típica para la preparación de la película sol-gel fina fue la siguiente: 0,9 ml de piridina pura + 0,2 ml de solución de CUG (100 mM) + 0,1 ml de H₂O se agitaron durante 1 minuto (con un pequeño imán).

ES 2 298 292 T3

Cuando el sustrato no se disolvió completamente, solamente se usó la fase superior de la mezcla. 0,8 ml de la solución anteriormente mencionada se mezclaron con 0,4 ml de metiltrimetoxi silano (MTMS, Fluka). El conjunto de la solución se mezcló bien mediante un agitador magnético durante un tiempo adicional de 2 minutos. Para la iniciación de la reacción, se agregaron 30 μ l de HCl 0,1 M a la solución anterior, seguido de 5 minutos de agitación magnética.

A continuación, los portaobjetos se recubrieron con 40 μ l de la solución resultante mediante el uso de una pipeta fina. La solución se esparció por igual a lo largo del cristal mediante un recubrimiento por centrifugado. El cristal recubierto se secó en la oscuridad durante un período de 24 horas bajo condiciones secas y a temperaturas ambientales. Después del período de secado inicial, los portaobjetos recubiertos con sol-gel se envolvieron con hoja de aluminio y se almacenaron en un lugar seco.

Ejemplo 2

Se repitió el Ejemplo 1, usando 0,1 ml de una solución de 4'-6-diamino-2-fenil indol a una concentración de 0,016 mg/ml. Los resultados obtenidos fueron similares a los del Ejemplo 1.

Ejemplo 3

Identificación y enumeración de E. coli

Se desarrolló un cultivo de bacterias de *E. coli* en un caldo nutriente durante 24 horas a 36°C. Se preparó en agua destilada estéril una solución sembrada de bacterias con una concentración estimada de 10^8 bacterias/ml. Se prepararon unas series de soluciones diferentes (350 ml de cada solución) con una concentración prevista de bacterias siguiente: 10^9 bacterias en 100 ml, 10^8 bacterias en 100 ml, 10^7 bacterias en 100 ml, 10^6 bacterias en 100 ml, 10^5 bacterias en 100 ml.

Todas las concentraciones de bacterias se verificaron mediante la realización de un ensayo de filtración de membrana (MF) paralelo en muestras de agua. Esto se llevó a cabo diluyendo la solución con agua destilada estéril en botellas de plástico estériles de modo que se logró exactamente una dilución de hasta $1:10^8$.

Con el fin de contar las bacterias en una muestra dada, la muestra de agua se filtró primeramente a través de un filtro Millipore (0,43 μ m, 13 mm). A continuación, el filtro Millipore se colocó al revés sobre la superficie de sol-gel. Con el fin de crear un contacto completo con el filtro y el sol-gel, se depositó una cantidad mínima de agua estéril (10 μ l) sobre la superficie del filtro y se aplicó una presión (de hasta 0,5 kg/cm²).

A continuación, las bacterias se incubaron conjuntamente con el sol-gel durante un período de 2,0 horas a 36°C en un recipiente húmedo (constituido por una placa de Petri grande con un relleno Wattman húmedo para prevenir el secado del filtro y la rotura del sol-gel). A continuación, el filtro Millipore se retiró y el portaobjetos se secó durante 10-15 minutos a 44,5°C.

Para el fin de la enumeración de las bacterias, el portaobjetos con sol-gel se observó bajo un sistema de microscopio (Zeiss Axiolab con un sistema de iluminación de epifluorescencia y una lámpara de mercurio de 50 W) con una ampliación de x400 que usa un filtro LP420. Con el fin de eliminar las algas fluorescentes naturales que pudieran crear resultados positivos falsos, se usaron longitudes de onda de luz específicas (por ejemplo, un filtro LP420).

Las imágenes de las manchas fluorescentes se tomaron en 5 lugares diversos al azar sobre el portaobjetos recubierto con sol-gel. La Figura 2 es una imagen tomada con 400 de ampliación de bacterias de *E. coli* sobre una superficie de sol-gel. A continuación, se contaron el número de manchas de fluorescencia mediante el uso de software de tratamiento de imagen (Image-Pro Plus, Media Cybernetics). El número de recuentos obtenido de acuerdo con el análisis se indica en la Tabla I.

ES 2 298 292 T3

TABLA I

Número de ensayo	Recuento de coliformes inicial (CFU/1 ml)	Número de imagen	Número de manchas fluorescentes contadas (unidades)	Número estimado de bacterias (CFU/1 ml)	Número promedio de bacterias (CFU/1 ml)
1	10^6	1	550	980.000	1.014.000
		2	500	890.000	
		3	600	1.070.000	
		4	575	1.020.000	
		5	625	1,110.000	
2	10^5	1	57	83.000	96.800
		2	56	99.000	
		3	50	89.000	
		4	58	103.000	
		5	62	110.000	
3	10^4	1	5	8.900	9.600
		2	6	10.700	
		3	8	14.200	
		4	5	8.900	
		5	3	5.300	

Puesto que el área de visión del microscopio era conocida, en número de manchas fluorescentes contadas en cada portaobjetos proporciona un estimado exacto de la cantidad inicial de bacterias que había en las soluciones originales.

Ejemplo 4

Descripción del algoritmo para enumerar el número de manchas de fluorescencia usando Image-Pro Plus

El algoritmo descrito aquí es un ejemplo usado para la detección y enumeración de bacterias sobre imágenes de sol-gel. El fin de este algoritmo es detectar manchas brillantes con el tamaño esperado. Se usó un filtro de paso bajo para la reducción de ruidos de alta frecuencia. Se usó la segmentación de imagen para la obtención de una imagen binaria de ampollas blancas de bacterias sobre un fondo negro. La segmentación en este dispositivo se realizó usando una aplicación de umbral único, con un umbral pre-definido constante.

El análisis comprende las etapas siguientes:

A) Marcado de imágenes binarias, para la obtención de una lista de objetos con ampollas, candidatos para ser indicados como bacterias.

B) Cálculo de las características geométricas de los elementos de la lista de ampollas (área, contraste, etc.).

C) Eliminación de candidatos cuyo tamaño y contraste está fuera del intervalo esperado.

D) Enumeración de los candidatos que quedan después del filtrado geométrico.

En la Figura 3 se muestra un ejemplo de guión del algoritmo anterior, el cual ilustra un procedimiento que comprende las fases siguientes:

ES 2 298 292 T3

Fase 1: Filtrado de paso bajo para reducción de ruidos de alta frecuencia.

5 *Fase 2:* Segmentación de imagen para la obtención de una imagen binaria de ampollas blancas de bacterias sobre fondo negro. La segmentación en este dispositivo se realizó usando una aplicación de umbral único, con un umbral pre-definido constante. En caso necesario, puede usarse un cálculo de umbral automático y/o dinámico.

Fase 3: Marcado de imágenes binarias, para la obtención de una lista de objetos con ampollas, candidatos para ser indicados como bacterias.

10 *Fase 4:* Cálculo de las características geométricas de los elementos de la lista de ampollas (área, contraste, etc.).

Fase 5: Eliminación de candidatos cuyo tamaño y contraste está fuera del intervalo esperado.

15 *Fase 6:* Enumeración de los candidatos que quedan después del filtrado geométrico.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la detección y enumeración de microorganismos viables que comprende las etapas de:

a. Suministro de una composición líquida que comprende uno o más marcadores incorporados en un precursor de sol-gel líquido;

b. Recubrimiento de un portaobjetos transparente con una capa uniforme fina de dicho precursor de sol-gel líquido;

c. Separación de los microorganismos procedentes de una muestra líquida para ser analizados mediante el paso de dicha muestra a través de un filtro y, a continuación, la puesta en íntimo contacto de dicho filtro con el portaobjetos recubierto con sol-gel;

d. Co-incubación de dicho filtro con dicho portaobjetos recubierto con sol-gel durante un período de tiempo y a una temperatura adecuada para promover la fijación de los marcadores por los microorganismos;

e. Separación de dicho portaobjetos recubierto con sol-gel de dicho filtro;

f. Irradiación de dicho portaobjetos recubierto con sol-gel con una fuente de energía externa tal como para generar señales detectables emitidas a partir de los marcadores fijados por los microorganismos; y

g. Adquisición de las imágenes de dichas señales detectables emitidas a partir de dichos microorganismos, y análisis de de dichas imágenes usando un sistema de ordenador, mediante el cual se suministra la identificación y enumeración de dichos microorganismos.

2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los microorganismos son bacterias.

3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la fuente de energía es luz UV.

4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los microorganismos son aislados a partir de agua, leche, alimentos, saliva, orina, tomas de muestras de la garganta, heridas, expectoración, contenido estomacal, o heces.

5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el marcador está seleccionado entre 3-carboxumbeliferil β -D-galactopiranosido, 4-clorometil-6,8-difluoroumbeliferil β -D-galactopiranosido, 4-metilumbeliferil β -D-galactopiranosido, fluoresceína di β -D-galactopiranosido, sal de litio de 6,8-difluoro-4-metilumbeliferil β -D-glucuronido, 2-dodecilresorufina, Elf-97, fluoresceína di- β -glucuronido, 5-(pentafluorobenzoilamino) fluoresceína di- β -glucuronido, y β -trifluorometilumbeliferil β -D-glucuronido.

6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se incorporan sustancias antibióticas dentro del sol-gel.

7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que las sustancias antibióticas están seleccionadas entre Cloranfenicol, Eritromicina, Tetraciclina, Estreptomina, Polimixina, Acido Nalidíxico, Novobiocina, Trimetoprina, Rifanapicina y Penicilina.

8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los marcadores se suministran para ser incorporados dentro de liposomas; películas; multicapas; formas de tipo trenza, lamelar, espiral, tubular y de fibra; varillas solvatadas; anillos solvatados; y combinaciones de las mismas.

9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se incorpora piridina o K_2SO_4 dentro del sol-gel.

10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el número de microorganismos enumerados es menor de 10^3 ml^{-1} .

11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el portaobjetos y el filtro se co-incuban durante un período de tiempo entre 0,5 y 6 horas, a una temperatura entre 35 y 44°C.

12. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que implica el uso de un captador de imágenes convencional, una cámara con matriz CCD, un sistema óptico, una tabla x-y mecánica, un sistema de auto-foco y una fuente de luz fluorescente.

13. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la velocidad del captador de imágenes es de 30 imágenes por segundo, y las dimensiones de las imágenes son de 640x480 píxeles.

ES 2 298 292 T3

14. Uso de un vidrio de sol-gel poroso que comprende al menos un marcador adecuado para ser fijado por un microorganismo, para el recubrimiento de un portaobjetos transparente para la identificación y enumeración directamente de microorganismos viables sobre el portaobjetos así recubierto mediante la co-incubación de dicho portaobjetos con un filtro que contiene dichos microorganismos.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

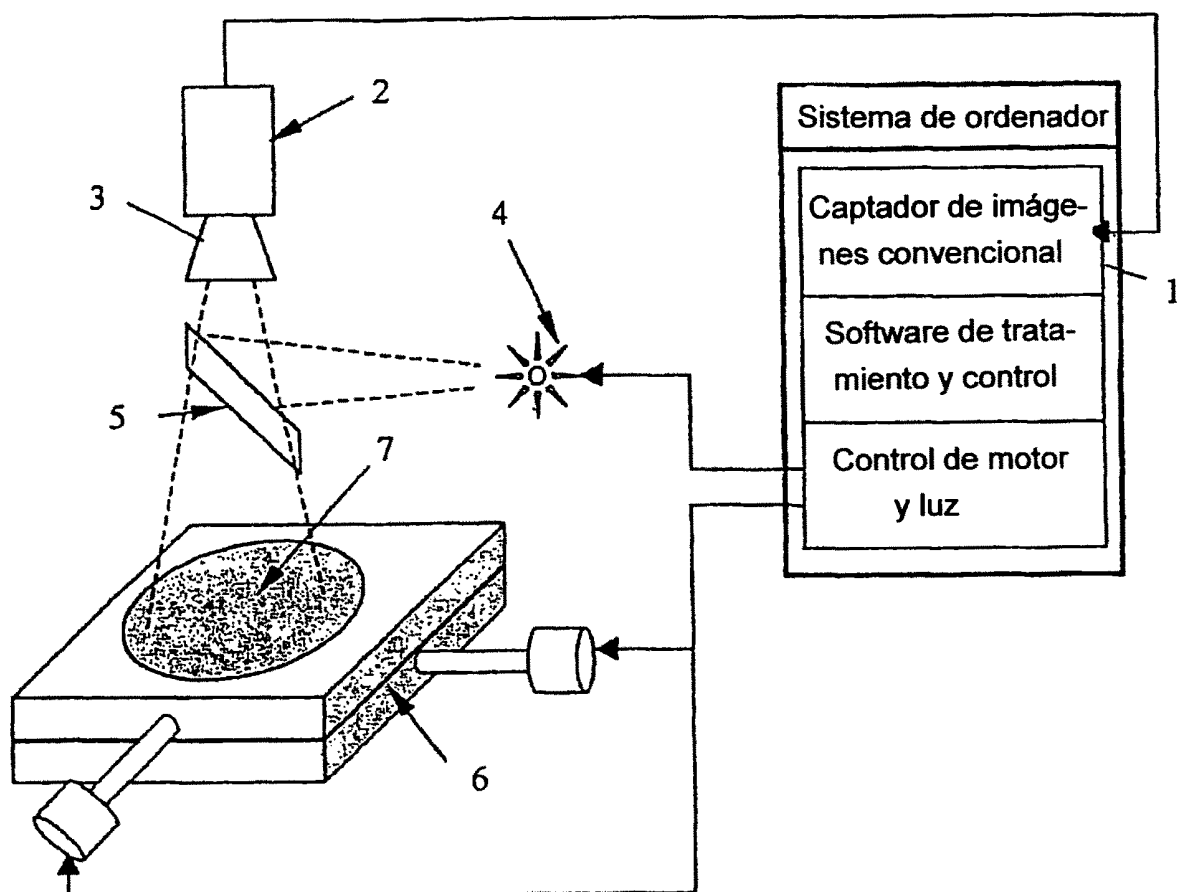


Fig. 1

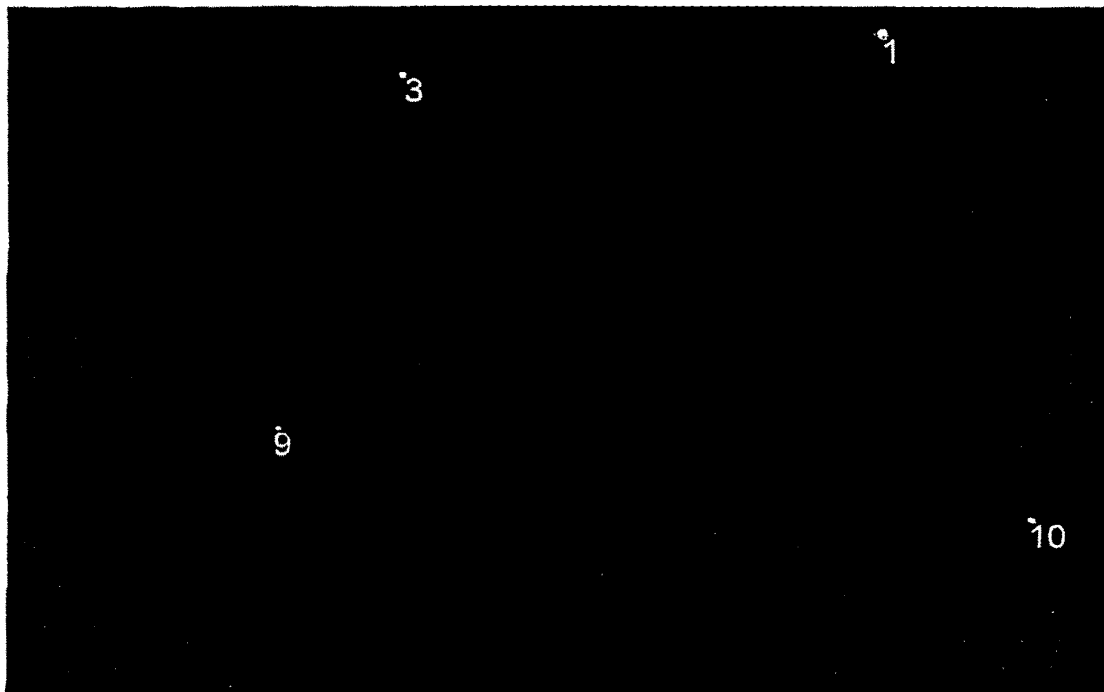


Fig. 2

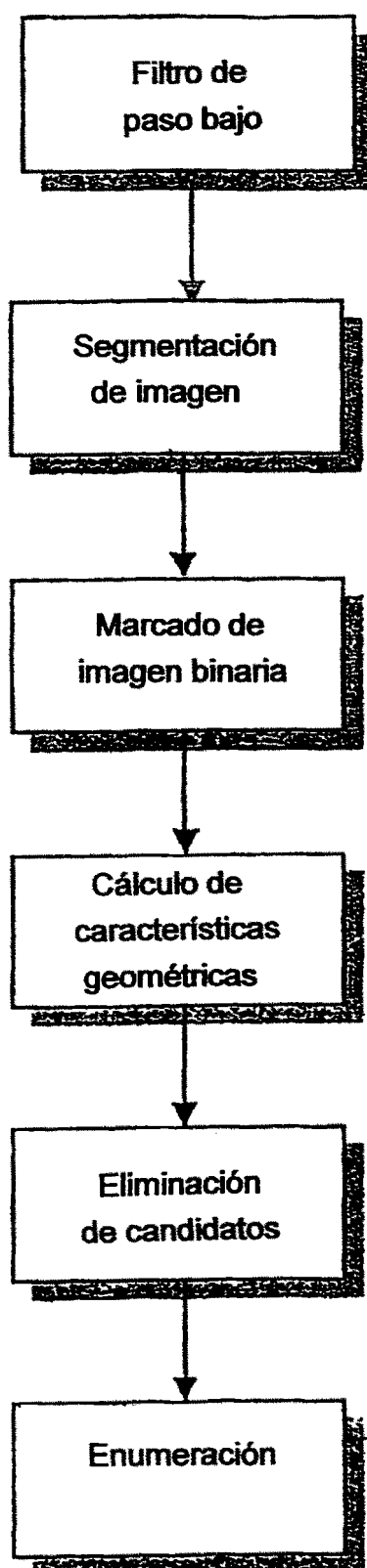


Fig. 3