

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010111839/15, 19.05.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.05.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
30.08.2007 US 11/847,569

(43) Дата публикации заявки: 10.10.2011 Бюл. № 28

(45) Опубликовано: 20.10.2012 Бюл. № 29

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: US 20040029171 A1, 12.02.2004. US
20050130253 A1, 16.06.2005. WO 1999058976
A1, 26.04.1999. US 6589761 B1, 08.07.2003. US
20030032080 A1, 13.02.2003. WO 2006053443
A1, 26.05.2006.(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 30.03.2010(86) Заявка РСТ:
IB 2008/051965 (19.05.2008)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2009/027855 (05.03.2009)Адрес для переписки:
105064, Москва, а/я 88, "Патентные
поверенные Квашнин, Сапельников и
партнеры", пат.пов. В.П. Квашнину, рег.№ 4

(72) Автор(ы):

МАРТИН Стефани М. (US),
МАКДОНАЛД Дж. Гэвин (US),
ЛАЙ Джейсон (US),
СЭЙЕР Кертис (US),
ТОМПСОН Кимберли (US)

(73) Патентообладатель(и):

КИМБЕРЛИ-КЛАРК ВОРЛДВАЙД, ИНК.
(US)

(54) БЫСТРАЯ ОЦЕНКА СОСТОЯНИЙ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, а именно медицинской микробиологии. Сущность способа быстрого определения типа микроорганизмов в образце из верхних дыхательных путей заключается в том, что осуществляют контакт образца, полученного из верхних дыхательных путей, с тестовой полоской. Тестовая полоска содержит, по меньшей мере, один индикатор широкого спектра, который демонстрирует первую спектральную реакцию в присутствии

бактерий и вторую спектральную реакцию в присутствии вирусов. Индикатором широкого спектра является N-фенолят бетион. Тестовая полоска кроме этого содержит сетку, которая содержит один дифференцирующий индикатор, где сетка демонстрирует третью спектральную реакцию в присутствии одного типа микроорганизмов и четвертую спектральную реакцию в присутствии другого типа микроорганизмов. Использование заявленного способа позволяет быстро и легко оценить присутствие в тестируемом образце вирусов

или бактерий по спектральной реакции табл., 1 ил.
индикаторов. 2 н. и 17 з.п. ф-лы, 7 пр., 18

R U 2 4 6 4 5 6 5 C 2

R U 2 4 6 4 5 6 5 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)*C12Q 1/02* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2010111839/15, 19.05.2008**(24) Effective date for property rights:
19.05.2008

Priority:

(30) Convention priority:
30.08.2007 US 11/847,569(43) Application published: **10.10.2011 Bull. 28**(45) Date of publication: **20.10.2012 Bull. 29**(85) Commencement of national phase: **30.03.2010**(86) PCT application:
IB 2008/051965 (19.05.2008)(87) PCT publication:
WO 2009/027855 (05.03.2009)

Mail address:

**105064, Moskva, a/ja 88, "Patentnye poverennye
Kvashnin, Sapel'nikov i partnery", pat.pov. V.P.
Kvashninu, reg.№ 4**

(72) Inventor(s):

**MARTIN Stefani M. (US),
MAKDONALD Dzh. Gehvin (US),
LAJ Dzhejson (US),
SEhJER Kertis (US),
TOMPSON Kimberli (US)**

(73) Proprietor(s):

KIMBERLI-KLARK VORLDAVD, INK. (US)**(54) RAPID ASSESSMENT OF UPPER AIRWAY STATE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: sample from the upper airways contacts with a test strip. The test strip contains at least one wide-spectrum indicator which demonstrates a first spectral reaction in the presence of bacteria and a second spectral reaction in the presence of viruses. The wide-spectrum indicator is N-phenolate betaine. Besides, the test strip contains a mesh which comprises one

differentiating indicator wherein the mesh demonstrates a third spectral reaction in the presence of one type of microorganisms and a fourth spectral reaction in the presence of the other type of microorganisms.

EFFECT: use of the declared method enables the rapid and easy assessment of the presence of viruses and bacteria in the test sample by the spectral indicator reaction.

7 ex, 18 tbl, 1 dwg

Уровень техники

Состояния верхних дыхательных путей включают острые и системные инфекции, поражающие верхние дыхательные пути (например, нос, пазухи, глотку, гортань или бронхи), такие как риносинусит (насморк), синусит, фарингит/тонзиллит, ларингит, бронхит, инфлюэнцу (грипп) и так далее. Обычно пациенты, страдающие от дискомфорта в дыхательных путях (например, заложенности, кашля, насморка, больного горла, лихорадки, лицевое давление и чиханье), обращаются к терапевту за рекомендациями по минимизации или преодолению такого дискомфорта. Однако терапевт, к которому обратился такой пациент, обычно сталкивается с трудной задачей определения того, каково основное происхождение дискомфорта у конкретного пациента. Общие вирусные этиологии для состояний верхних дыхательных путей включают, например, риновирусы, коронавирус, вирус гриппа А или В, вирус парагриппа, аденовирус и т.д., а общие бактериальные этиологии включают *Chlamydia pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* и т.д. Определенные аллергии также могут вызвать состояния верхних дыхательных путей. К сожалению, неправильный диагноз точной этиологии может создать проблему. Например, неправильный диагноз аллергии как синусита может вызвать ненужное прописывание курса антибиотиков, которые не облегчат аллергический дискомфорт, но усилят возможность последующей резистентной бактериальной инфекции.

Следовательно, в настоящее время существует необходимость в методике быстрой и простой оценки состояния верхних дыхательных путей.

Сущность изобретения

В одном варианте данного изобретения описан способ быстрого определения микроорганизмов в образце из верхних дыхательных путей. Способ включает контакт тестовой полоски с образцом из верхних дыхательных путей. Тестовая полоска содержит, по меньшей мере, один широкий спектральный индикатор, который показывает первую спектральную реакцию на присутствие бактерии и вторую спектральную реакцию на присутствие вирусов. Тестовая полоска также содержит матрицу, которая содержит, по меньшей мере, один дифференцирующий индикатор, где матрица демонстрирует третью спектральную реакцию в присутствии одного типа микроорганизмов и четвертую спектральную реакцию в присутствии другого типа микроорганизма. Широкий спектральный индикатор получают для первой спектральной реакции или второй спектральной реакции, присутствие второй спектральной реакции говорит о присутствии вируса в образце. Затем рассматривают матрицу для получения третьей спектральной реакции или четвертой спектральной реакции.

Согласно другому варианту данного изобретения, описан набор для быстрого определения микроорганизмов в образце из верхних дыхательных путей. Набор включает устройство для сбора тестируемого образца из верхних дыхательных путей хозяина и тестовую полоску, содержащую, по меньшей мере, один широкий спектральный индикатор, который показывает первую спектральную реакцию на присутствие бактерии и вторую спектральную реакцию на присутствие вирусов. Тестовая полоска также содержит матрицу, которая содержит, по меньшей мере, один дифференцирующий индикатор, где матрица демонстрирует третью спектральную реакцию в присутствии одного типа микроорганизмов и четвертую спектральную реакцию в присутствии другого типа микроорганизма.

Другие характеристики и аспекты данного изобретения более подробно описаны

ниже.

Краткое описание рисунков

Полное и достаточное раскрытие данного изобретения, включая наилучший способ его осуществления, предназначенное для специалиста в данной области техники, более
5 подробно представлено в оставшейся части описания, где имеются ссылки на прилагаемые рисунки, в которых:

на Фиг.1 представлено перспективное изображение тестовой полоски в соответствии с данным изобретением до контакта с тестируемым образцом (Фиг.1А),
10 после контакта с тестируемым образцом, зараженным бактериями (Фиг.1В); и после контакта с тестируемым образцом, не зараженным бактериями (Фиг.1С).

Повторяющееся использование ссылочных символов в данном описании и чертежах предназначено для описания одинаковых или аналогичных характеристик или
15 элементов данного изобретения.

Подробное описание вариантов выполнения изобретения

Определения

В данном описании термин "образец из верхних дыхательных путей" обычно относится к биологическому материалу, полученному прямо или косвенно из верхних
20 дыхательных путей хозяина, например из носовых проходов, рта, горла и т.д.

Тестируемый образец может быть получен любым желаемым методом, таким как применение мазка. Тестируемый образец может применяться в том виде, в каком он получен или предварительно обработан некоторым образом. Например, такая
25 предварительная обработка может включать фильтрацию, осаждение, разведение, дистилляцию, смешивание, концентрацию, инактивацию или интерферирование компонентов, добавление реагентов, лизирование и т.д.

В данном описании термин «хозяин» относится к любому животному, предпочтительно человеку.

30 Подробное описание

Далее подробно представлены различные варианты данного изобретения, один или более примера которых представлены ниже. Каждый пример представлен для
объяснения данного изобретения, и не ограничивает данное изобретение. Фактически, специалисту в данной области техники будет очевидно, что различные модификации и
35 вариации могут быть проведены в данном изобретении, не выходя за объем и суть изобретения. Например, характеристики, иллюстрированные или описанные как часть одного варианта, могут применяться в другом варианте с получением еще одного варианта. Таким образом, предполагается, что данное изобретение охватывает такие
40 модификации и вариации, представленные в формуле изобретения и ее эквивалентах.

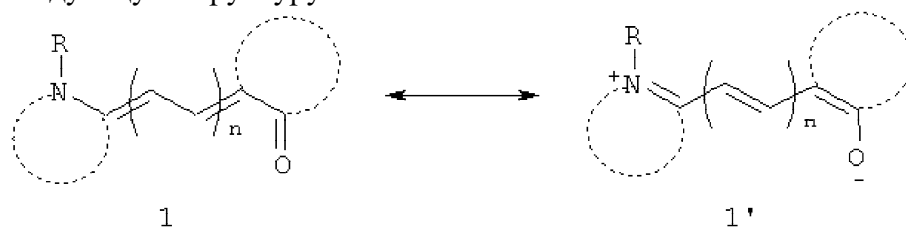
В общем, данное изобретение относится к способу быстрой оценки состояний верхних дыхательных путей. Более конкретно, способ включает контакт образца, полученного из верхних дыхательных путей хозяина, с тестовой полоской. Тестовая
45 полоска содержит индикатор, который обеспечивает реакцию широкого спектра в присутствии бактерий, плесени, дрожжей или других микроорганизмов, которая отличается от реакции на них в присутствии вирусов. Это позволяет быструю и простую оценку того, заражен ли образец вирусом или другим микроорганизмом. Для того чтобы помочь терапевту определить точный курс лечения, также желательно
50 получить дополнительную информацию о конкретном типе присутствующего микроорганизма. В этой связи, тестовая полоска содержит матрицу из одного или более дифференцирующих идентификаторов, которые дают определенную реакцию в присутствии различных типов микроорганизмов. Например, матрица может давать

определенную спектральную реакцию в присутствии грамотрицательных бактерий, но абсолютно другую спектральную реакцию в присутствии грамположительных бактерий. Также, матрица может давать определенную спектральную реакцию в присутствии риновирусов (связанных с насморком), но другую реакцию в присутствии
 5 вирусов гриппа. Определение спектральной реакции, даваемой индикаторами, таким образом, позволяет быструю дифференциацию между различными типами микроорганизмов.

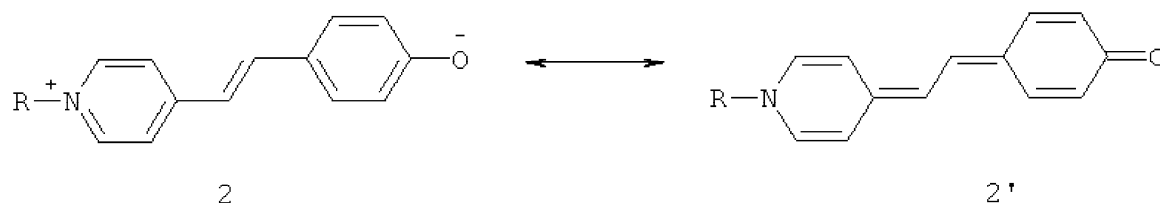
Любой из множества микроорганизмов может быть определен в соответствии с
 10 данным изобретением. Например, грамположительные (например, *Streptococcus pyogenes* и *Streptococcus pneumoniae*) и грамотрицательные (например, *Moraxella lacunata*, *Haemophilus influenzae* и *Chlamydia pneumoniae*) бактерии часто связаны с состояниями верхних дыхательных путей и могут быть определены в соответствии с
 15 данным изобретением. Грамотрицательные бактерии имеют стенки клеток, покрытые липосахаридами (ЛПС). Грамположительные бактерии покрыты толстыми листоподобными слоями пептидогликана (или муреина). Наиболее часто бактериальными причинами состояний верхних дыхательных путей являются *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pyogenes*.
 20 *Streptococcus pyogenes* является грамположительным, неподвижным, неспорообразующим кокком, который возникает в цепях или в парах клеток. *Streptococcus pyogenes* является каталазонегативным аэротолерантным анаэробом (факультативным анаэробом) и требует обогащенной среды, содержащей кровь, для роста. *Haemophilus influenzae* является маленькой неподвижной грамотрицательной
 25 бактерией семейства Pasteurellaceae. Вирусы, наиболее часто связываемые с состояниями верхних дыхательных путей, включают вирусы родов риновирусов (например, риновирус типа 42), вирусов гриппа А (например, штаммы H1N1, H1N2, H2N2 или H3N2), вирусов гриппа В, вирусов гриппа С, респировирусов (например,
 30 вирусы парагриппа человека типов 1, 2, 3 и 4), симплексовирусов (например, герпес симплекс тип I и герпес симплекс тип II), мастаденовирусов (например, аденовирус типов 1, 2, 5 и 6) и коронавируса (например, коронавирус человека 229Е, коронавирус человека NL63, коронавирус человека OC43, SARS-CoV и IBV). Из этих
 35 общих форм вирусов, симплексвирус и мастаденовирус являются в основном вирусами с двухспиральной ДНК, которые содержат иксаэдрический капсид. Симплексвирусы обычно обладают вирионом, заключенным в оболочку, а мастаденовирус не имеет оболочки. Риновирусы, вирусы гриппа, вирусы парагриппа и коронавирусы являются
 40 вирусами с односпиральной РНК. Риновирусы содержат иксаэдрические капсиды и не имеют оболочки, вирусы гриппа и парагриппа содержат спиральные капсиды и имеют оболочку, и коронавирусы имеют асимметричные капсиды и имеют оболочку.

Как отмечено выше, индикатор, применяемый в данном изобретении, может обеспечивать реакцию широкого спектра на бактерии или другие микроорганизмы, которая отличается от его реакции на вирусы. Хотя он и не ограничен каким-либо
 45 конкретным типом, авторы данного изобретения обнаружили, что сольватохроматические индикаторы являются особенно эффективными в различных изменениях цвета в присутствии широкого спектра бактерий или других
 50 микроорганизмов, но очень незначительны, если имеются какие-либо изменения в присутствии вирусов, связанных с состояниями верхних дыхательных путей. Мерицианиновые индикаторы (например, моно-, ди- и три-мерицианины) являются одним из примеров типа сольватохроматического индикатора, который может применяться в соответствии с данным изобретением. Мерицианиновые индикаторы,

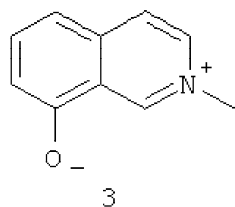
такие как мероцианин 540, относятся к индикаторам типа донор-простой акцептор по классификации Griffiths, представленной в "Colour and Constitution of Organic Molecules" Academic Press, London (1976). Более конкретно, мероцианиновые индикаторы имеют щелочное ядро и кислое ядро, разделенные конъюгированной цепью, имеющей равное количество метиновых атомов углерода. Такие индикаторы имеют карбонильную группу, которая действует как группа-акцептор электрона. Акцептор электрона конъюгирован с группой, отдающей электрон, такой как гидроксильная или аминогруппа. Мероцианиновые индикаторы могут быть циклическими или ациклическими (например, винилалогичными амидами циклических мероцианиновых индикаторов). Например, циклические мероцианиновые индикаторы обычно имеют следующую структуру:

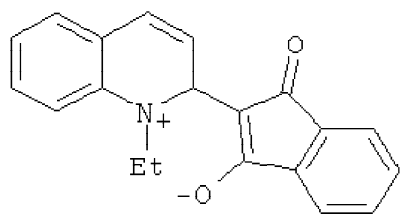


где n является любым целым числом, включая 0. Как указано выше в общих формулах 1 и 1', мероцианиновые индикаторы обычно имеют резонансную форму с разделенным зарядом (т.е. "цвиттерионные"). Цвиттерионные индикаторы включают такие, которые содержат и положительные и отрицательные заряды и являются нетто-нейтральными, но высокочarged. Не ограничиваясь теорией, полагают, что цвиттерионная форма значительно влияет на покой индикатора. Цвет, образуемый такими индикаторами, зависит от различия полярности молекул между спокойным и возбужденным состояниями индикатора. Один из конкретных примеров мероцианинового индикатора, который имеет состояние покоя более полярное, чем возбужденное состояние, показан ниже как структура 2.

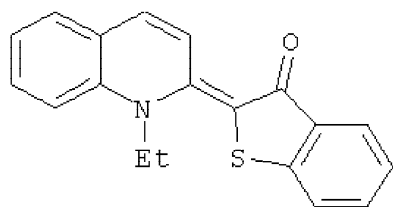


Левая каноническая структура 2 с разделенным зарядом является основным фактором состояния покоя, в то время как правая каноническая структура 2' является основным фактором первого возбужденного состояния. Другие примеры подходящих мероцианиновых индикаторов представлены ниже как структуры 3-13.

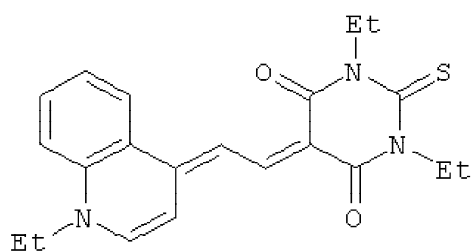




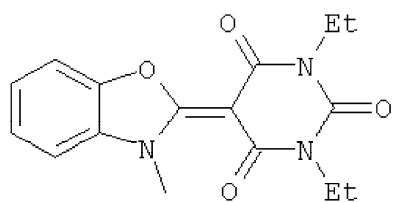
4



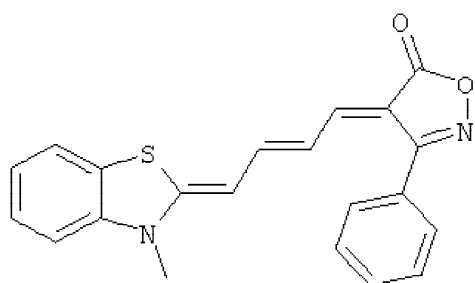
5



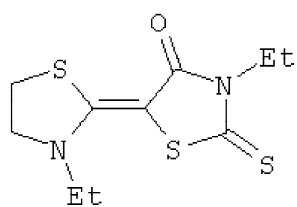
6

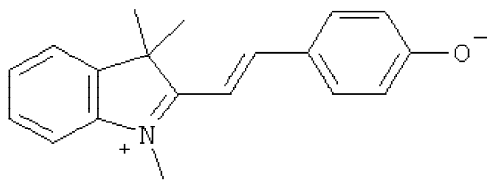


8

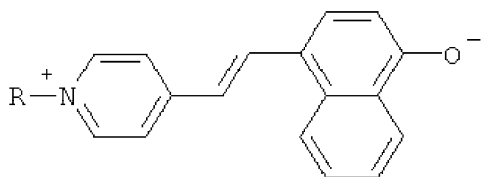


9

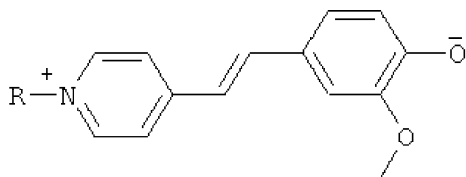




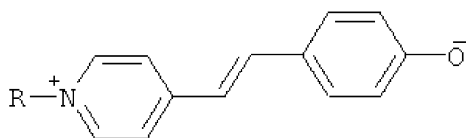
10



11



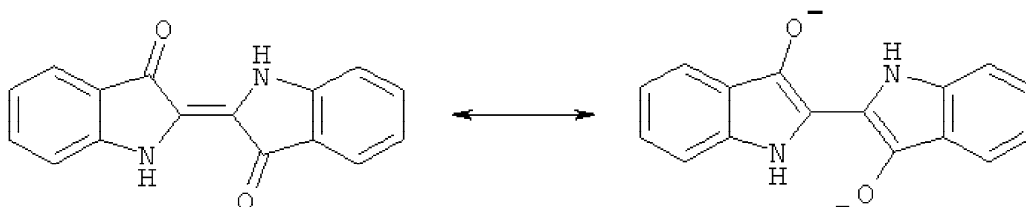
12



13

где "R" является группой, такой как метил, алкил, арил, фенил и т.д.

Индиго является другим примером подходящего сольватохроматического индикатора для применения в соответствии с данным изобретением. Индиго имеет состояние покоя, которое значительно менее полярное, чем возбужденное состояние. Например, индиго обычно имеет структуру 14

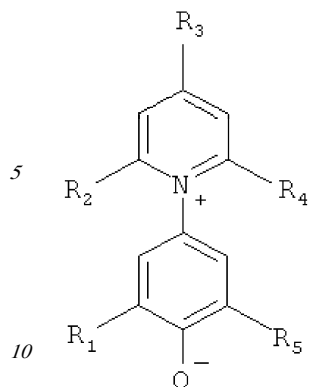


14

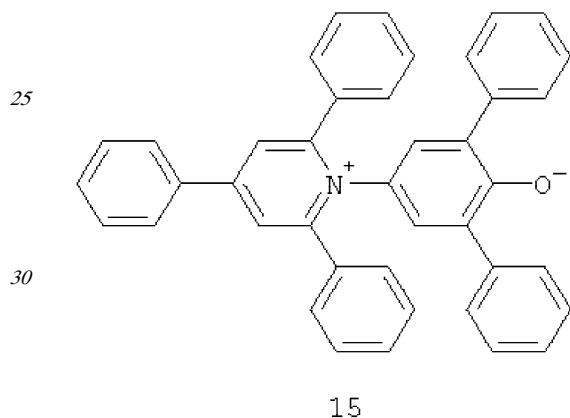
14'

Левая каноническая форма 14 является основным фактором состояния покоя индикатора, в то время как правая каноническая форма 14' является основным фактором возбужденного состояния.

Другие подходящие сольватохроматические индикаторы, которые могут применяться в соответствии с данным изобретением, включают такие, которые обладают постоянной цвиттерионной формой. То есть эти индикаторы имеют формальные положительные и отрицательные заряды, содержащиеся в непрерывной π -электронной системе. В отличие от мероцианиновых индикаторов, описанных выше, структура с нейтральным резонансом не может быть изображена для таких перманентных цвиттерионных индикаторов, примеры индикаторов этого класса включают N-фенолят бетаиновые индикаторы, такие как следующая общая структура:



где R_1 - R_5 независимо выбирают из группы, включающей водород, нитро-группу (например, азот), галоген или линейную, разветвленную или циклическую C_1 - C_{20} группу (например, алкил, фенил, арил, пиридинил и т.д.), которая может быть насыщенной или ненасыщенной, или незамещенной или необязательно замещенной на том же или различных атомах углерода одним, двумя или более галогенами, нитро, циано, гидроксид, алкокси, амина, фенильными, арильными, пиридиновыми или алкиламиновыми группами. Например, N-фенолят бетаиновым индикатором может быть 4-(2,4,6-трифенилпиридиний-1-ил)-2,6-дифенилфенолят (краситель Рейхардта), имеющий следующую общую структуру 15:

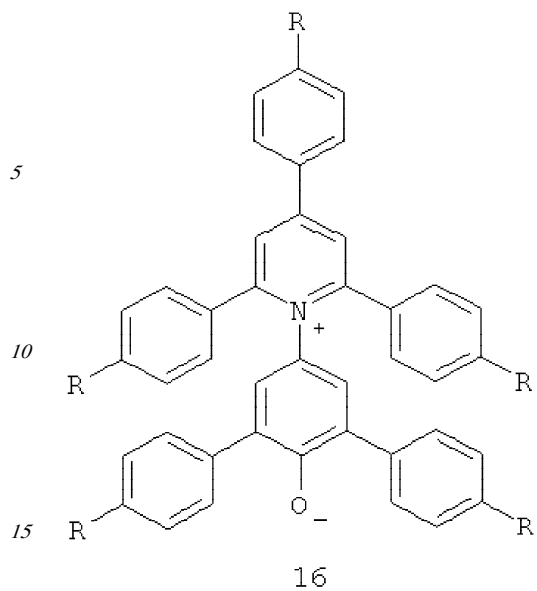


35 Краситель Рейнхардта демонстрирует сильный отрицательный сольватохромизм и может значительно менять цвет от голубого до бесцветного в присутствии бактерий. То есть краситель Рейнхардта демонстрирует сдвиг в абсорбции в сторону более короткой волны и, таким образом, имеет значительные изменения цвета при

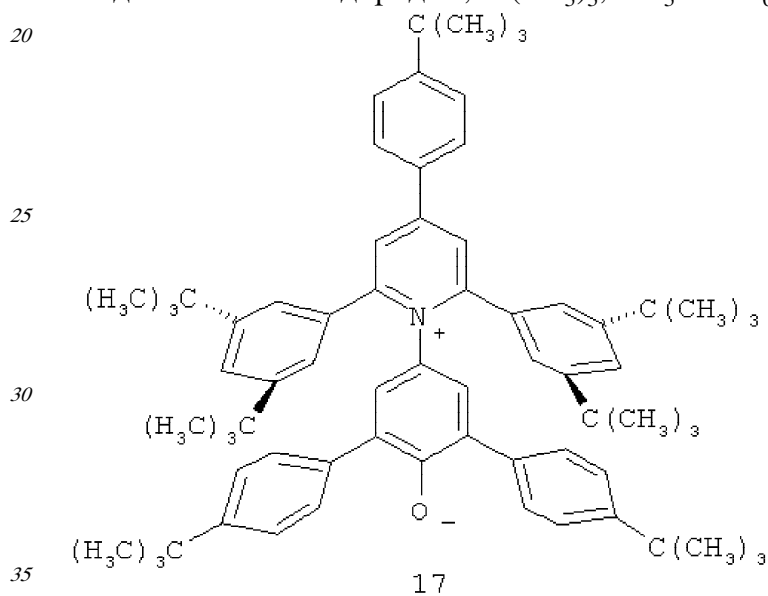
40 повышении силы растворителя-элюента (полярность). Другие примеры подходящих отрицательно сольватохроматических пиридинов N-фенолят бетаиновых индикаторов показаны ниже на структурах 16-23:

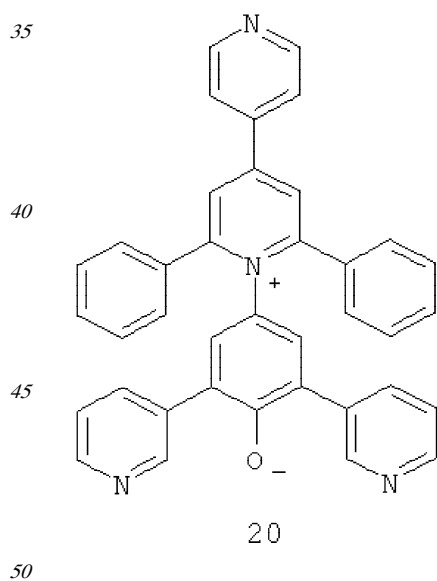
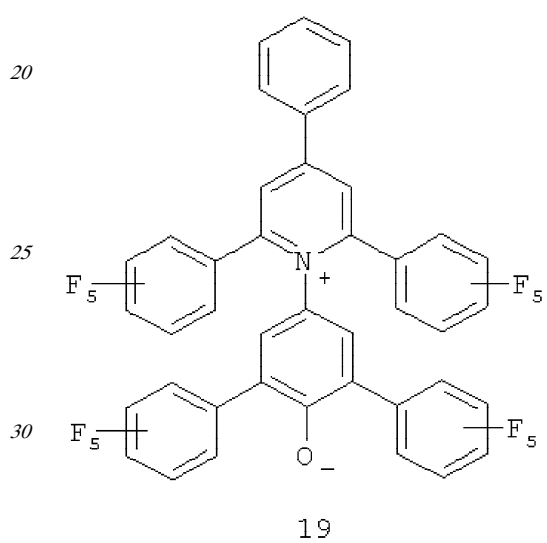
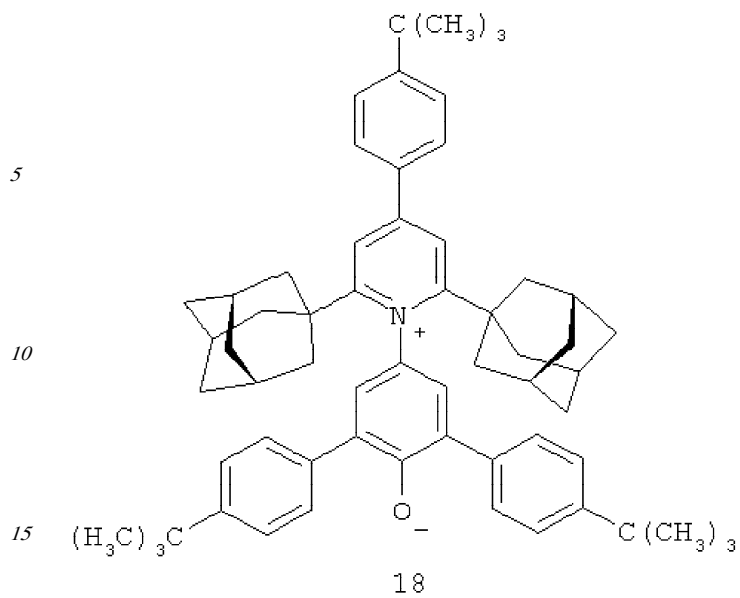
45

50



где R является водородом, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CF}_3$ или C_6F_{13} .

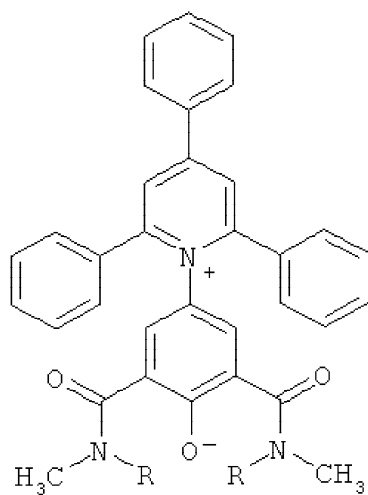




5

10

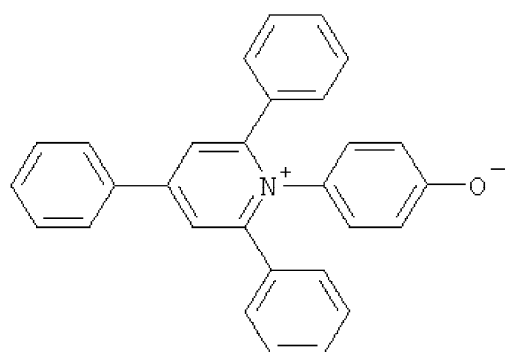
15



21

20

25

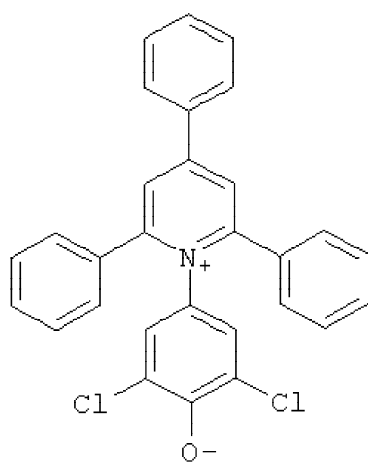


22

30

35

40

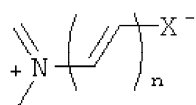


23

45

Другие примеры индикаторов, имеющих перманентную цвиттерионную форму, включают индикаторы, имеющие следующую общую структуру 24:

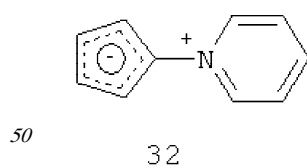
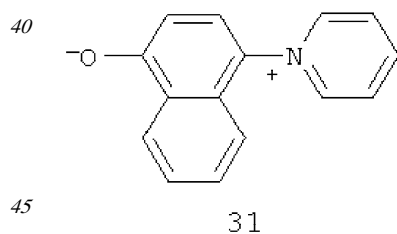
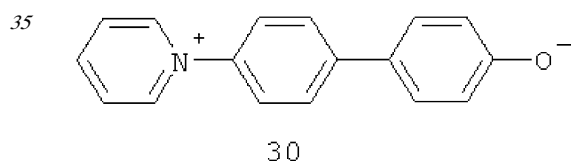
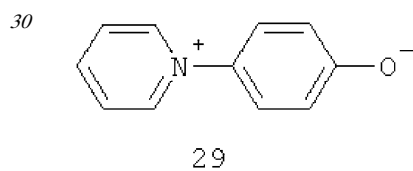
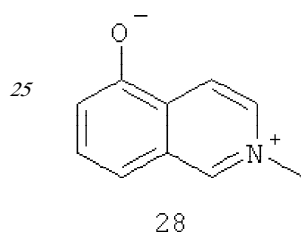
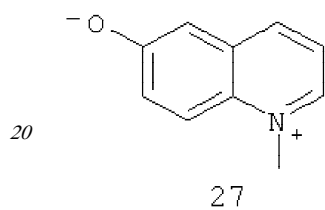
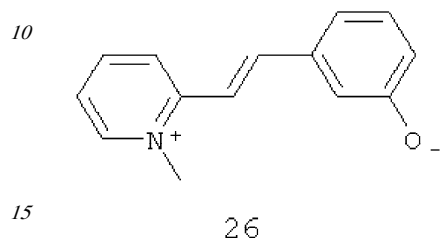
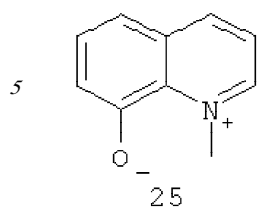
50

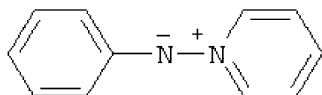


24

где n равно 0 или более, и X является кислородом, углеродом, азотом, серой и т.д.

Конкретные примеры перманентных цвиттерионных форм, показанных на структуре 24, включают следующие структуры 25-33:





33

5

Другие подходящие сольватохроматические индикаторы могут включать, но не ограничены ими, 4-дицианметил-2-метил-6-(п-диметиламиностирил)-4Н-пиран (DCM); 6-пропионил-2-(диметиламино)нафталин (PRODAN); 9-(диэтиламино)-5Н-бензо[а]феноксазин-5-он (Найл Красный); 4-(дициановинил)джулолидин (DCVJ); фенольный Синий; стилбазолиевые индикаторы; кумароновые индикаторы; кетоцианиновые индикаторы; N,N-диметил-4-нитроанилин (NDMNA) и N-метил-2-нитроанилин (NM2NA); Nile blue; 1-анилинонафталин-8-сульфоновая кислота (1,8-ANS) и дапоксилбутил-сульфонамид (DBS) и другие аналоги дапоксила. Кроме указанных выше индикаторов, другие подходящие индикаторы, которые могут применяться в соответствии с данным изобретением, включают, но не ограничены ими, 4-[2-N-замещенный-1,4-гидропиридин-4-илидин]этилиден]циклогекса-2,5-диен-1-он, красные пиразолоновые индикаторы, азометиновые индикаторы, индоанилиновые индикаторы и их смеси.

20

Кроме индикатора широкого спектра также применяют один или более индикаторов (например, красителей, пигментов и т.д.), которые способны различать определенные типы микроорганизмов. Могут применяться рН-чувствительные индикаторы, например, которые определяют изменения в рН среды для роста микроорганизма. Бактерии и вирусы, например, могут преобразовывать среду для роста и образовывать кислые соединения (например, CO_2) или щелочные соединения (например, аммиак), что приводит к изменению рН. Также определенные микроорганизмы (например, бактерии) содержат высокоорганизованные кислые группы на стенках клеток. Так как кислотный/щелочной сдвиг может варьироваться для различных микроорганизмов, для применения в соответствии с данным изобретением могут быть выбраны рН-чувствительные индикаторы, настроенные на желаемый рН переход. Таким образом, может быть представлена тестовая полоска с рН-чувствительными индикаторами, которая сделана таким образом, чтобы явно менять цвет только в присутствии бактерий или вирусов, имеющих определенный кислотный/щелочной сдвиг.

30

35

Фталеиновые индикаторы составляют один класс подходящих рН-чувствительных индикаторов, которые могут применяться в тестовой полоске в соответствии с данным изобретением. Фенол Красный (например, фенолсульфонфталеин), например, демонстрирует переход от желтого до красного при изменении рН от 6,6 до 8,0. При рН выше около 8,1, Фенол Красный становится ярко-розовым (фуксия). Производные Фенол Красного также могут подходить для применения в соответствии с данным изобретением, например такие, которые замещены хлором, бромом, метилом, карбоксилатом натрия, карбоновой кислотой, гидроксидом и аминными функциональными группами. Примеры замещенных соединений Фенолового Красного включают, например, Хлорфеноловый Красный, Метакрезоловый Фиолетовый (мета-крезолсульфонфталеин), Крезоловый Красный (орто-крезолсульфонфталеин), Пирокатеколовый Фиолетовый (пирокатеколсульфонфталеин), Хлорофеноловый Красный (3',3''-дихлорфенолсульфонфталеин), Ксиленоловый Синий (натриевая соль параксиленолсульфонфталеина), Ксиленоловый Оранжевый, Мордант Синий 3 (C.I. 43820), 3,4,5,6-тетрабромфенолсульфонфталеин, Бромксиленоловый Синий,

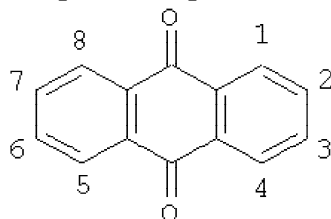
45

50

Бромфеноловый Синий (3',3'',5',5''-тетрабромфенолсульфонфталеин),
 Бромхлорфеноловый Синий (натриевая соль дибром-5',5''-
 дихлорфенолсульфонфталеин), Бромкрезол Фиолетовый (5',5''-дибром-орто-
 крезолсульфонфталеин), Бромкрезоловый Зеленый (3',3'',5',5''-тетрабром-орто-
 крезолсульфонфталеин) и так далее. Другие подходящие фталеиновые индикаторы
 хорошо известны в данной области техники и могут включать Бромтимоловый Синий,
 Тимоловый Синий, Бромкрезоловый Фиолетовый, тимолфталеин и фенолфталеин
 (общий компонент универсальных индикаторов). Например, Хлорфеноловый
 Красный показывает переход от желтого до красного при pH от около 4,8 до 6,4;
 Бромтимоловый Синий показывает переход от желтого до голубого при pH от
 около 6,0 до 7,6; тимолфталеин показывает переход от бесцветного до голубого при
 pH от около 9,4 до 10,6; фенолфталеин показывает переход от бесцветного до
 розового при pH от около 8,2 до 10,0; Тимоловый Синий показывает переход от
 красного до желтого при pH от около 1,2 до 2,8 и второй переход от желтого до pH
 при pH от 8,0 до 9,6; Бромфеноловый Синий показывает переход от желтого до
 фиолетового при pH от около 3,0 до 4,6; Бромкрезоловый Зеленый показывает
 переход от желтого до голубого при pH от около 3,8 до 5,4; и Бромкрезоловый
 Фиолетовый показывает переход от желтого до фиолетового при pH от около 5,2
 до 6,8.

Гидроксиантрахиноны составляют другой подходящий класс pH-чувствительных
 индикаторов для применения в соответствии с данным изобретением.

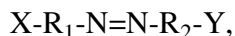
Гидроксиантрахиноны имеют следующую общую структуру:



Цифры 1-8, показанные в общей формуле, указывают на положения в
 конденсированной кольцевой структуре, в которых возможно замещение
 функциональной группой. Для гидроксиантрахинонов, по меньшей мере, одна из
 функциональных групп является или содержит гидроксид (-ОН) группу. Другие
 примеры функциональных групп, которые могут быть заместителями на
 конденсированной кольцевой структуре, включают галогеновые группы (например,
 группы хлора или брома), сульфонильные группы (например, соль сульфоновой
 кислоты), алкильные группы, бензильные группы, аминогруппы (например,
 первичные, вторичные, третичные или четвертичные амины), карбоксигруппы,
 цианогруппы, фосфорные группы и т.д. Некоторые подходящие
 гидроксиантрахиноны, которые могут применяться в соответствии с данным
 изобретением, включают Мордант Красный 11 (Ализарин), Мордант Красный 3
 (Ализарин Красный S), Ализарин Желтый R, Ализарин Комплексон, Мордант
 Черный 13 (Ализарин Сине-черный B), Мордант Фиолетовый 5 (Ализарин
 Фиолетовый 3R), Ализарин Желтый GG, Натуральный Красный 4 (карминовая
 кислота), амино-4-гидроксиантрахинон, Эмодин, Ядерный быстрый Красный,
 Натуральный Красный 16 (Пурпурин), Хинализарин и так далее. Например,
 карминовая кислота показывает первый переход от оранжевого до красного при pH
 от около 3,0 до 5,5 и второй переход от красного до фиолетового при pH от около 5,5
 до 7,0. Ализарин Желтый R, с другой стороны, показывает переход от желтого к

оранжево-красному при рН от около 10,1 до 12,0.

Еще одним классом рН-чувствительных индикаторов, которые могут применяться в тестовой полоске, являются ароматические азосоединения, имеющие общую структуру



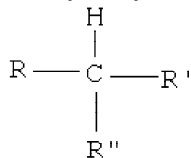
где

R_1 является ароматической группой;

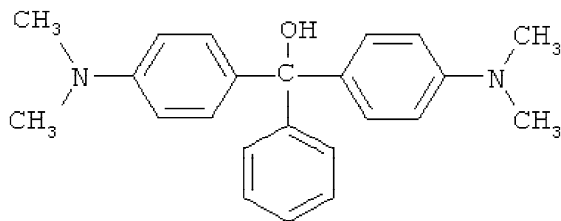
R_2 выбирают из группы, включающей алифатические и ароматические группы; и

X и Y независимо выбирают из группы, включающей водород, галогениды, $-NO_2$, $-NH_2$, арильные группы, алкильные группы, алкоксигруппы, сульфонатные группы, $-SO_3H$, $-OH$, $-CONH_2$, $-COOH$, галогениды и т.д. Также подходящими являются азопроизводные, такие как азокси соединения ($X-R_1N=NO-R_2-Y$) или гидразидо соединения ($X-R_1-NH-NH-R_2-Y$). Конкретные примеры таких азосоединений (или их производных) включают Метиловый Фиолетовый, Метиловый Желтый, Метиловый Оранжевый, Метиловый Красный и Метиловый Зеленый. Например, Метиловый Фиолетовый показывает переход от желтого до голубого-фиолетового при рН от около 0 до 1,6, Метиловый Желтый показывает переход от красного до желтого при рН от около 2,9 до 4,0, Метиловый Оранжевый показывает переход от красного до желтого при рН от около 3,1 до 4,4 и Метиловый Красный показывает переход от красного до желтого при рН от около 4,2 до 6,3.

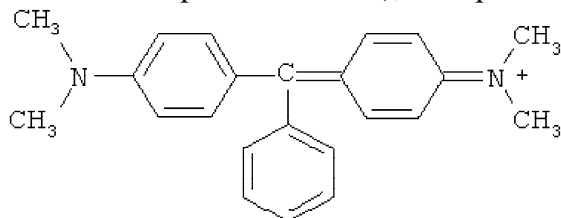
Арилметаны (например, диарилметаны и триарилметаны) составляют еще один класс подходящих рН-чувствительных индикаторов для применения в соответствии с данным изобретением. Триарилметановые лейкооснования, например, имеют следующую общую структуру:



где R , R' и R'' независимо выбирают из замещенных и незамещенных арильных групп, таких как фенил, нафтил, антраценил и т.д. Арильные группы могут быть замещены функциональными группами, такими как амина, гидроксильные, карбонильные, карбоксильные, сульфоновые, алкильные и/или другие известные функциональные группы. Примеры таких триарилметановых белых оснований включают Лейкомалахитовый Зеленый, Параросанилиновое основание, Кристаллический Фиолетовый Лактон, Кристаллический Фиолетовый Лейко, Кристаллический Фиолетовый, СИ Основной Фиолетовый 1, СИ Основной Фиолетовый 2, СИ Основной Синий, СИ Виктория Синий, N-бензоиллейкометилен и т.д. Также подходящие диарилметановые белые основания могут включать 4,4'-бис(диметиламино)бензгидрол (также известный как "гидрол Михлера"), лейкобензотриазол гидрола Михлера, лейкоморфолин гидрола Михлера, лейкобензолсульфонамид гидрола Михлера и т.д. В другом конкретном варианте индикатором является Лейкомалахитовый Зеленый Карбинол (Растворитель Зеленый 1) или его аналог, который обычно бесцветный и имеет следующую структуру:



В кислых условиях одна или более аминогрупп Лейкомалахитового Зеленого Карбинола могут быть протонированы с получением Малахитового Зеленого (также известного как Анилиновый Зеленый, Основной Зеленый 4, Бриллиантовый Зеленый В или Виктория Зеленый В), который имеет следующую структуру:



Малахитовый Зеленый обычно показывает переход от желтого до голубого-зеленого при pH от 0,2 до 1,8. При pH выше около 1,8, Малахитовый Зеленый приобретает глубокий зеленый цвет.

Другие подходящие pH-чувствительные индикаторы, которые могут применяться в тестовой полоске, включают Конго Красный, Литмус (азолитмин), Метиленовый Синий, Нейтральный Красный, Кислый Фуксин, Индиго Кармин, Бриллиантовый Зеленый, пикриновую кислоту, Метанил Желтый, м-Крезол Пурпурный, Квиналдин Красный, Тропазолин 00, 2,6-динитрофенол, Флоксин В, 2,4-динитрофенол, 4-диметиламиноазобензол, 2,5-динитрофенол, 1-нафтил Красный, Хлорфенол Красный, Гематоксилин, 4-нитрофенол, нитразин Желтый, 3-нитрофенол, Щелочной Синий, Эпсилон Синий, Найл Синий А, универсальные индикаторы и так далее. Например, Конго Красный показывает переход от голубого до красного при pH от около 3,0 до 5,2, Литмус показывает переход от красного до голубого при pH от около 4,5 до 8,3 и Нейтральный Красный показывает переход от красного до желтого при pH от около 11,4 до 13,0.

Кроме pH, другие механизмы также могут полностью или частично отвечать за изменение цвета индикаторов. Например, многие микроорганизмы (например, бактерии) образуют низкомолекулярные соединения, образующие комплексы с железом, в среде для роста, они известны как "сидерофоры". Образующие комплексы с металлами индикаторы могут применяться в некоторых вариантах данного изобретения, они меняют цвет в присутствии сидерофоров. Одним из особенно подходящих классов образующих комплексы с металлами индикаторов являются ароматические азосоединения, такие как Эриохром Черный Т, Эриохром Синий SE (Плазмокоринт В), Эриохром Синеватый В, Эриохром Цианин R, Ксиленоловый Оранжевый, Хром Азуrol S, карминовая кислота и т.д. Другие подходящие образующие комплексы с металлами индикаторы могут включать Ализарин Комплексон, Ализарин S, Арсеназо III, Ауриентрикарбоновую кислоту, 2,2'-бипиридин, Бромопирогаллол Красный, Калькой (Эриохром Синий Черный R), Кальконкарбоновую кислоту, Хромтропиновую кислоту, динатриевую соль, Купризон, 5-(4-диметиламинобензилиден)родамин, Диметилглиоксим, 1,5-дифенилкарбазид, Дитизон, Флуоресцеин Комплексон, Гематоксилин, 8-Гидроксихинолин, 2-Меркаптобензотиазол, Метилтимол Синий, Мурексид, 1-

Нитрозо-2-нафтол, 2-Нитрозо-1-нафтол, Нитрозо-R-соль, 1,10-Фенантролин, Фенилфлуорон, Фталеин Пурпурный, 1-(2-Пиридилазо)нафтол, 4-(2-Пиридилазо)резорцин, Пирогаллол Красный, Сульфоназо III, 5-Сульфосалициловая кислота, 4-(2-Тиазолилазо)резорцин, Торин, Тимолталексон, Тирон, Толурнр-3,4-дителиол, Цинкон и так далее. Необходимо отметить, что один или более из рН-чувствительных индикаторов, указанных выше, также могут быть классифицированы как индикаторы, образующие комплексы с металлами.

Хотя указанные выше индикаторы классифицированы на основе их механизма изменения цвета (например, рН-чувствительные, образующие комплексы с металлом или сольватохроматические), должно быть понятно, что данное изобретение не ограничено конкретным механизмом изменения цвета. Даже если применяются рН-чувствительный индикатор, например, другие механизмы, на самом деле, могут быть полностью или частично ответственны за изменение цвета индикатора. Например, реакции окисления-восстановления между индикатором и микроорганизмом могут влиять на изменение цвета.

Для получения тестовой полоски индикаторы могут быть нанесены на субстрат, такой как пленка, бумага, нетканое полотно, тканое полотно, вязанное полотно, пена, стекло и т.д. Например, материалы, применяемые для получения субстрата, могут включать, но не ограничены ими, натуральные, синтетические или природные материалы, которые синтетически модифицированы, такие как полисахариды (например, целлюлозный материал, такой как бумага и производные целлюлозы, такие как ацетат целлюлозы или нитроцеллюлоза); полиэфирсульфон; полиэтилен; найлон; фторид поливинилидена (ПВДФ); полиэстер; полипропилен; двуокись кремния; неорганические материалы, такие как деактивированная окись алюминия, диатомовая земля, $MgSO_4$ или другие неорганические тонкоизмельченные материалы, однородно распределенные в пористой полимерной матрице, с полимерами, такими как винилхлорид, сополимер винилхлорида-пропилена и сополимер винилхлорида-винилацетата; ткани, как природные (например, хлопок), так и синтетические (например, нейлон или вискоза); пористые гели, такие как силикагель, агароза, декстран и желатин; полимерные пленки, такие как полиакриламид; и так далее.

При желании индикатор может быть нанесен в форме композиции, которая содержит подвижный носитель. Носитель может быть жидким, газообразным, гелеобразным и т.д., и может быть выбран так, чтобы получить желаемые характеристики (время на изменение цвета, контраст между различными областями и чувствительность) индикатора. В некоторых вариантах, например, носителем может быть водный растворитель, такой как вода, а также неводный растворитель, такой как гликоли (например, пропиленгликоль, бутиленгликоль, триэтиленгликоль, гексиленигликоль, полиэтиленгликоль, этоксицигликоль и дипропиленгликоль); спирты (например, метанол, этанол, н-пропанол и изопропанол); триглицериды; этилацетат; ацетон; триацетин; ацетонитрил, тетрагидрофуран; ксилолы; формальдегиды (например, диметилформамид, "ДМФ"); и т.д.

Другие добавки также могут быть нанесены на тестовую полоску, либо отдельно, либо в смеси с композицией индикатора. В одном варианте, например, применяют циклодекстрины, которые, предположительно, ингибируют кристаллизацию индикатора, обеспечивая более яркий цвет и улучшая чувствительность определения. То есть отдельные молекулы индикатора обладают большей чувствительностью к микроорганизмам, так как каждая молекула индикатора может взаимодействовать с микробной мембраной. Наоборот, небольшие кристаллы индикатора сначала

растворяются, потом проникают в мембрану. Примеры подходящих циклодекстринов могут включать, но не ограничиваются ими, гидроксипропил- β -циклодекстрин, гидроксипропил- β -циклодекстрин, γ -циклодекстрин, гидроксипропил- γ -циклодекстрин и гидроксипропил- γ -циклодекстрин, которые коммерчески доступны от Cerestar International из Hammond, Indiana.

Поверхностно-активные вещества также могут улучшать контраст между различными индикаторами. Особенно желательными поверхностно-активными веществами являются неионные поверхностно-активные вещества, такие как этоксилированные алкилфенолы, этоксилированные и пропоксилированные жирные спирты, блоксополимеры этиленоксида-пропиленоксида, этоксилированные сложные эфиры жирных (C_8 - C_{18}) кислот, продукты конденсации этиленоксида с длинноцепными аминами или амидами, продукты конденсации этиленоксида со спиртами, ацетиленовые диолы и их смеси. Различные конкретные примеры подходящих неионных поверхностно-активных веществ включают, но не ограничены ими, метилглицерин-10, ПЭГ-20 дистеарат метилглюкозы, ПЭГ-20 полустеарат метилглюкозы, C_{11-15} парет-20, цетет-8, цетет-12, додоксинол-12, лаурет-15, ПЭГ-20 касторовое масло, полисорбат 20, стеарет-20, полиоксиэтилен-10 цетиловый эфир, полиоксиэтилен-10 стеариловый эфир, полиоксиэтилен-20 цетиловый эфир, полиоксиэтилен-10 олеиловый эфир, полиоксиэтилен-20 олеиловый эфир, этоксилированный нонилфенол, этоксилированный октилфенол, этоксилированный додецилфенол или этоксилированный жирный (C_6 - C_{22}) спирт, включая 3-20 этиленоксидные группы, полиоксиэтилен-20 изогексадециловый эфир, полиоксиэтилен-23 глицеринлаурат, полиоксиэтилен-20 глицерилстеарат, ППГ-10 эфир метилглюкозы, ППГ-20 эфир метилглюкозы, моноэфиры полиоксиэтилен-20 сорбитана, полиоксиэтилен-80 касторовое масло, полиоксиэтилен-15 тридециловый эфир, полиоксиэтилен-6 тридециловый эфир, лаурет-2, лаурет-3, лаурет-4, ПЭГ-3 касторовое масло, ПЭГ 600 диолеат, ПЭГ 400 диолеат и их смеси. Коммерчески доступные неионные поверхностно-активные вещества могут включать поверхностно-активные вещества на основе ацетиленового диола марки SURFYNOL® от Air Products and Chemicals из Allentown, Pennsylvania и поверхностно-активные вещества на основе полиоксиэтилена марки TWEEN® от Fischer Scientific из Pittsburgh, Pennsylvania.

Также может применяться связующее для усиления обездвиживания индикатора на субстрате. Например, растворимые в воде органические полимеры могут применяться в качестве связующих агентов, такие как полисахариды и их производные.

Полисахаридами являются полимеры, содержащие повторяющиеся углеводородные единицы, которые могут быть катионными, анионными, неионными и/или амфотерными. В одном конкретном варианте, полисахаридом являются неионный, катионный, анионный и/или амфотерный целлюлозный эфир. Подходящие неионные целлюлозные эфиры могут включать, но не ограничены ими, алкил целлюлозные эфиры, такие как метилцеллюлозы и этилцеллюлоза; гидроксипропилцеллюлозные эфиры, такие как гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилгидроксипропилцеллюлоза и гидроксипропилгидроксипропилцеллюлоза; алкилгидроксипропилцеллюлозные эфиры, такие как метилгидроксипропилцеллюлоза, метилгидроксипропилцеллюлоза, этилгидроксипропилцеллюлоза, метилэтилгидроксипропилцеллюлоза и метилэтилгидроксипропилцеллюлоза; и так далее.

Подходящие методики нанесения композиции индикатора на субстрат включают

печать, погружение, распыление, экструдирование расплава, нанесения покрытия (например, нанесение растворителя, нанесение порошка, нанесение кистью и т.д.), распыление и т.д. Методики печати могут включать, например, глубокую печать, флексографическую печать, трафаретную печать, лазерную печать, печать с термолентой, помповую печать и т.д. В одном конкретном варианте, струйную печать применяют для нанесения индикатора на субстрат. Струйная печать представляет собой бесконтактную печать, которая включает продавливание краски через миниатюрную форсунку (или ряд форсунок) с получением капель, которые направлены на субстрат. Обычно применяют две методики, например "КИ" (капельно-импульсную) или "непрерывную" струйную печать. В непрерывных системах краску выбрасывают в виде непрерывного потока под давлением через, по меньшей мере, одно отверстие или форсунку. Поток отклоняется приводом наддува и разбивается на капли на фиксированном расстоянии от отверстия. КИ системы, с другой стороны, используют привод наддува в каждом отверстии для разбивания краски на капли. Приводом наддува в каждой системе может быть пьезокристалл, акустическая матрица, тепловая матрица и т.д. Выбор типа струйной системы варьируется в зависимости от типа материала, распечатываемого с печатной головки. Например, проводящие материалы иногда требуются для непрерывных систем, так как капли электростатически отклоняются. Таким образом, если периодически опрашиваемый канал формируется из диэлектрического материала, методики КИ печати могут быть более желательны.

Композиция индикатора может быть сформирована в виде типографской краски с применением множества известных компонентов и/или методов. Например, типографская краска может содержать воду в качестве носителя, особенно деионизированную воду. Различные со-носители также могут быть включены в краску, такие как лактам, N-метилпирролидон, N-метилацетамид, N-метилморфолин-N-оксид, N,N-диметилацетамид, N-метилформамид, пропиленгликольмонометиловый эфир, тетраметилсульфон, трипропиленгликольмонометиловый эфир, пропиленгликоль и триэтаноламин (ТЭА). Также могут применяться увлажнители, такие как этиленгликоль; диэтиленгликоль; глицерин; полиэтиленгликоль 200, 300, 400 и 600; пропан 1,3 диол; пропиленгликольмонометиловые эфиры, такие как Dowanol PM (Gallade Chemical Inc., Santa Ana, CA); многоатомные спирты; или их сочетания. Также могут быть добавлены другие добавки для улучшения качества краски, такие как хелатирующие агенты для блокирования ионов металла, которые могут быть вовлечены в химические реакции в течение времени, ингибиторы коррозии для защиты металлических компонентов принтера или системы нанесения краски, и поверхностно-активные вещества для корректировки поверхностного натяжения краски. Различные другие компоненты, применяемые в красках, такие как стабилизаторы цвета, фотоинициаторы, связующие агенты, поверхностно-активные вещества, электролитные соли, pH корректоры и т.д. могут применяться как описано в патентах США №5681380 Nohr, et al. и 6542379 Nohr. et al., которые включены сюда полностью в качестве ссылок для всех целей.

Точное количество применяемого индикатора может варьироваться в зависимости от множества факторов, включая чувствительность индикатора, присутствие других добавок, желаемую степень обнаруживаемости (например, невооруженным глазом), предполагаемой концентрации микроорганизма и т.д. В некоторых случаях желательно определять только присутствие микроорганизмов в концентрациях, которые являются определенными пороговыми концентрациями (например,

патогенными). Например, бактериальная концентрация около 1×10^3 колониеобразующих единиц ("КОЕ") на миллилитр тестируемого образца или более, в некоторых вариантах, около 1×10^5 КОЕ/мл или более, в некоторых вариантах, около 1×10^6 КОЕ/мл или более, и в некоторых вариантах, около 1×10^7 КОЕ/мл может определяться в соответствии с данным изобретением. Таким образом, индикаторы могут применяться в количестве, достаточном для определяемого изменения цвета в присутствии бактерий в концентрации, по меньшей мере, около 1×10^3 КОЕ на миллилитр тестируемого образца. Например, индикатор может наноситься в концентрации от около 0,1 до около 100 миллиграммов на миллилитр носителя, в некоторых вариантах, от около 0,5 до около 60 миллиграммов на миллилитр носителя, и в некоторых вариантах, от около 1 до около 40 миллиграммов на миллилитр носителя.

Степень, до которой индикатор меняет цвет, может быть определена либо визуально, либо с применением инструментов. В одном варианте, интенсивность цвета измеряют с применением оптического считывающего устройства. Конфигурация и структура оптического считывающего устройства обычно варьируется, и это понятно специалисту в данной области техники. Обычно оптическое считывающее устройство содержит источник облучения, который способен испускать электромагнитное излучение, и детектор, который способен регистрировать сигнал (например, пропущенный или отраженный свет). Источником излучения может быть любое устройство, известное в данной области техники, которое способно испускать электромагнитное излучение, такое как свет в видимом или околоримидном спектре (например, инфракрасный или ультрафиолетовый свет). Например, подходящие источники излучения, которые могут применяться в соответствии с данным изобретением, включают, но не ограничены ими, светоизлучающие диоды (СИД), импульсные лампы, флуоресцентные лампы с холодным катодом, электролюминесцентные лампы и так далее. Излучение может быть мультиплексированным и/или коллимированным. В некоторых случаях излучение импульсным для снижения каких-либо фоновых помех. Далее, излучение может быть непрерывным или может объединять непрерывные волны (НВ) и импульсное излучение, где множественные лучи мультиплексированы (например, импульсный луч мультиплексирован с НВ лучом и сигнал вызывается импульсным источником. Например, в некоторых вариантах, СИД (например, алюминидно-галлиево-арсенидные красные диоды, галлиевые-фосфидные зеленые диоды, галлиевые-арсенидные-фосфидные зеленые диоды или индиевые-галлиевые-нитридные фиолетовые/голубые/ультрафиолетовые (УФ) диоды) применяют в качестве источника импульсного излучения. Одним из коммерчески доступных примеров подходящего УФ СИД диода возбуждения, подходящего для применения в соответствии с данным изобретением, является Model NSHU550E (Nichia Corporation), который излучает от 750 до 1000 микроватт оптической силы при прямом токе 10 миллиампер (3,5-3,9 вольт) в луч полной ширины при половине максимума 10 градусов, пиковой длине волны 370-375 нанометров и спектральной половине ширины 12 нанометров.

В некоторых случаях источник излучения может давать рассеянное излучение на индикатор. Например, сетка множества точечных источников света (например, СИД) может применяться для получения относительно рассеянного излучения. Другим, особенно желательным источником света, который способен давать рассеянное излучение в относительно недорогой манере является электролюминесцентное (ЭЛ) устройство. ЭЛ устройство обычно представляет собой конденсатор, в котором

применяется люминесцентный материал (например, частицы фосфора), проложенный между электродами, по меньшей мере, один из которых является прозрачным и позволяет свету выходить. Подача напряжения на электроды вызывает изменение электрического поля в люминесцентном материале, что вызывает испускание света.

5 Детектором может быть любое устройство, известное в данной области техники, которое способно чувствовать сигнал. Например, детектором может быть электронный датчик изображения, который сконфигурирован для пространственной селекции. Некоторые примеры таких электронных датчиков изображения включают
10 высокоскоростные линейные приборы с зарядовой связью (ПЗС), приборы с инъекцией заряда (ПИЗ), комплементарные металло-оксидные полупроводниковые (КМОП) приборы и так далее. Такие датчики изображения, например, включают двухмерные сетки электронных датчиков света, хотя также могут применяться
15 линейные датчики изображения, такие как, например, применяемые для сканирования изображений. Каждая сетка включает несколько известных уникальных положений, которые могут быть обозначены как «адреса». Каждый адрес в датчике изображения занят сенсором, который покрывает площадь (например, площадь, обычно имеющую форму коробки или прямоугольника). Эту площадь обычно обозначают как
20 «пиксель» или площадь пикселя. Пикселем датчика может быть, например, ПЗС, ПИЗ или КМОП сенсор, или любое другое устройство или сенсор, которые определяют или измеряют свет. Размер пикселей датчика может широко варьироваться, и в некоторых случаях может иметь диаметр или длину не менее 0,2 микрометра.

В других вариантах, датчиком может быть фотоэлемент, у которого отсутствуют
25 способности пространственной селекции. Например, примеры таких фотоэлементов могут включать фотоумножители, фотодиоды, такие как лавинные фотодиоды или кремниевые фотодиоды и так далее. Кремниевые фотодиоды иногда предпочтительны тем, что они недорогие, чувствительные, способны к высокоскоростному действию
30 (короткое время нарастания/большая ширина полосы) и легко интегрируются в большинство других полупроводниковых технологий и монолитных схем. Кроме того, кремниевые фотодиоды являются физически маленькими, что позволяет легко встраивать их в различные типы систем определения. Если применяют кремниевые фотодиоды, тогда интервал длины волны испускаемого сигнала может быть в
35 пределах их диапазона чувствительности, который составляет от 400 до 1100 нанометров.

В оптических считывающих устройствах обычно может применяться любая известная методика определения, включая, например, люминесценцию (например,
40 флуоресценцию, фосфоресценцию и т.д.), абсорбцию (например, флуоресцентную или не флуоресцентную), дифракцию и т.д. В одном конкретном варианте данного изобретения, оптическое считывающее устройство измеряет интенсивность цвета как функцию от абсорбции. В одном варианте, данные абсорбции считывают с применением микропланшетного ридера от Dynex Technologies of Chantilly, Virginia
45 (Model # MRX). В другом варианте, данные абсорбции считывают с применением обычного теста, известного как "CIELAB", который описан в Pocket Guide to Digital Printing by F.Cost, Delmar Publishers, Albany, NY. ISBN 0-8273-7592-1 на страницах 144 и 145. Этот способ определяет три переменных, L^* , a^* и b^* , которые соответствуют
50 трем характеристикам воспринимаемого цвета на основе оппонентной теории восприятия цвета. Три переменных имеют следующее значение:

L^* - яркость (или светлота) варьируется от 0 до 100, где 0 - темный и 100 - светлый;
 a^* - ось красный/зеленый, варьируется приблизительно от -100 до 100;

положительные значения являются красноватыми и отрицательные значения являются зеленоватыми; и

b^* - ось желтый/синий, варьируется приблизительно от -100 до 100; положительные значения являются желтоватыми и отрицательные значения являются синеватыми.

Так как цветовое пространство CIELAB некоторым образом является визуально неоднородным, может быть рассчитано единое число, которое представляет разницу между двумя цветами, как они воспринимаются человеком. Эту разницу обозначают как ΔE и рассчитывают как квадратный корень из суммы квадратов трех разностей (ΔL^* , Δa^* и Δb^*) между двумя цветами. В цветовом пространстве CIELAB каждая единица ΔE приблизительно равна "порогу" чувствительности между двумя цветами. Поэтому CIELAB является хорошей мерой для независимой от объективного прибора системы идентификации цвета, которая может применяться как ссылочное цветовое пространство в целях управления цветом и выражения изменений в цвете. Применяя этот тест, интенсивность цвета (L^* , a^* и b^*) может быть измерена с применением, например, ручного спектрофотометра от Minolta Co. Ltd. of Osaka, Japan (Model # CM2600d). В этом инструменте применяется D/8 геометрия, соответствующая CIE No.15, ISO 7724/1, ASTM E1164 и JIS Z8722-1982 (рассеянное излучение/8-градусная оптика). D65 свет, отражаемый от поверхности образца под углом 8 градусов к нормали поверхности, попадает в измеряющую образец оптическую систему. Еще одним подходящим оптическим считывающим устройством является отражательный спектрофотометр, описанный в публикации заявки на патент США №2003/0119202 Kaylor, et al., которая включена сюда в качестве ссылки полностью для всех целей. Также, системы определения, работающие в режиме передачи, также могут применяться в соответствии с данным изобретением.

Описанные выше методики скрининга могут применяться множеством способов в соответствии с данным изобретением. Например, может применяться тестовая полоска, которая имеет зону определения, которая включает любое количество отдельных областей определения (например, линий, точек, полосок и т.д.) так, чтобы пользователь мог наилучшим образом определить присутствие вирусов, бактерий или других микроорганизмов в тестируемом образце. Каждая область может содержать одинаковые индикаторы или может содержать разные индикаторы для взаимодействия с различными типами микроорганизмов. В одном конкретном варианте, тестовая полоска включает сетку индикаторов, которые обеспечивают различные спектральные реакции (например, схемы цветов) или "отпечатки" для определенных типов вирусов. Например, сетка может давать определенную спектральную реакцию в присутствии риновирусов, но абсолютно другую реакцию в присутствии вирусов гриппа, вирусов парагриппа человека или других вирусов, обычно связанных с состояниями верхних дыхательных путей. Также, сетка может обеспечивать определенную спектральную реакцию в присутствии грамположительных бактерий, но абсолютно другую реакцию в присутствии грамотрицательных бактерий.

При применении сетка может содержать множество отдельных областей (обозначенных как "адреса"), расположенных в определенном порядке. Адреса содержат индикатор, способный менять цвет в присутствии конкретного микроорганизма. Выбор индикаторов для сетки не является критичным для данного изобретения пока такая сетка дает различные спектральные реакции. Отдельные адреса в сетке могут быть сконфигурированы множеством путей для достижения этой цели. В одном конкретном варианте, отдельные адреса в сетке могут содержать

индикаторы, каждый из которых демонстрирует отдельную спектральную реакцию в присутствии специфических типов вирусов, бактерий или других микроорганизмов. Конечно, спектральная разница между отдельными адресами в сетке не всегда обеспечивается применением различных индикаторов. Например, одинаковые
 5 индикаторы могут применяться в отдельных адресах в сетке, но в различных концентрациях так, чтобы обеспечивать различную спектральную реакцию. Также определенные адреса могут содержать одинаковые индикаторы в одинаковой концентрации, в то время как целая сетка способна давать различные спектральные
 10 реакции.

Кроме композиции конкретного адреса в сетке, множество других аспектов сетки могут селективно контролироваться для улучшения его способности обеспечивать отдельные спектральные реакции. Одним из факторов, который влияет на
 15 способность сетки обеспечивать отдельные спектральные реакции является количество адресов в сетке, а именно большее количество отдельных адресов в сетке может улучшать степень изменения спектральной реакции на различные микроорганизмы. Однако чрезмерно большое количество адресов в сетке также может привести к затруднениям в визуальной дифференциации спектральных реакций.
 20 Таким образом, в большинстве вариантов данного изобретения сетка содержит от 2 до 50 адресов в сетке, в некоторых вариантах, от 3 до около 40 адресов в сетке, и в некоторых вариантах, от 4 до 20 адресов в сетке. Количество адресов, применяемых в сетке, в значительной степени зависит, по меньшей мере, частично, от природы выбранных индикаторов. То есть если выбранный индикатор имеет одинаковое
 25 изменение цвета в присутствии микроорганизма, большое количество адресов может быть необходимо для получения желаемой спектральной реакции.

Другим аспектом сетки, который может влиять на характерную спектральную реакцию, является шаблон (например, размер, расстояние, расположение и т.д.)
 30 отдельных адресов в сетке. Отдельные адреса в сетке могут иметь размер, эффективный для визуального наблюдения без ненужного увеличения размера тестовой полоски. Размер адреса может, например, варьироваться от около 0,01 до около 100 миллиметров, в некоторых вариантах, от около 0,1 до около 50 миллиметров, и в некоторых вариантах, от около 1 до около 20 миллиметров. Форма
 35 адреса также может улучшать визуальное наблюдение спектральной реакции. Например, адреса могут быть в виде полосок, лент, точек или любой другой геометрической формы. Адреса также могут быть расположены, адреса также могут быть отделены на определенное расстояние для получения более видимой
 40 спектральной реакции. Расстояние между двумя или более отдельными адресами в сетке, например, варьируется от около 0,01 до около 100 миллиметров, в некоторых случаях, от около 0,1 до около 50 миллиметров, и в некоторых вариантах, от около 1 до около 20 миллиметров. Общий шаблон сетки может принимать, виртуально, любую желаемую форму.

45 Сетка индикаторов может применяться множеством способов обеспечения информации относительно состояния верхних дыхательных путей. В одном варианте, тестируемый образец может быть получен из верхних дыхательных путей пациента любым устройством для сбора образцов, таким как тампон на стержне, палочка,
 50 шприц и т.д. После получения образец может быть помещен на тестовую полоску, имеющую сетку индикаторов. При желании устройство для забора образцов и тестовая полоска могут поставляться вместе в форме диагностического набора, который может включать другие наименования, такие как инструкции, контрольные

полоски, раствор для предварительной обработки и т.д. Например, может применяться раствор для предварительной обработки, который содержит поверхностно-активное вещество, такое как описано выше, в качестве смачивающего агента для образца.

Согласно Фиг.1А, например, показан один из вариантов данного изобретения, где сетка 181 сформирована на субстрате 180. Сетка 181 включает индикатор широкого спектра 183 (например, краситель Рейхардта). Когда индикатор 183 меняет цвет (Фиг.1В), пользователь получает предупреждение о присутствии бактерий в образце.

Также, когда индикатор широкого спектра 183 остается практически таким же или только слегка меняет цвет (Фиг.1С), пользователь получает предупреждение, что образец может содержать другие патогены (например, вирусы), или что симптомы вызваны другими причинами, такими как аллергии. Если желательно далее дифференцировать тип присутствующей бактерии, в сетке 181 также может применяться первый адрес 185 который меняет цвет определенным образом в присутствии конкретных типов бактерий. Например, первый адрес 185 может содержать индикатор, который показывает спектральную реакцию в присутствии грамотрицательных бактерий, которая отличается от его спектральной реакции в присутствии грамположительных бактерий. Другие адреса также могут применяться для дальнейшей идентификации типа присутствующих бактерий. Если желательно далее дифференцировать вирусы, которые могут присутствовать, в сетке 181 также может применяться второй адрес 187, который меняет цвет определенным образом в присутствии конкретных типов вирусов. Например, второй адрес 187 может содержать индикатор, который показывает спектральную реакцию в присутствии риновирусов, которая отличается от его спектральной реакции в присутствии вирусов гриппа или парагриппа человека. Должно быть понятно, что нет необходимости в применении отдельных адресов в соответствии с данным изобретением, и при сочетании с информацией, даваемой индикатором широкого спектра, одного адреса может быть достаточно, например, индикатор широкого спектра может менять цвет, тем самым, предполагая присутствие бактерий в образце. С учетом этой информации, далее может быть исследован только один адрес для определения присутствия грамположительных или грамотрицательных бактерий.

Так или иначе, спектральная реакция индикатора(ов) может давать информацию о присутствии микроорганизмов, с которыми он контактировал. При желании, реакция индикатора(ов) (или сетки индикаторов) может сравниваться с контрольным индикатором (или сеткой индикаторов), полученным так, чтобы он был такой же или похож на тестовый индикатор(ы) в отношении реакции на микроорганизмы. Сравнение может проводиться визуально или с помощью инструмента, также может применяться множество контрольных индикаторов, которые соответствуют различным типам микроорганизмов в определенных концентрациях. При сравнении микроорганизм может быть идентифицирован выбором контрольного индикатора, имеющего такую же или практически такую же реакцию, как и тестовый индикатор, и затем проведено сравнение выбранного контроля с конкретным микроорганизмом или классом микроорганизмов.

В результате данного изобретения было обнаружено, что присутствие бактерий, вирусов или других микроорганизмов могут быть легко определено с применением индикаторов, которые определимо меняют цвет. Изменение цвета является быстрым и может быть определено за относительно короткий период времени. Например, изменение может произойти за 30 минут или менее, в некоторых вариантах за около 10

минут или менее, в некоторых вариантах за около 5 минут или менее, в некоторых вариантах за около 3 минуты или менее, и в некоторых вариантах за от около 10 минут до около 2 минут. Таким образом, индикатор может обеспечивать в режиме «реального времени» определение присутствия или отсутствия микроорганизмов.

Такое определение в режиме «реального времени» может предупредить пользователя или терапевта о необходимости лечения (например, антибиотиком). С другой стороны, отсутствие определенного изменения цвета может предоставить пользователю или терапевту уверенность, что образец не содержит инфекции.

Данное изобретение может быть лучше понято при рассмотрении представленных ниже примеров.

ПРИМЕРЫ

Применяемые материалы

Все реагенты и растворители получают от Sigma-Aldrich Chemical Company, Inc. из St. Louis, Missouri, если не указано иного, и применяют без дальнейшей очистки.

Микроорганизмы, применяемые в исследовании, включают:

1. Грамотрицательные (жизнеспособные)

- *Escherichia coli* (ATCC # 8739) (*E. coli*)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC # 9027) (*P. aeruginosa*)
- *Salmonella choleraesuis* (Gibraltar Laboratories) (*S. choleraesuis*)
- *Haemophilus influenzae* (ATCC # 49247) (*H. influenzae*)
- *Moraxella lacunata* (ATCC # 17972) (*M. lacunata*)

2. Грамположительные (жизнеспособные)

- *Staphylococcus aureus* (ATCC # 6538) (*S. aureus*)
- *Bacillus anthracis* (Gibraltar Laboratories) (*A. bacillus*)
- *Streptococcus pyogenes* (ATCC # 10782) (*S. pyogenes*)
- *Streptococcus pneumoniae* (ATCC # 10015) (*S. pneumoniae*)

3. Дрожжи (жизнеспособные)

- *Candida albicans* (ATCC # 10231) (*C. albicans*)

4. Плесень (жизнеспособная)

- *Aureobasidium pullulans* (ATCC # 16622) (*A. pullulans*)
- *Penicillium janthinellum* (ATCC # 10069) (*P. janthinellum*)

5. Вирусы (жизнеспособные) (Gibraltar Laboratories)

- Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) (ATCC # VR-260)
- Herpes Simplex Virus 2 (HSV-2) (ATCC # VR-734)
- Adenovirus Type 2 (Adeno 2) (ATCC # VR-846)
- Adenovirus Type 5 (Adeno 5) (ATCC # VR-5)
- Coronavirus (ATCC # VR-740)
- Rhinovirus Type 42 (получен 5/13/82 от Hoffman La Roche)
- Influenza A (H2N2) (ATCC # VR-100)
- Influenza A (ATCC # VR-544)
- Parainfluenza 1 (Sendai) (ATCC # VR-105)
- Influenza Avian (ATCC # VR-797)

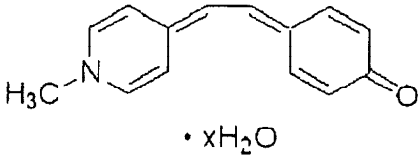
Все штаммы гриппа выращивают в куриных зародышах, и для остальных вирусов, за исключением коронавируса, применяют клетки почек VERO-Kidney от африканских зеленых макак в качестве хозяина. Коронавирус выращивают в человеческих диплоидных клетках WI-38, полученных из ткани легких женщины.

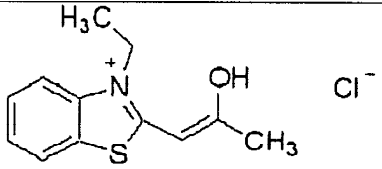
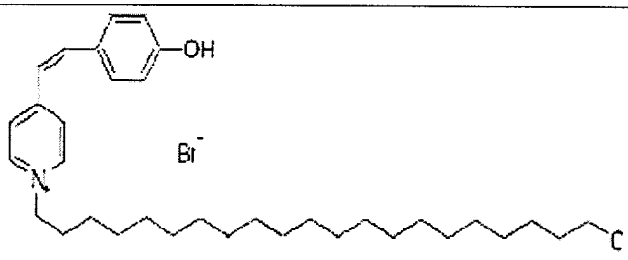
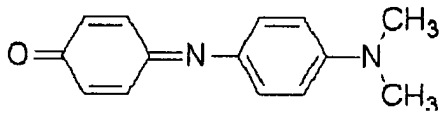
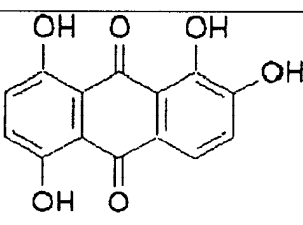
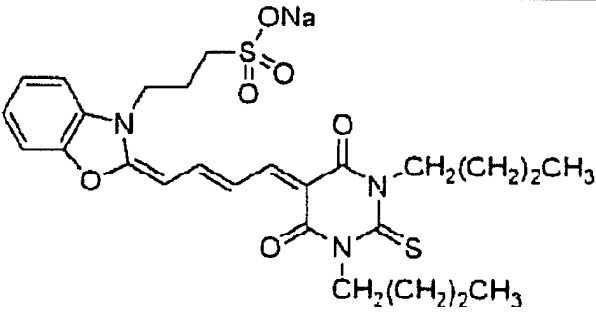
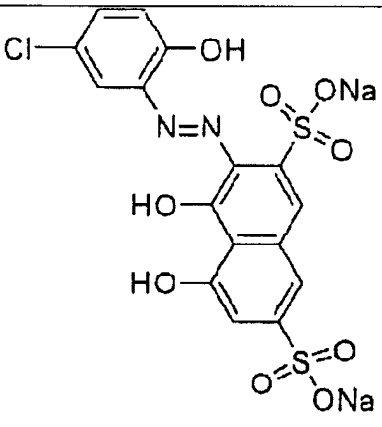
Модифицированную методом Игла среду Дульбекко (DMEM) с 5% фетальной бычьей сывороткой (FBS) применяют в качестве культуральной для всех вирусов, за

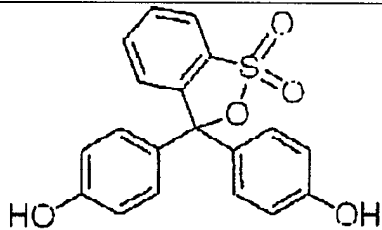
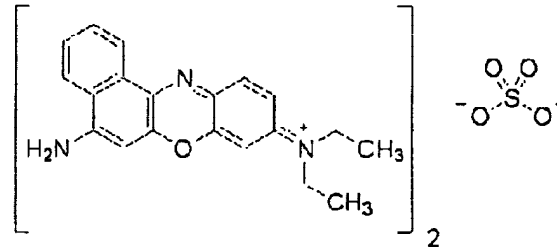
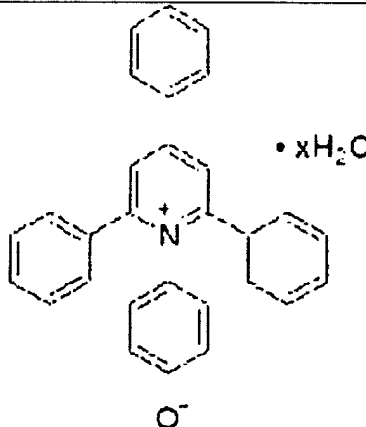
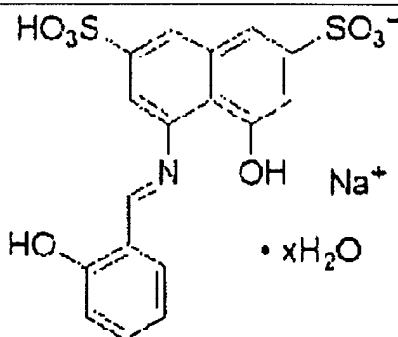
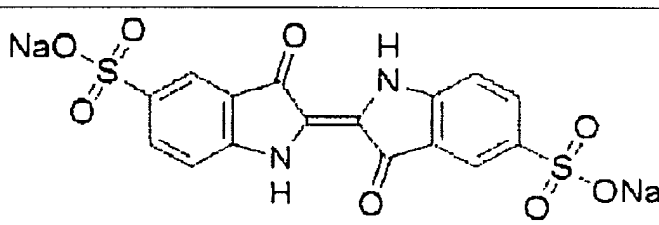
исключением выращенных в куриных зародышах. Хорионаллантоисную жидкость (CAF) применяют для вирусов, выращенных в системе, применяющей куриные зародыши.

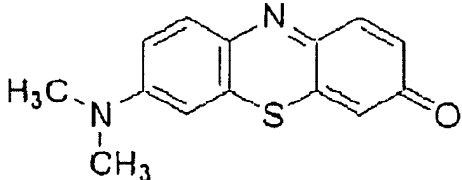
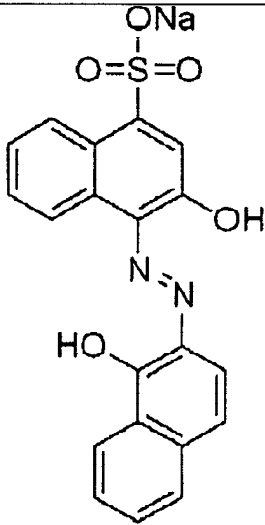
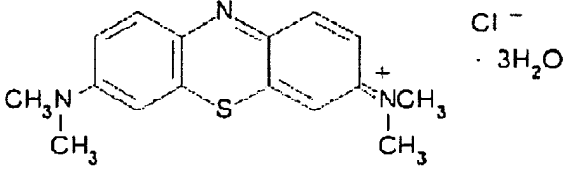
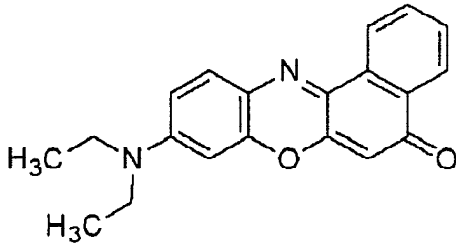
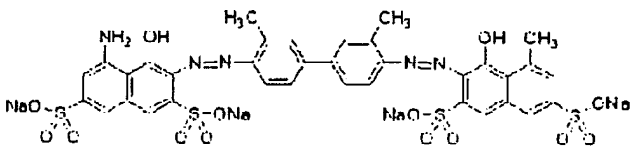
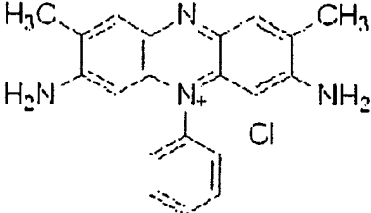
Индикаторы, применяемые в исследовании, приведены с их молекулярной структурой в Таблице 1.

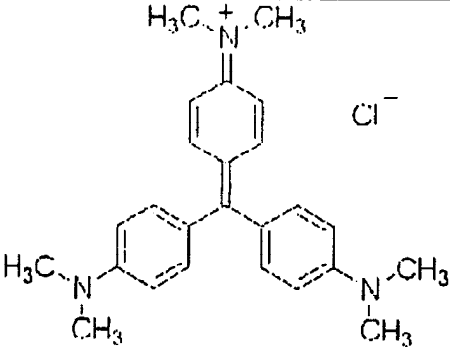
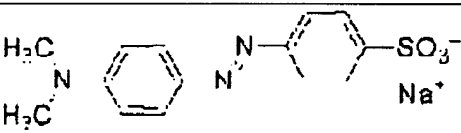
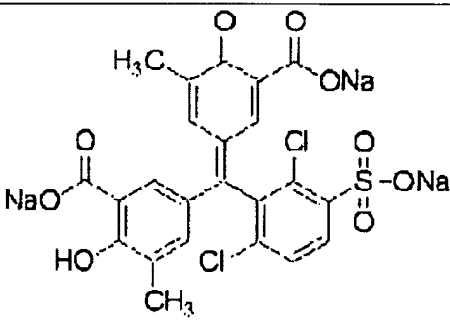
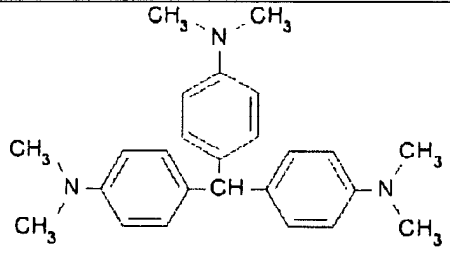
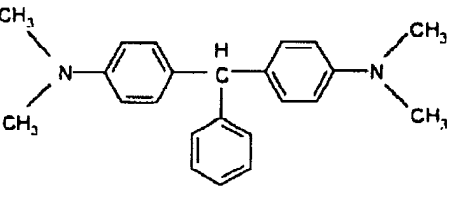
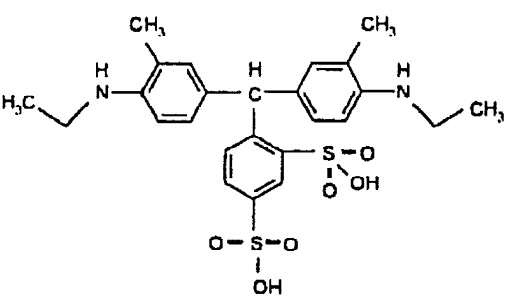
Таблица 1: типовые индикаторы и их соответствующие структуры

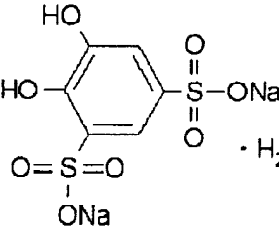
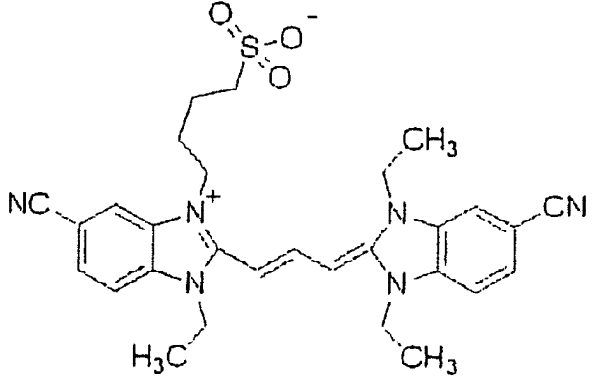
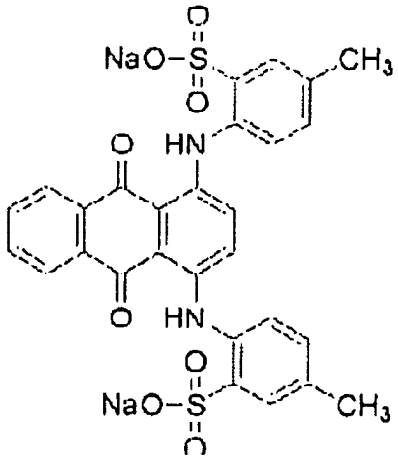
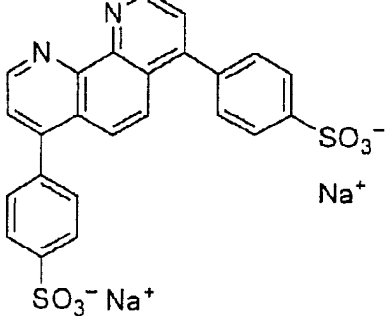
Индикатор	Структура
Гидрат 4-[(1-метил-4(1H)-пиридилиден)этилиден]-2,5-циклогексадиен-1-она	

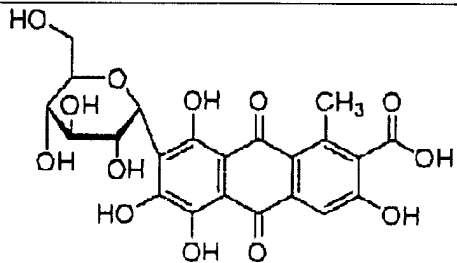
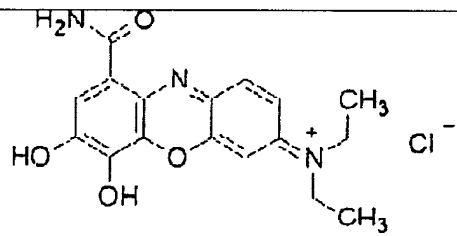
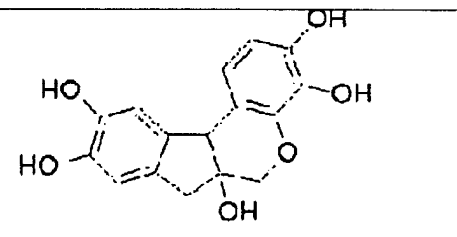
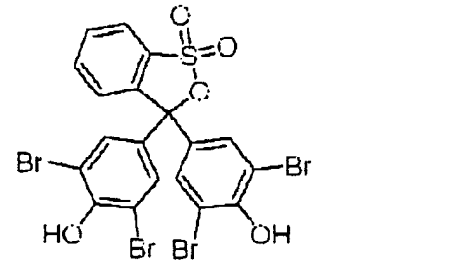
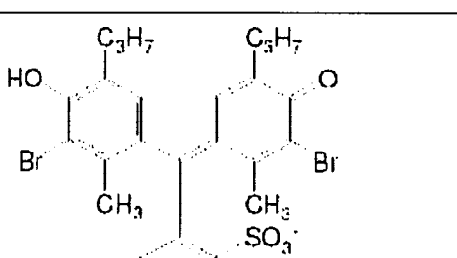
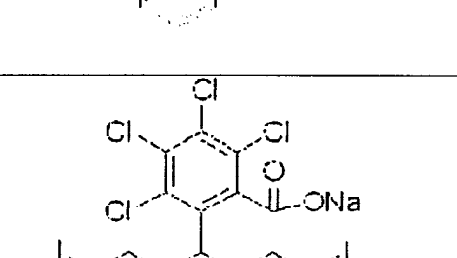
Хлорид 3-этил-2-(2-гидрокси-1-пропенил)бензотиазолия	
Бромид 1-докосил-4-(4-гидроксистирил)пиридиния	
N,N-Диметилиндоанилин	
Квинализарин	
Мероцианин 540	
Эриохром Синий SE	

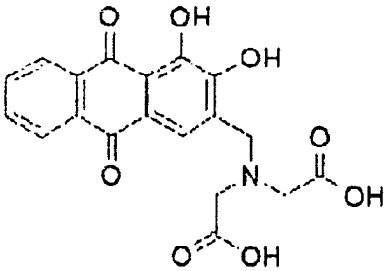
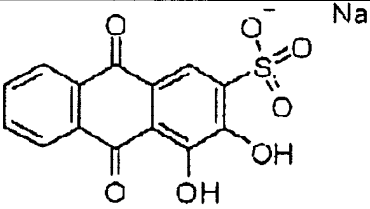
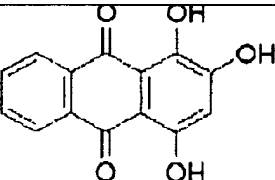
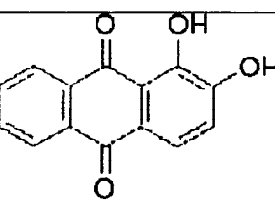
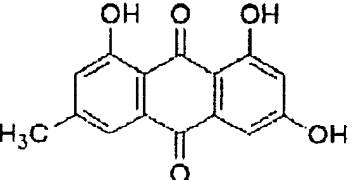
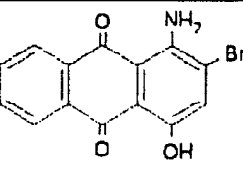
Феноловый Красный	
Найл Синий А	
Гидрат внутренней соли гидроксида 1-(4-Гидроксифенил)-2,4,6-трифенилпиридиния	
Гидрат азометин-Н мононатриевой соли	
Индигокармин	

Метиленовый Фиолетовый	
Эриохром Сине-черный В	
Метиленовый Синий	
Найл Красный	
Трипан Синий	
Сафранин О	

Кристаллический Фиолетовый	
Метиловый Оранжевый	
Хромазурол S	
Лейкокристаллический Фиолетовый	
Лейкомалахитовый Зеленый	
Лейкоксилен цианол FF	

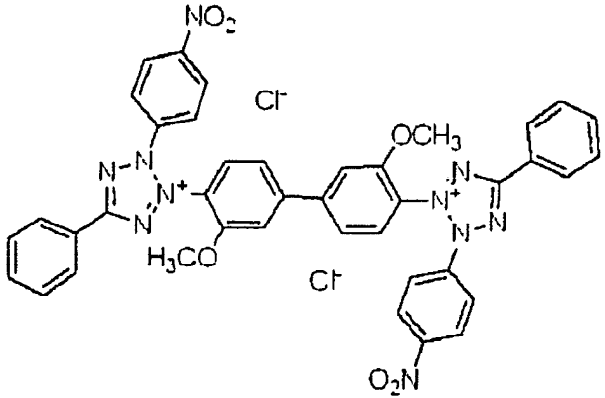
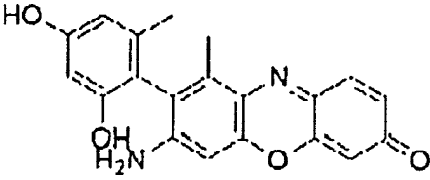
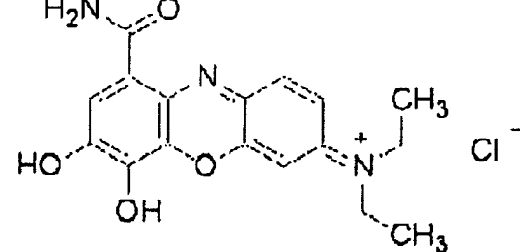
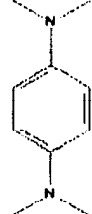
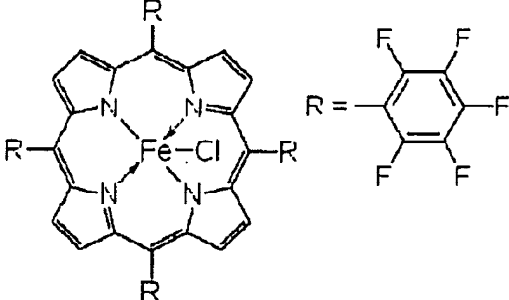
Моногидрат динатриевой соли 4,5-дигидрокси-1,3-бензолдисульфоновой кислоты	
Внутренняя соль гидроксида 5-циано-2-[3-(5-циано-1,3-диэтил-1,3-дигидро-2Н-бензмимдазол-2-илиден)-1-пропенил]-1-этил-3-(4-сульфобутил)-1Н-бензимидазолия	
Кислый Зеленый 25	
Тригидрат динатриевой соли батофенантролиндисульфоной кислоты	

Карминовая кислота	
Целестин Синий	
Гематоксилин	
Бромфеноловый Синий	
Бромтимоловый синий	
Бенгальский Розовый	

	Универсальный индикатор 0-5	не доступна
	Универсальный индикатор 3-10	не доступна
5	Ализарин Комплексон	
10		
15	Ализариновый Красный S	
20	Пурпурин	
25		
30	Ализарин	
35	Эмодин	
40	Амино-4-гидроксиантрахинон	
45		

50

5	Ядерный Быстрый Красный	
10	Хлорфеноловый Красный	
20	Ремазол Бриллиантовый Синий	
30	Процион Синий HB	
40	Фенолфталеин	
45	Нингидрин	

Нитросиний тетразолий	
Орцеин	
Целестин синий	
Диамин тетра метил-пара-фенилена (TMPD)	
хлорид 5,10,15,20-тетра-кис(пентафторфенил)порфирина железа	

ПРИМЕР 1

Различные индикаторы тестируют на их способность изменять цвет в присутствии микроорганизмов *S.aureus*, *E.coli* и *C.albicans*. Тестируемые индикаторы включают краситель Рейхардта, бромид 1-докозил-4-(4-гидроксистирил)пиридиния, хлорид 3-этил-2-(2-гидрокси-1-пропенил)-бензотиазолия, гидрат 4-[(1-метил-4(1H)-пиридилиден)этилиден]-2,5-циклогексадиен-1-она, N,N-диметилиндоанилин, Хинализарин, Мериоцианин 540, Эриохром® Синий SE (Плазмокоринт В), Феноловый

Красный, Найл Синий А, гидрат внутренней соли гидроксида 1-(4-гидроксифенил)-2,4,6-трифенилпиридиния, гидрат моноватриевой соли азометина-Н, Индигокармин, Метиленовый Фиолетовый, Эриохром® Сине-черный В, раствор кислотного фуксина-алого Бибриха, Метиленовый Синий, Найл Красный, Трипан Синий, Сафранин О,
5 Кристаллический Фиолетовый, Метиловый Оранжевый и Хромазурол S.

Если не указано иного, индикаторы растворяют в диметилформамиде (ДМФ). Растворы индикатора затем капают пипеткой на 15 см фильтровальную бумагу (от VWR International - Catalog No.28306-153) и высушивают. Фильтровальную бумагу
10 разделяют на сектора для тестирования четырех (4) образцов - т.е. *S.aureus*, *E.coli*, *C.albicans* и стерильной воды. 100 микролитров 10^7 КОЕ/мл *S.aureus* капают пипеткой на фильтровальную бумагу в первый сектор, 100 микролитров 10^7 КОЕ/мл *E.coli* капают пипеткой на фильтровальную бумагу во второй сектор, 100 микролитров 10^6
15 КОЕ/мл *C.albicans* капают пипеткой на фильтровальную бумагу в третий сектор и стерильную воду капают пипеткой в последний сектор.

Изменение цвета индикаторов наблюдают и записывают для каждого тестируемого образца. Цвет записывают сразу же после изменения для ингибирования выцветания (или потери интенсивности) цветов при высушении образцов. В таблице 2 показаны
20 наблюдения этого эксперимента.

Таблица 2. Наблюдения изменения цвета индикатора (Группа 1)

Индикатор	Исходный цвет	Изменение цвета к <i>S. aureus</i>	Изменение цвета к <i>E. coli</i>	Изменение цвета к <i>C. albicans</i>	Изменение цвета к стерильной воде
краситель Рейхардта	Синий	Бесцветный	Бесцветный	Бесцветный	Без изменений
бромид 1-докозил-4-(4-гидроксистирил)пиридиния	Желтый	Очень бледно-оранжевый	Бледно-оранжевый	Бледно-оранжевый	Очень бледно-оранжевый
хлорид 3-этил-2-(2-гидрокси-1-пропенил)-бензотиазолия	Белый/кремовый	Без изменений	Без изменений	Без изменений	Без изменений
гидрат 4-[(1-метил-4(1H)-	Ярко-желтый	Без изменений	Без изменений	Без изменений	Без изменений

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

пиридинили- ден)этилиден]- 2,5- циклогексади- ен-1-она					
N,N- диметилиндоа- нилин	Серый	Бледно- розовый	Очень бледно- розовый	Очень бледно- розовый	Без изме- нений
Хинализарин	Персико- вый	Желтый	Бледно- пурпур- ный	Пурпур- ный	Без изме- нений
Мероцианин 540	Ярко- розовый	Светло- пурпур- ный	Желто- вато- розовый	Более яркий желтова- то- розовый	Краснова- то-розовый
Эриохром® Си- ний SE (Плаз- мокоринт В)	Темно- розовый	Очень бледно- пурпур- ный	Пурпур- ный	Темно- пурпур- ный	Розовый с темно- розовым краем (рас- творение)
Феноловый Красный	Желтый	Желтый с оран- жевым краем	Оранже- вый	Темно- красный/ оранже- вый	Зеленый с оранжевым краем

	Найл Синий А	Синий	Розовый	Розовый	Розовый	Без изменений
5	гидрат внут-					
10	ренней соли 1-					
	(4-					
	гидроксифе-	Желтый	Без из-	Без из-	Без из-	Без изме-
15	нил)-2,4,6-		менений	менений	менений	нений
	трифенилпи-					
	ридиния					
20			Более	Более	Более	Более
	гидрат монона-	Желтый/	светлый	светлый	светлый	светлый с
25	триевой соли	персико-	с более	с более	с более	более тем-
	азометина-Н	вый	темным	темным	темным	ным краем
30			краем	краем	краем	(растворе-
			(раство-	(раство-	(раство-	ние)
			рение)	рение)	рение)	
35			Более	Более	Более	Светло-
	Индигокармин	Светло-	темный	темный	темный	синий с бо-
40		синий	светло-	светло-	светло-	лее тем-
			синий	синий	синий	ным краем
45						(растворе-
						ние)
50	Метиленовый	Темно-	Более	Более	Более	Без изме-
	Фиолетовый	синий/	темно-	темно-	темно-	нений
		фиолето-	синий	синий	синий	

		вый				
5 10	Эриохром® Сине-черный В	Темный грязно- пурпур- ный	Более светлый грязно- пурпур- ный	Темно- пурпур- ный	Темно- пурпур- ный	Более тем- ный грязно- пурпурный
15 20 25	раствор кисло- те фуксина в алой Бибриха	Ярко- красный	Более светлый с тем- ным кра- ем (рас- творе- ние)	Более светлый с тем- ным кра- ем (рас- творе- ние)	Более светлый с тем- ным кра- ем (рас- творе- ние)	Более светлый с темным краем (рас- творение)
30	Метиленовый Синий*	Ярко- синий	Без из- менений	Без из- менений	Без из- менений	Без изме- нений
35	Найл Красный	Ярко- пурпур- ный	Светло- розовый	Светло- розовый	Светло- розовый	Бледно- розовый
40 45	Трипан Синий*	Темно- синий	Без из- менений	Без из- менений	Без из- менений	Более светлый с темным краем (рас- творение)
50	Сафранин О	Ярко- лососе-	Желто- ватый с	Желто- ватый с	Желто- ватый с	Розоватый с лососе-

5		вый	лососе- вым кра- ем	лососе- вым кра- ем	лососе- вым кра- ем	вым краем
10	Кристалличе- ский Фиолето- вый	Темно- синий	Без из- менений	Без из- менений	Без из- менений	Более светлый с темным краем (рас- творение)
15						
20	Метиловый Оранжевый	Ярко- оранже- вый	Желтый	Желтый	Желтый	Светло- оранжевый с темно- оранжевым краем (рас- творение)
25						
30			Светло- оранже- вый с	Светло- желтый с	Светло- желтый с	Светло- розовый с
35	Хромазурол S	Розовый	темно- оранже- вым кра- ем	темно- розовым краем	темно- розовым краем	темно- розовым краем
40						

* растворенный в воде

45 За исключением Метилового Оранжевого, Найл Красного и Мерицианина 540, наблюдаемое изменение цвета происходило практически немедленно (от 1 до 2 минут).

ПРИМЕР 2

50 Различные индикаторы тестируют на их способность изменять цвет в присутствии микроорганизмов *S.aureus*, *E.coli* и *C.albicans*. Тестируемые индикаторы включают Лейкоккристаллический Фиолетовый, Лейкомалахитовый Зеленый, Лейкоксилен цианол FF, моногидрат динатриевой соли 4,5-дигидрокси-1,3-бензолдисульфоновой кислоты, внутренняя соль гидроксида 5-циано-2-[3-(5-циано-1,3-диэтил-1,3-дигидро-2Н-

бензимидазол-2-илиден)-1-пропенил]-1-этил-3-(4-сульфобутил)-1Н-бензимидазолия, Кислый Зеленый 25, тригидрат динатриевой соли батофенантролиндисульфоновой кислоты, карминовая кислота, Целестин Синий, Гематоксилин, Бромфеноловый Синий, Бромтимоловый Синий, Бенгальский Розовый, Универсальный индикатор (0-5) и универсальный индикатор (3-10). Если не указано иного, индикаторы растворяют в диметилформамиде (ДМФ). Фильтровальную бумагу VWR и индикаторы готовят как описано в Примере 1. В таблице 3 показаны наблюдения этого эксперимента.

Таблица 3. Наблюдения изменения цвета индикатора (Группа 2)

Индикатор	Исходный цвет	Изменение цвета к <i>S. aureus</i>	Изменение цвета к <i>E. coli</i>	Изменение цвета к <i>C. albicans</i>	Изменение цвета к стерильной воде
-----------	---------------	------------------------------------	----------------------------------	--------------------------------------	-----------------------------------

5	Лейкокристиаллический Фиолетовый	Белый	Синий	Синий	Синий	Без изменений
10	Лейкомалахитовый Зеленый	Белый	Зеленый	Зеленый	Зеленый	Без изменений
15	Лейкоксиленцианол FF	Белый	Без изменений	Без изменений	Без изменений	Без изменений
20	моногидрат	Белый	Без изменений	Без изменений	Без изменений	Без изменений
25	динатриевой соли 4,5-					
30	дигидрокси-1,3-					
35	бензолдисульфоновой кислоты*					
40	внутренняя соль гидроксида 5-	Яркий красноватый розовый	Темно-розовый	Темный пурпурно-розовый	Темный зеленоватый розовый	Светло-розовый с темно-розовым краем (растворение)
45	циано-2-[3-					
50	(5-циано-1,3-диэтил-1,3-дигидро-					

5	2Н-бензимидазол-2-илиден)-1-пропенил]-1-этил-3-(4-сульфобутил)-1Н-бензимидазолия					
10						
15						
20						
25	Кислый Зеленый 25	Зеленый	Светло-зеленый с темно-зеленым краем (растворение)	Светло-зеленый с темно-зеленым краем (растворение)	Светло-зеленый с темно-зеленым краем (растворение)	Светло-зеленый с темно-зеленым краем (растворение)
30						
35						
40	тригидрат динатриевой соли бато-фенантролиндисульфоновой кислоты**	Белый	Без изменений	Без изменений	Без изменений	Без изменений
45						
50	карминовая	Красно-	Бледно-	Пурпур-	Темно-	Светло-

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

кислота*	то-персиковый	пурпурный	ный	пурпурный	персиковый с темно-персиковым краем (растворение)
Целестин Синий	Темно-лавандовый	Синий	Синий	Синий	Синий
Гематоксилин	Бледно-желтый	Без изменений	Светло-пурпурный	Более темный пурпурный	Светло-желтый с темно-желтым краем (растворение)
Бромфеноловый Синий	Ярко-желтый	Темно-синий	Темно-синий	Темно-синий	Светло-желтый с оранжеватым краем (растворение)
Бромтимоловый Си-	Желтый	Светло-желтый с	Светло-зеленый	Более темный	Светло-желтый/

5	ний		темно- желтым краем		зеленый	беловатый с темно- желтым краем (растворе- ние)
10						
15	Бенгальский	Ярко- розовый	Более темный розовый	Пурпурно- розовый	Краснова- то- розовый	Белый с темно- розовым краем (растворе- ние)
20	Розовый					
25						
30	Универ- сальный ин- дикатор (0- 5)	Желтова- то- зеленый	Желтова- то-синий	Желтова- то-синий	Желтова- то-синий	Светло- зеленый с темно- зеленым краем (растворе- ние)
35						
40	универсаль- ный индика- тор (3-10)	Персико- вый	Розовато- персико- вый	Оранже- во- желтый	Желтый	Темно- персико- вый
45						

* растворен в воде

** растворен в ДМФ и воде

За исключением Лейкокристаллического Фиолетового, Лейкомалахитового Зеленого и Лейкоксилена цианола FF, наблюдаемое изменение цвета происходило практически немедленно (от 1 до 2 минут).

ПРИМЕР 3

Различные индикаторы тестируют на их способность изменять цвет в присутствии микроорганизмов *S.aureus*, *E.coli* и *C.albicans*. Тестируемые индикаторы включают Ализарин Комплексен, Ализариновый Красный S, Пурпурин, Ализарин, Эмодин, Амино-4-гидроксиантрахинон, Ядерный быстрый Красный, Хлорфеноловый Красный, Ремазол Бриллиантовый Синий Р, Процион Синий НВ, Фенолфталеин, тетрафенилпорфин, тетра-о-сульфоновая кислота и Нингидрин. Если не указано иного, индикаторы растворяют в диметилформамиде (ДМФ). Фильтровальную бумагу VWR и индикаторы готовят как описано в Примере 1. В таблице 4 показаны наблюдения этого эксперимента.

Таблица 4

Наблюдения изменения цвета индикатора (Группа 3)					
Индикатор	Исходный цвет	Изменение цвета к <i>S.aureus</i>	Изменение цвета к <i>E.coli</i>	Изменение цвета к <i>C.albicans</i>	Изменение цвета к стерильной воде
Ализарин Комплексон	Желтый	Коричневый	Красновато-пурпурный	Пурпурный	Без изменений
Ализарин Красный S	Желтый	Оранжево-коричневый	Розовато-пурпурный	Пурпурный	Светло-желтый с темно-желтым краем (растворение)
Пурпурин	Персиково-оранжевый	Более темный персиково-оранжевый	Красновато-розовый	Более глубокий красновато-розовый	Желтовато-персиковый
Ализарин	Масляно-желтый	Без изменений	Светло-коричневый	Пурпурно-коричневый	Зеленовато-масляно-желтый
Эмодин	Желтый	Без изменений	Светло-зеленовато-оранжевый	Более темный зеленовато-оранжевый	Зеленовато-желтый
Амино-4-гидроксиантрахинон	Розовый	Светло-розовый	Более светлый розовый	Еще более светло-розовый	Более темный розовый
Ядерный быстрый Красный	Красновато-розовый	Более темный красновато-розовый	Желтовато-розовый	Желтовато-розовый	Темно-розовый
Хлорфеноловый Красный	Оранжево-желтый	Коричневый	Темный красновато-пурпурный	Более темный красновато-пурпурный	Более светлый оранжево-желтый с темным краем (растворение)
Ремазол Бриллиантовый Синий Р	Ярко-синий	Светло-синий с темно-синим краем (растворение)	Светло-синий с темно-синим краем (растворение)	Светло-синий с темно-синим краем (растворение)	Светло-синий с темно-синим краем (растворение)
Процион Синий НВ	Бирюзово-зеленый	Без изменений	Без изменений	Более темный бирюзовый	Светлый бирюзовый с темным краем (растворение)
Фенолфталеин	Белый	Без изменений	Без изменений	Без изменений	Без изменений
тетрафенилпорфин тетра-о-сульфоновая кислота	Черный	Серый с темным краем (растворение)	Серый с темным краем (растворение)	Серый с темным краем (растворение)	Серый с темным краем (растворение)
Нингидрин	Белый	Темно-пурпурный	Темно-пурпурный	Более светлый темный	Без изменений

Наблюдаемое изменение цвета происходило практически немедленно (от 1 до 2 минут).

ПРИМЕР 4

Продemonстрировали способность быстрого определения различных грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов с применением индикаторов из Примеров 1-3. Также протестировали дополнительные индикаторы,

включающие Плазмокоринт В, Нитро Синий, Ализарин Комплексон, Орцеин, Тетраметил-пара-фенилендиамин (TMPD), Найл Красный, Эриохром Сине-черный В, Фенольный Красный, Ализарин Красный S, Карминовая кислота, Fe(III)C₃, Целестин Синий, Реагент Ковача, Хромазуrol S, Универсальный индикатор 3-10, Метилловый Оранжевый, Мериоцианин 540 и порфирина хлорид железа III. Тестируемые грамположительные микроорганизмы включают *S.aureus*, *L.acidophilus*, *S.epidermidis*, *B.subtilis* и *E.faecalis*. Тестируемые грамотрицательные микроорганизмы включают *E.coli*, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae* и *P.mirabilis*.

Образцы индикатора готовят по методике примера 1. Если не указано иного, индикаторы растворяют в диметилформамиде (ДМФ). Растворы каждого индикатора капают пипеткой на два отдельных куска фильтровальной бумаги VWR и высушивают. Один образец фильтровальной бумаги с высушенным индикатором разделяют на пять приблизительно равных секторов для тестирования пяти грамположительных микроорганизмов. Другой образец фильтровальной бумаги разделяют на четыре сектора для тестирования четырех грамотрицательных микроорганизмов. 100 микролитров 10⁷ КОЕ/мл каждого образца микроорганизма капают пипеткой на соответствующий сектор образца фильтровальной бумаги. В таблице 5 показаны наблюдения для грамположительных микроорганизмов, и в таблице 6 показаны наблюдения для грамотрицательных микроорганизмов.

Таблица 5. Наблюдения изменения цвета для грамположительных микроорганизмов

Индикатор	Исход- ный цвет	Измене- ние цве- та к <i>B.</i> <i>subtilis</i>	Измене- ние цве- та к <i>S.</i> <i>aureus</i>	Измене- ние цве- та к <i>S.</i> <i>epidermi-</i> <i>dis</i>	Измене- ние цве- та к <i>E.</i> <i>faecalis</i>	Измене- ние цве- та к <i>L.</i> <i>acidophi-</i> <i>lus</i>
Плазмоко- ринт В	Темно- розовый	Пурпур- но- розовый	Очень бледный пурпур- но- розовый	Более темный розовый	Красно- вато- розовый	Более темный красно- вато- розовый
Нитроси- ний тетра- золий	Желто- вато- белый	Без из- менений	Без из- менений	Без из- менений	Без из- менений	Без из- менений
Ализарин Комплек- сон	Желтый	Корич- нево- красный	Более светлый коричне- во- красный	Более светлый коричне- во- красный	Более светлый коричне- во- красный	Коричне- во- желтый
Орцеин	Грязно- пурпур- ный	Светло- пурпур- ный	Более светлый грязно- пурпур- ный	Более темный грязно- пурпур- ный	Более темный грязно- пурпур- ный	Более темный грязно- пурпур- ный
Тетраме-	Ярко-	Бесцвет-	Бесцвет-	Не тес-	Не тес-	Бесцвет-

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

тил-пара- фенилен- диамин (TMPD)*	лаван- довый	ный	ный	тировали	тировали	ный
Найл Крас- ный	Ярко- пурпур- ный	Светло- розовый	Светло- розовый	Светло- розовый	Светло- розовый	Светло- розовый
Эриохром Сине- черный В	Темный грязно- пурпур- ный	Голубо- вато- пурпур- ный	Более светлый грязно- пурпур- ный	Более темный грязно- пурпур- ный	Более темный грязно- пурпур- ный	Более темный грязно- пурпур- ный
Феноловый Красный	Желтый	Оранже- вый с желтова- тым цен- тром	Желтый с оран- жевым краем	Желтый с оран- жевым краем	Желтый с оран- жевым краем	Зелено- вато- желтый с оранже- вым кра- ем
Ализарин Красный S	Желтый	Корич- нево- розовый	Светло- коричне- вый	Светло- коричне- вый	Светло- коричне- вый	Светлый зелено- вато- коричне- вый
Кармино- вая кисло-	Красно- вато-	Бледно- пурпур-	Более светло-	Более светло-	Пурпур- но-	Желто- вато-

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

та*	персико- вый	ный	пурпур- ный	пурпур- ный	персико- вый	персико- вый
Fe(III)C ₃	Белый	Без из- менений	Без из- менений	Не тес- тировали	Не тес- тировали	Без из- менений
Целестин Синий	Темно- лаван- довый	Синий	Синий	Синий	Синий	Синий
Реагент Ковача	Бледно- желтый	Белый с зеленым центром и жел- тым кра- ем	Белый с зеленым центром и жел- тым кра- ем	Белый с зеленым центром и жел- тым кра- ем	Белый с зеленым центром и жел- тым кра- ем	Белый с зеленым центром и корич- невым краем
Хромазу- рол S	Розовый	Бледно- желтый с красным краем	Светло- оранже- вый с темно- оранже- вым кра- ем	Светлый желтова- то- оранже- вый с темно- оранже- вым кра- ем	Светло- оранже- вый с темно- оранже- вым кра- ем	Светло- красный с темно- красным краем
Универ- сальный индикатор	персико- вый	светло- персико- вый с	светло- персико- вый с	светло- персико- вый с	Светло- персико- вый	Красный

3-10		желтым центром	желтым центром	желтым центром		
Метилловый Оранже- вый	Ярко- оранже- вый	Желтый	Желтый	Желтый	Желтый	Желтый
Мероциа- нин 540	Ярко- розовый	Светло- пурпур- ный	Светло- пурпур- ный	Светло- пурпур- ный	Светло- пурпур- ный	Светло- пурпур- ный
порфирина хлорид же- леза III*	Светлый горчич- но- желтый	Более темный горчич- но- желтый	Более темный горчич- но- желтый	Более темный горчич- но- желтый	Более темный горчич- но- желтый	Более темный горчич- но- желтый

* растворен в воде

Таблица 6. Наблюдения изменения цвета для грамотрицательных микроорганизмов

Индикатор	Исход- ный цвет	Измене- ние цвета к <i>E. coli</i>	Измене- ние цвета к <i>P. aeruginosa</i>	Изменение цвета к <i>K. pneumoniae</i>	Измене- ние цвета к <i>P. mirabilis</i>
Плазмокоринт В	Темно- розовый	Светло- пурпур- ный	Темно- синий	Темный красновато- розовый	Темный краснова- то- розовый

5	Нитросиний тетразолий	Желто- вато- белый	Без изме- нений	Без изме- нений	Без изме- нений	Без изме- нений
10	Ализарин Ком- плексон	Желтый	Пурпур- ный	Более темно- пурпур- ный	Коричнева- то- пурпурный	Пурпур- ный
15						
20	Орцеин	Грязно- пурпур- ный	Светло- пурпур- ный	Темно- пурпур- ный	Коричнева- то- пурпурный	Более темный коричне- вато- пурпур- ный
25						
30	Тетраметил- пара- фенилендиа- мин (TMPD)*	Ярко- лаван- довый	Бесцвет- ный	Темно- пурпур- ный	Бесцвет- ный	Бесцвет- ный
35						
40	Найл Красный	Ярко- пурпур- ный	Светло- розовый	Светло- розовый	Светло- розовый	Светло- розовый
45	Эриохром Си- не-черный В	Темный грязно- пурпур- ный	Голубова- то- пурпур- ный	Темно- синий	Более тем- но- пурпурный	Более темно- пурпур- ный
50	Феноловый	Желтый	Оранже-	Темно-	Желтый с	Оранже-

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Красный		вый	красный/ оранже- вый	оранжевым краем	вый
Ализарин Красный S	Желтый	Коричне- вато- пурпур- ный	Темный краснова- то- пурпур- ный	Светлый коричнева- то- пурпурный	Темный краснова- то- пурпур- ный
Карминовая кислота*	Красно- вато- персико- вый	Голубова- то- пурпур- ный	Темно- пурпур- ный	Более бледный голубовато- пурпурный	Пурпур- ный
Fe(III)C ₃	Белый	Без изме- нений	Без изме- нений	Не тести- ровали	Без изме- нений
Целестин Си- ний	Темно- лаван- довый	Синий	Синий	Синий	Синий
Реагент Кова- ча	Бледно- желтый	Белый с зеленова- тым цен- тром и желтым краем	Белый с зеленова- тым цен- тром и желтым краем	Белый с зеленова- тым цен- тром и желтым краем	Белый с зеленова- тым цен- тром и желтым краем
Хром Азурол S	Розовый	Зеленова- то-желтый	Ярко- желтый с	Зеленова- то-желтый	Зеленова- то-желтый

5			с темно-розовым краем	темно-розовым краем	с темно-розовым краем	с темно-розовым краем
10	Универсальный индикатор 3-10	персиковый	Более светло-персиковый с желтым центром	Светло-зеленый	Более темно-персиковый с желтым центром	Более светло-персиковый с желтым центром
20	Метиловый Оранжевый	Ярко-оранжевый	Желтый	Желтый	Желтый	Оранжевый/ желтый
25	Мероцианин 540	Ярко-розовый	Желтовато-розовый	Желтовато-розовый	Желтовато-розовый	Желтовато-розовый
30	Порфирин хлорид железа III*	Светлый горчично-желтый	Более темный горчично-желтый	Более темный горчично-желтый	Более темный горчично-желтый	Более темный горчично-желтый

40 * растворен в воде

За исключением Метилового Оранжевого, Найл Красного, Тетраметил-парафенилендиамина (TMPD) и Мероцианина 540, наблюдаемое изменение цвета происходило практически немедленно (от 1 до 2 минут).

45 ПРИМЕР 5

Продemonстрировали способность быстро определять бактериальные патогены верхних дыхательных путей с применением группы индикаторов. Тестируемые индикаторы включают Ализарин Красный S, Универсальный индикатор 3-10, Найл Красный, Плазмокоринт В, Порфирин Железо III, Эриохром Сине-черный В, 50 Хромазурол S, Орцеин, Ализарин Комплексон, Феноловый Красный, Карминовая кислота, Метиловый Оранжевый и TMPD. Тестируемые патогены верхних дыхательных путей включают *H.influenzae*, *M.lacunata*, *S.pyogenes*, *S.pneumoniae*, *A.pullulans* и *P.janthinellum*. Образцы индикатора готовят по методике примера 1. Если

не указано иначе, индикаторы растворяют в диметилформамиде (ДМФ). Изменения цвета наблюдают и записывают для каждого из тестируемых образцов. В таблице 7 показаны наблюдения для инфекционных патогенов верхних дыхательных путей.

Таблица 7. Изменение цвета для инфекционных патогенов верхних дыхательных путей

Индикатор	Исходный цвет	Изменение цвета к <i>H. influenzae</i>	Изменение цвета к <i>M. lacunata</i>	Изменение цвета к <i>S. pyogenes</i>	Изменение цвета к <i>S. pneumoniae</i>	Изменение цвета к <i>A. pullulan</i>	Изменение цвета к <i>P. janthinellum</i>
Ализа-	Тем-	Крас-	Корич-	Светло-	Светло-	Яркий	Яркий

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

рин	ный	ный	не-	корич-	корич-	корич-	корич-
Красный	гор-		вато-	не-вый	не-вый	не-	невато-
S	чично-		крас-			вато-	желтый
	жел-		ный			желтый	
	тый						
Универ-	Тем-	Зеле-	Зеле-	Корич-	Корич-	Темно-	Темно-
сальный	но-	новато-	новато-	невато-	невато-	перси-	перси-
индика-	перси-	желтый	желтый	желтый	желтый	ковый	ковый
тор 3-10	ко вый						
Найл	Ярко-	Розо-	Розо-	Розо-	Розо-	Темно-	Темно-
Красный	пур-	вый	вый	вый	вый	розо-	розо-
	пур-					вый	вый
	ный						
Плазмо-	Ярко-	Сине-	Более	Темно-	Темно-	Более	Более
коринт В	розо-	пурпур-	темный	розо-	розо-	свет-	свет-
	вый	ный	сине-	вый	вый	лый яр-	лый яр-
			пурпур-			ко-	ко-
			ный			розо-	розо-
						вый	вый
Порфи-	Гор-	Более	Более	Более	Более	Более	Более
рин Же-	чично-	темный	темный	темный	темный	темный	темный
лезо III *	жел-	горчич-	горчич-	горчич-	горчич-	горчич-	горчич-
	тый	но-	но-	но-	но-	но-	но-
		желтый	желтый	желтый	желтый	желтый	желтый
Эрио-	Шам-	Темно-	Теим-	Темный	Темный	Темный	Темный

5

хром	пань	синий	но-	шам-	шам-	шам-	шам-
Сине-			синий	пань-	пань-	пань	пань
черный				розо-	розо-		
В				вый	вый		
Хрома-	Свет-	Светло-	Светло-	Корич-	Корич-	Светло-	Светло-
зурол S	ло-	зеле-	зеле-	невато-	невато-	розо-	розо-
	оран-	ный с	ный с	крас-	крас-	вый с	вый с
	же	темно-	темно-	ный с	ный с	темно-	темно-
	вый	крас-	крас-	темно-	темно-	крас-	крас-
		ным	ным	крас-	крас-	ным	ным
		краем	краем	ным	ным	краем	краем
				краем	краем		
Орцеин	Гряз-	Ярко-	Ярко-	Сине-	Более	Более	Более
	но-	пурпур-	пурпур-	грязно-	темный	свет-	свет-
	пурпур	ный	ный	пурпур-	грязно-	лый	лый
	ный			ный	пурпур-	грязно-	грязно-
					ный	пурпур-	пурпур-
						ный	ный
Ализа-	Жел-	Крас-	Пур-	Корич-	Корич-	Желтый	Желтый
рин Ком-	тый	новато-	пур-	не вый	не вый		
плексон		пурпур-	пурный				
		ный					
Феноло-	Оран-	Оран-	Ярко-	Зеле-	Зеле-	Ярко-	Ярко-
вый	жево-	жево-	крас-	новато-	новато-	желтый	желтый
Красный	жел-	крас-	ный	желтый	желтый		

10

15

20

25

30

35

40

45

50

		тый	ный					
5	Карми- новая кислота	Ярко- перси- ко вый	Пур- пурный	Темно- пурпур- ный	Корич- нева	Корич- нева	Более яркий перси- ковый	Более яркий перси- ковый
10					тый /	тый /		
15					пурпур- но- перси- ковый	пурпур- но- перси- ковый		
20	Метило- вый	Тем- но- оран- же вый	Желтый	Желтый	Желтый	Желтый	Корич- невато- желтый	Корич- невато- желтый
25	Оранже- вый							
30	TMPD	Жел- това тый	Белый	Пур- пурный	Не тес- тируют	Розо- вый	Не тес- тируют	Не тес- тируют

* растворенный в воде

35 За исключением Метилового Оранжевого, Найл Красного и тетраметил-пара-
фенилендиамина (TMPD), наблюдаемое изменение цвета происходило практически
немедленно (от 1 до 2 минут).

ПРИМЕР 6

40 Фильтровальную бумагу (от VWR International) обрабатывают растворами
Хромазуrolа, Ализарин Комплексона, Плазмокоринта В и Фенолового Красного (все
растворены в ДМФ). Образцы сушат в подвешенном состоянии для испарения
растворителя. Растворы *C.albicans*, *E.coli* и *S.aureus* разводят десятикратно с
применением среды Trypticase Soybean Broth (TSB) и в некоторых случаях стерильной
45 водой. Концентрации варьируются от 10^8 КОЕ/мл (сток раствор) до 10^1 КОЕ/мл
для *E.coli* и *S.aureus*, и 10^7 КОЕ/мл (сток раствор) до 10^1 КОЕ/мл для *C.albicans*. TSB и
воду применяют в качестве контрольных растворов. В качестве образцов
применяют 100 мкл аликвоты для каждого раствора. Изменение цвета суммировано в
50 таблицах 8-12.

Таблица 8: Реакция на разведения *C. albicans* в среде TSB

Краситель	исходный цвет	10 ⁶ КОЕ/ мл	10 ⁵ КОЕ/ мл	10 ⁴ КОЕ/ мл	10 ³ КОЕ/ мл	10 ² КОЕ/ мл	10 ¹ КОЕ/ мл	TSB контроль
Феноловый Красный	Ярко-желтый	Оранжевый	Более темный оранжевый	Более темный оранжевый	Более темный оранжевый	Более темный оранжевый	Более темный оранжевый	Темно-оранжевый
Плазмокоринт В	Ярко-розовый	Пурпурно-синий	Более темный пурпур	Более темный пурпур	Более темный пурпур	Более темный пурпур	Более темный пурпур	Темный пурпурно-

5

10

15

20

25

30

35

			НО- синий	НО- синий	НО- синий	НО- синий	НО- синий	синий
Ализа- рин Комплек- сон	Ярко- жел- тый	Ко- ричне- вато- пурпур- ный	Более тем- ный корич- не ва- то- пурпур- ный	Более тем- ный корич- не ва- то- пурпур- ный	Более тем- ный корич- не ва- то- пурпур- ный	Более тем- ный корич- не ва- то- пурпур- ный	Более тем- ный корич- не ва- то- пурпур- ный	Тем- ный корич- не ва- то- пурпур- ный
Хрома- зурол	Розо- вый	Зеле- нова то- жел- тый	Более тем- ный зеле- нова то- жел- тый	Более тем- ный зеле- нова то- жел- тый	Более тем- ный зеле- нова то- жел- тый	Более тем- ный зеле- нова то- жел- тый	Более тем- ный зеле- нова то- жел- тый	Жел- това то- зеле- ный

Таблица 9: Реакция на разведения *S.aureus* в среде TSB

40

45

Краси- тель	ис- ход- ный цвет	10 ⁶ КОЕ/ мл	10 ⁵ КОЕ/ мл	10 ⁴ КОЕ/ мл	10 ³ КОЕ/ мл	10 ² КОЕ/ мл	10 ¹ КОЕ/ мл	TSB конт роль
----------------	----------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	---------------------

50

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Феноло- вый Красный	Ярко- жел- тый	Ярко- жел- тый	Оран- же вый	Более тем- ный оран- же вый	Более тем- ный оран- же вый	Более тем- ный оран- же вый	Более тем- ный оран- же вый	Тем- но- оран- же вый
Плазмо- коринт В	Ярко- розо- вый	Яр- кий пур- пур но- ро- зовы	Пур- пур но- си- ний	Более тем- ный пурпур но- синий	Более тем- ный пурпур но- синий	Более тем- ный пурпур но- синий	Более тем- ный пурпур но- синий	Тем- ный пурпур но- синий
Ализа- рин Комплек- сон	Ярко- жел- тый	й Свет ло- корич- не вый	Ко- рич- не вато- пур- пур ный	Более тем- ный корич- не ва- то- пурпур ный	Более тем- ный корич- не ва- то- пурпур ный	Более тем- ный корич- не ва- то- пурпур ный	Более тем- ный корич- не ва- то- пурпур ный	Тем- ный корич- не ва- то- пурпур ный
Хрома- зурол	Розо- вый	Ко- рич- не- вато-	Зеле- нова то- жел-	Более тем- ный зеле-	Более тем- ный зеле-	Более тем- ный зеле-	Более тем- ный зеле-	Жел- това- то- зеле-

		жел- тый	тый	нова- то- жел- тый	нова- то- жел- тый	нова- то- жел- тый	нова- то- жел- тый	ный
--	--	-------------	-----	-----------------------------	-----------------------------	-----------------------------	-----------------------------	-----

Таблица 10.			
Реакция на разведения <i>S.aureus</i> в воде			
Краситель	исходный цвет	10 ⁷ КОЕ/мл (в H ₂ O)	Вода контроль
Феноловый Красный	Ярко-желтый	Н/Д	Светло-желтый
Плазмокоринт В	Ярко-розовый	Ярко-розовый	Светло-розовый
Ализарин Комплекс сон	Ярко-желтый	Бледно-желтый	Бледно-желтый
Хромазуrol	Розовый	Зеленоватый красно-розовый	Светлый красно-розовый

Таблица 11: Реакция на разведения *E. Coli* в среде TSB

Краси- тель	исход ный	10 ⁶ КОЕ/	10 ⁵ КОЕ/	10 ⁴ КОЕ/	10 ³ КОЕ/	10 ² КОЕ/	10 ¹ КОЕ/	TSB конт-
----------------	--------------	-------------------------	-------------------------	-------------------------	-------------------------	-------------------------	-------------------------	--------------

	цвет	мл	мл	мл	мл	мл	мл	роль
Феноло- вый Красный	Ярко- жел- тый	Свет- ло- оран- же вый	Оран- же вый	Более тем- ный оран- же вый	Более тем- ный оран- же вый	Более тем- ный оран- же вый	Более тем- ный оран- же вый	Тем- но- оран- же вый
Плазмо- коринт В	Ярко- розо- вый	Розо- вато- пурпур ный	Пур- пур но- синий	Более тем- ный пурпур но- синий	Более тем- ный пурпур но- синий	Более тем- ный пурпур но- синий	Более тем- ный пурпур но- синий	Тем- ный пурпур но- синий
Ализа- рин Комплек сон	Ярко- жел- тый	Пур- пур но- корич- невый	Ко- ричне вато- пурпур ный	Более тем- ный корич- нева- то- пурпур ный	Более тем- ный корич- нева- то- пурпур ный	Более тем- ный корич- нева- то- пурпур ный	Более тем- ный корич- нева- то- пурпур ный	Тем- ный корич- нева- то- пурпур ный
Хрома- зурол	Розо- вый	Свет- ло- зеле- ный	Зеле- нова- то- жел-	Более тем- ный зеле-	Более тем- ный зеле-	Более тем- ный зеле-	Более тем- ный зеле-	Жел- това- то- зеле-

			тый	нова- то- жел- тый	нова- то- жел- тый	нова- то- жел- тый	нова- то- жел- тый	ный
--	--	--	-----	-----------------------------	-----------------------------	-----------------------------	-----------------------------	-----

Таблица 12

Реакция на разведения E.Coli в воде

Краситель	исходный цвет	10 ⁷ КОЕ/мл (в H ₂ O)	Вода контроль
Феноловый Красный	Ярко-желтый	Оранжево-желтый	Светло-желтый
Плазмокоринт В	Ярко-розовый	Ярко-розовый	Светло-розовый
Ализарин Комплексон	Ярко-желтый	Коричневато-желтый	Бледно-желтый
Хромазурол	Розовый	Темно-зеленый	Светлый красно-розовый

Таким образом, наблюдают изменение цвета для микроорганизмов, которое отличается от изменения цвета в чистой среде, хотя это различие в некоторой степени едва различимо для разведенных растворов. Не ограничиваясь теорией, полагают, что менее различимые различия для разведенных растворов частично являются результатом потери времени, данного микроорганизмам для приспособления к среде (эксперимент проводили практически сразу же после разведения). Наоборот, сток растворы содержат микроорганизмы, выдержанные в среде в течение 24 часов.

ПРИМЕР 7

Выбранные красители также тестируют с группой вирусов из Gibraltar Laboratories (Fairfield, NJ). Применяемые красители представлены в таблице 13.

Таблица 13

Красители для тестирования вирусов

Код	Краситель
1	Хромазурол S
2	Эриоглауцин
3	Гематоксилин
4	Ализарин Красный S
5	Хинализарин
6	TPMD
7	Бромфеноловый Синий
8	Плазмокоринт В
9	Хлорфеноловый Красный
10	Эриохром Сине-черный В
11	Найл Синий А
12	Ализарин Комплексон
13	Мероцианин 540
14	Феноловый Красный
15	Бромтимоловый Синий
16	Ализарин
17	Быстрый Красный AI соль
18	Карминовая кислота
19	Пурпурин
20	Эмодин
21	Нейтральный Красный

22	1,4-дигидроксиантрахинон
23	Ядерный Быстрый Красный
24	Универсальный индикатор раствор 3-10
25	Реагент Ковача

5

Красители растворяют в ДМФ и наносят на двадцать пять образцов
 фильтровальной бумаги. Образцы сушат в подвешенном состоянии и разделяют на
 две группы и наносят на два обработанных красителем образца фильтровальной
 бумаги. Для первой группы, Herpes Simplex 1, Herpes Simplex 2, Adenovirus Type 2,
 10 Adenovirus Type 5, Coronavirus и DMEM контроль тестируют на первом из образцов
 каждого красителя. Для второй группы оставшиеся вирусы, а также DMEM и CAF
 контроль тестируют на втором из образцов каждого красителя. Тестирование
 проводят нанесением 50 мкл аликвоты каждого вируса на образец. Фотографии
 15 делают сразу же и через несколько минут для документирования полученного
 изменения цвета. Полученные изменения цвета суммированы в таблицах 14 и 15.

20

25

30

35

40

45

50

Таблица 14. Первая группа вирусов

5	Тести- руемый краси- тель	Исход- ный цвет	Изме- нение цвета к HSV-1	Изме- нение цвета к HSV-2	Изме- нение цвета к Adeno 2	Изме- нение цвета к Adeno 5	Изме- нение цвета к Coro- navirus	Изме- нение цвета к DMEM
10								
15	Хрома- зурол S	желтый	свет- лый зе- ленова- то- пурпур- ный	свет- лый зе- ленова- то- пурпур- ный	темный зелено- вато- пурпур- ный	темный зелено- вато- пурпур- ный	темно- зеле- ный	темно- зеле- ный
20								
25	Эриог- лауцин	Светло- бирюзо- вый	Более свет- лый бирю- зовый (рас- творе- ние)	Более свет- лый бирю- зовый (рас- творе- ние)	Более свет- лый бирю- зовый (рас- творе- ние)	Более свет- лый бирю- зовый (рас- творе- ние)	Более свет- лый бирю- зовый (рас- творе- ние)	Более свет- лый бирю- зовый (рас- творе- ние)
30								
35	Гемато- ксилин	Бледно- желтый/ персико	Более яркий желтый	Более яркий желтый	Более яркий желтый	Более яркий желтый	пурпур- ный	более тем- ный
40								
45								
50								

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

	вый	(пурпур- ный)	(пурпур- ный)	(пурпур- ный)	(пурпур- ный)		пурпур ный
Ализа- рин Крас- ный S	желтый	светло- крас- ный	светло- крас- ный	более темный светло- крас- ный	светло- крас- ный	пурпур- но- крас- ный	более темно- крас- ный
Хина- ли- зарин	персико- вый	желто- вато- перси- ковый	желто- вато- перси- ковый	более темный желто- вато- перси- ковый	желто- вато- перси- ковый	пурпур- ный	темно- пурпур ный
TPMD	светло- пурпур ный	бесцвет ный	бесцвет ный	бесцвет ный	бесцвет ный	бесцвет ный	бес- цвет- ный
Бром- фено- ловый Синий	ярко- желтый	темно- пурпур- ный	темно- пурпур- ный	темно- пурпур- ный	темно- пурпур- ный	более темно- пурпур- ный	более темно- пурпур ный
Плазмо коринт В	Ярко- розо- вый	более свет- лый ро-	более свет- лый ро-	более свет- лый ро-	более свет- лый ро-	пурпур- ный	более тем- ный

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

		зовый	зовый	зовый	зовый		пурпур ный
Хлор- фено- ловый ный крас- ный	желтый	лаван- довый	лаван- довый	более темный лаван- довый	светло- лаван- довый	темный розово- пурпур- ный	более тем- ный розо- во- пурпур ный
Эрио- хром Сине- черный В	пурпур- но- розо- вый	светло- пурпур- ный	светло- пурпур- ный	более темный пурпур- ный	более темный пурпур- ный	темный сине- пурпур- ный	тем- ный сине- пурпур ный
Найл Синий А (по- крытие не од- нород- ное)	пыльно- синий	пурпур- ный	немно- го бо- лее темно- пурпур- ный	пурпур- ный	немно- го бо- лее темно- пурпур- ный	более темный пурпур- ный	более тем- ный пурпур ный
Ализа-	светло-	светло-	лаван-	лаван-	лаван-	пурпур-	пур-

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

рин	желтый	лаван-	довый	довый	довый	ный	пур-
Ком-		довый					ный
плек-							
сон							
Меро-	ярко-	бледно-	бледно-	бледно-	крас-	крас-	более
цианин	розо-	розо-	розо-	розо-	ный	ный	тем-
540	вый	вый	вый	вый			ный
							крас-
							ный
Фено-						желтый	жел-
ловый	оранже	ярко-	ярко-	ярко-	свет-	с том-	тый с
Крас-	вый	желтый	желтый	желтый	лый не-	но-	томно-
ный					оновый	розо-	розо-
					зеле-	вым	вым
					ный	коль-	коль-
						цом в	цом в
						центре	цен-
							тре
Бром-					блед-		более
тимо-	желтый	бледно-	бледно-	бледно-	ный зе-	зеле-	тем-
ловый		желтый	желтый	желтый	ленова-	ный	ный
Синий					то-		зеле-
					желтый		ный
Ализа-	бледно-	лаван-	лаван-	бледно-	грязно-	пурпур-	более
рин	желтый	довый	довый	лаван-	лаван-	ный	тем-

5		(почти беже- вый)			довый	довый		ный пурпур ный
10						влаж- ное		более
15	Быст- рый	бледно- желтый	види- мых	види- мых	види- мых	пятно	очень	тем- ный
20	Крас- ный AI соль	(почти беже- вый)	изме- нений нет	изме- нений нет	изме- нений нет	(види- мых изме- нений нет)	бледно- лаван- довый	блед- но- ла- вандо вый
25								
30	Карми- новая кислота	яркий оран- жево- персико вый	более свет- лый оран- жево- персико вый	более свет- лый оран- жево- персико вый	более свет- лый оран- жево- персико вый	более темный оран- жево- персико вый	светло- пурпур- ный	свет- ло- пурпур ный
35								
40					более			свет-
45	Пурпу- рин	темно- беже- вый	бледно- лаван- довый	бледно- лаван- довый	темный бледно- лаван- довый	бледно- лаван- довый	светло- пурпур- ный	ло- пурпур ный
50	Эмодин	желтый	бледно-	бледно-	бледно-	бледно-	блед-	более

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

		желтый	желтый	желтый	желтый	ный ро- зовато- крас- ный	тем- ный розо- вато- крас- ный
Ней- траль- ный Крас- ный	пыльно- розо- вый	блекло- желтый	блекло- желтый	более яркий желтый	желто- вато- розо- вый	зелено- вато- желтый	зеле- нова- то- жел- тый
1,4- дигид- рокси антра- хинон	корич- невато- желтый	блед- ный ко- ричне- вато- желтый	блед- ный ко- ричне- вато- желтый	блед- ный ко- ричне- вато- желтый	блед- ный ко- ричне- вато- желтый	блед- ный ко- ричне- вато- желтый	блед- ный корич- нева- то- жел- тый
Ядер- ный Быст- рый Крас- ный	розо- вый	более свет- лый ро- зовый	более свет- лый ро- зовый	более темный розо- вый	более темный розо- вый	более темный розо- вый	более тем- ный розо- вый
Уни-	ярко-	желтый	желтый	желтый	желтый	яркий	яркий

вер- саль- ный инди- катор рас- твор 3- 10	персико- вый					зелено- вато- желтый	зеле- нова- то- жел- тый
Реа- гент Ковача	бледно- зеле- ный	белый с синева- тым цен- тром	белый с синева- тым цен- тром	белый с синева- тым цен- тром	белый с синева- тым цен- тром	белый с синева- тым цен- тром	белый с си- нева- тым цен- тром

Таблица 15. Вторая группа вирусов

Тести- руемый краситель	Ис- ходный цвет	Измене- ние цвета к Rhinov- irus	Измене- ние цве- та к Influenza (Japan)	Изме- нение цвета к Influen- za	Измене- ние цве- та к Para influenza	Изме- нение цвета к Influen- za Avian	Изме- нение цвета к DMEM	Изме- нение цвета к CAF
-------------------------------	-----------------------	---	---	---	---	---	--------------------------------------	----------------------------------

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

				(Hong Kong)				
Хромазу-рол S	жел-тый	зелено-ватопурпурный	зелено-ватопурпурный	зелено-ватопурпурный	зелено-ватопурпурный	более темный темный зелено-ватопурпурный	тем-ный	тем-ный
Эриоглауцин	Светло-бирюзовый	Более светлый бирюзовый (растворение)	Более светлый бирюзовый (растворение)	Более светлый бирюзовый (растворение)	Более светлый бирюзовый (растворение)	Более светлый бирюзовый (растворение)	Более свет-лый бирю-зовый (рас-творе-ние)	
Гематоксилин	Бледно-желтый/персиковый	светло-пурпурный/лавандовый	более темный пурпурный	коричневато-пурпурный	более темный пурпурный	коричневато-пурпурный	более тем-ный пурпур-ный	более тем-ный пурпур-ный

5	Ализарин		светлый	более темный	более темный	темный	более темный	тем-ный	тем-ный
10	Красный S	жел-тый	красно-вато-пурпур-ный	красно-вато-пурпур-ный	красно-вато-пурпур-ный	красно-вато-пурпур-ный	красно-вато-пурпур-ный	крас-нова-то-пурпур-ный	крас-нова-то-пурпур-ный
15									
20	Хинали-зарин	перси-ко вый	светло-пурпур-ный	темно-пурпур-ный	корич-невато-пурпур-ный	темно-пурпур-ный	более темный пурпур-ный	темно-пурпур-ный	темно-пурпур-ный
25									
30	TPMD	свет-ло-пурпур-ный	бесцвет-ный	бесцвет-ный	бес-цветный	бесцвет-ный	бес-цветный	бес-цвет-ный	бес-цвет-ный
35	Бромфе-нольный	ярко-жел-тый	темно-пурпур-ный	темно-пурпур-ный	темно-пурпур-ный	темно-пурпур-ный	темно-пурпур-ный	темно-пурпур-ный	темно-пурпур-ный
40	Синий								
45	Плазмо-коринт В	Ярко-розо-вый	светло-пурпур-ный	пурпур-ный	пурпур-ный (более темный,	пурпур-ный	более темный пурпур-ный (как	пурпур-ный	более тем-ный пур-
50									

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

				чем для Япон- ского штам- ма)		для Hong Kong)		пур- ный
Хлорфе- ноловый красный	жел- тый	маджен- та	маджен- та	мад- жента	маджен- та	мад- жента	более тем- ная мад- жента	более тем- ная мад- жента
Эриохром Сине- черный В	пур- пурно- розо- вый	сине- пурпур- ный	темный сине- пурпур- ный	более темный сине- пурпур- ный	более темный синева- то- пурпур- ный	более темный синева- то- пурпур- ный	тем- ный сине- пурпур- ный	тем- ный сине- пурпур- ный
Найл Си- ний А (покрытие не одно- родное)	пыль- но- синий	сине- пурпур- ный	пурпур- ный	пурпур- ный	пурпур- ный	более светлый пурпур- ный	пурпур- ный	более тем- ный пурпур- ный
Ализарин Комплек-	свет- ло-	светло- пурпур-	пурпур- ный	пурпур- ный	более темный	темно- пурпур-	темно- пур-	темно- пур-

5	сон	жел- тый	ный			пурпур- ный	ный	пур- ный	пур- ный
10	Меро- цианин 540	ярко- розо- вый	красный	более темный красный	более темный красный	более темный красный	более темный красный	более тем- ный крас- ный	темно- крас- ный
15									
20	Феноло- вый Красный	оран- же вый	желтый с темно- розовым диском	желтый с более тонким темно- розовым диском	желтый с очень тонким темно- розо- вым диском	желтый с темно- розовой середи- ной	желтый с темно- розо- вым диском	жел- тый с почти сплош- ным темно- розо- вым дис- ком (размы- тым)	жел- тый с темно- розо- вым дис- ком (размы- тым)
25									
30									
35	Бромти- моловый Синий	жел- тый	светло- зеленый	более темный зеленый	более темный зеленый	темно зеленый	темно зеленый	темно зеле- ный	темно зеле- ный
40									
45	Ализарин	блед- но- жел- тый	светло- пурпур- ный	светло- пурпур- ный	более темный пурпур- ный	светло- пурпур- ный	более темный пурпур- ный	более тем- ный пур-	более тем- ный пур-
50									

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

	(почти беже- вый)						пур- ный	пур- ный
Быстрый	блед- но- жел- тый	видимых	видимых	види- мых из-	видимых	види- мых из-	види- мых	види- мых
Красный	тый	измене-	измене-	мене-	измене-	мене-	изме-	изме-
Al соль	(почти беже- вый)	ний нет	ний нет	ний нет	ний нет	ний нет	нений нет	нений нет
Кармино- вая ки- слота	яркий оран- жево- перси- ко вый	пурпур- ный	пурпур- но- оранже- вый	более темный пурпур- но- оранже- вый	более темный пурпур- ный	пурпур- но- оранже- вый	более тем- ный пурпур- ный	более тем- ный пурпур- ный
Пурпурин	темно- беже- вый	светло- пурпур- ный	более темный пурпур- ный	более темный пурпур- ный	более темный пурпур- ный	более темный пурпур- ный	более тем- ный пурпур- ный	более тем- ный пурпур- ный
Эмодин	жел- тый	бледный розова-	розова- то-	корич- невато-	розова- то-	корич- невато-	розо- вато-	корич- нева-

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

		то- красный	красный	розовый	красный	розовый	крас- ный	то- розо- вый
Ней- тральный Красный	пыль- но- розо- вый	горчич- но- желтый	более темный горчич- но- желтый	зелено- вато- желтый	более темный горчич- но- желтый	зелено- вато- желтый	зеле- нова- то- жел- тый	зеле- нова- то- жел- тый
1,4- дигидрок- си антра- хинон	корич- не ва- то- жел- тый	бледный коричне- вато- желтый	бледный коричне- вато- желтый	блед- ный ко- ричне- вато- желтый	бледный коричне- вато- желтый	блед- ный ко- ричне- вато- желтый	блед- ный корич- нева- то- жел- тый	блед- ный корич- нева- то- жел- тый
Ядерный Быстрый Красный	розо- вый	более светлый розово- красный	более темный розово- красный	красный	более темный розово- красный	красный	крас- ный	крас- ный
Универ- сальный индика- тор 3-10	ярко- перси- ко вый	ярко- желтый	яркий зелено- вато- желтый	желтый	яркий зелено- вато- желтый	яркий зелено- вато- желтый	яркий зеле- нова- то- жел-	яркий зеле- нова- то- жел-

5

10

15

20

							тый	тый (более зеле- ный)
Реагент Ковача	блед- но- зеле- ный	белый с синева- тым цен- тром	белый с синева- тым цен- тром	белый с синева- тым центром	белый с синева- тым цен- тром	белый с синева- тым центром	с си- нева- тым цен- тром	белый с си- нева- тым цен- тром

Цифровые фото также анализируют с применением NIH Image (ImageJ) для анализа интенсивности. Список наиболее интересных красителей и относительной интенсивности для каждого типа вирусов приведены в таблицах 16 и 17.

25

30

35

40

45

50

Таблица 16							
Значения средней интенсивности для выбранных красителей к вирусам							
	HSV-1	HSV-2	Adeno 2	Adeno 5	Coronavirus	DMEM	Rhinovirus
Хромазурол S (161,0)	143,4	145,4	128,6	134,5	119,4	116,9	140,8
Ализарин Красный S (162,7)	135,9	139,4	123,1	131,0	100,6	99,3	130,1
Хинализарин (155,5)	145,4	143,0	136,3	132,9	106,7	104,9	138,7
Плазмокоринт В (161,5)	141,9	139,4	138,5	136,7	119,0	106,3	156,2
Гематоксилин (176,7)	156,1	153,4	144,3	148,9	135,1	127,5	162,3
Эриохром Синечерный В (152,5)	133,6	126,5	120,1	116,7	95,6	79,2	127,5
Ализарин Комплексон (157,6)	120,9	126,8	124,9	122,7	102,0	94,5	137,7
Мероцианин 540 (149,0)	151,4	146,7	146,1	123,2	104,3	103,2	116,3
Бромтимоловый Синий (135,4)	127,5	136,7	120,7	111,9	74,2	72,6	109,9
Ализарин (160,0)	146,8	154,5	149,5	134,6	119,0	116,7	130,5
Пурпурин (150,0)	141,0	128,9	131,3	124,1	110,3	103,9	145,1
Эмодин (145,0)	133,5	126,1	127,5	120,8	108,9	106,2	133,1

5	Нейтральный Красный (133,2)	118,6	119,1	105,2	108,0	96,0	94,6	127,7
	Ядерный Быстрый Красный (143,0)	132,9	138,2	115,0	125,7	104,7	109,8	120,6

Значения средней интенсивности для выбранных красителей к вирусам							
Таблица 17							
	Influenza (Japan)	Influenza (Hong Kong)	Parainfluenza	Influenza Avian	DMEM	CAF	
10	Хромазурол S (161,0)	142,3	131,7	140,8	124,0	122,1	111,5
	Ализарин Красный S (162,7)	119,5	118,1	112,0	111,0	103,2	100,9
15	Хинализарин (155,5)	125,2	116,8	113,5	111,6	104,3	99,0
	Плазмокоринт В (161,5)	151,0	137,8	151,0	116,7	130,6	100,0
20	Гематоксилин (176,7)	154,6	153,3	151,4	146,8	144,3	137,0
	Эриохром Сине-черный В (152,5)	110,8	104,9	81,2	92,5	74,5	54,2
25	Ализарин Комплексон (157,6)	135,4	125,5	130,4	113,2	119,0	111,7
	Мероцианин 540 (149,0)	120,2	105,9	114,6	101,4	104,8	88,3
30	Бромтимоловый Синий (135,4)	110,2	97,2	95,0	91,6	92,7	87,1
	Ализарин (160,0)	130,7	117,7	130,9	122,6	121,8	111,1
35	Пурпурин (150,0)	135,4	128,3	131,2	123,6	121,4	113,0
	Эмодин (145,0)	126,9	120,7	120,9	119,8	117,8	105,2
40	Нейтральный Красный (133,2)	127,4	115,2	120,1	108,5	102,4	94,6
	Ядерный Быстрый Красный (143,0)	128,3	112,5	127,9	109,6	116,8	101,3

В общем, изменения цвета предположительно делятся на две группы для каждого красителя. Вирусы Herpes и Adeno имеют тенденцию вызывать похожий тип изменения цвета, и вирусы Coronavirus, Rhinovirus и Influenza также вызывают похожее изменение цвета. Интересно, что вирусы Herpes и Adeno содержат двунитевую ДНК, содержат липидную мембрану, имеют похожий размер и иксоэдрическую форму. Вирусы Coronavirus, Rhinovirus и различные вирусы Influenza содержат РНК, хотя имеют различную форму (спиральную для Influenza, иксоэдрическую для Rhinovirus и асимметричную для Coronavirus). Значения pH этих растворов также имеют тенденцию к группировке. Хотя HSV-1, HSV-2, Adeno 2, Adeno 5, Coronavirus и Rhinovirus культивируют в DMEM (pH=7,5), каждый раствор, содержащий организм, имеет различные pH, что показывает на выделение метаболитов или других факторов,

которые оказывают влияние на окружающую их среду. Список pH представлен в таблице 18 (измерено с применением полосок ColorpHast pH).

5

10

15

Значения pH		Таблица 18
Раствор	Значение pH	
DMEM	7,5	
HSV-1	6,5-7,0	
HSV-2	6,5-7,0 (ближе к 6,5)	
Adeno 2	6,5-7,0	
Adeno 5	5,5-6,0	
Coronavirus	7,5-8,0 (ближе к 8,0)	
Rhinovirus	7,5-8,0 (ближе к 8,0)	
CAF	8,0	
Influenza A (Japan)	7,5-8,0 (ближе к 8,0)	
Influenza A (Hong Kong)	7,5-8,0 (ближе к 8,0)	
Parainfluenza	7,5-8,0 (ближе к 8,0)	
Influenza Avian	7,5-8,0 (ближе к 8,0)	

20

25

30

35

40

Хотя считается, что pH играет роль в полученных изменениях цвета, это не значит, что это единственный влияющий фактор. Множество из тестированных красителей не известный как традиционные индикаторы pH, но на них оказывают влияние ионы. Эриохром Синий Черный В, например, является красителем титрования металла, который обычно применяют при высоких значениях pH (около 10,0). Изменения цвета от синего до красного в присутствии ионов металлов. Для определения микробов этот краситель применяют в красном состоянии, и изменение на синий наблюдают в присутствии определенных микробов. Этот эффект, похоже, pH-зависимый, однако существуют характерные различия между образцами, которые имеют относительно похожие значения pH, такие как вирусы Rhinovirus и Influenza.

Анализ интенсивности с применением ImageJ подтверждает, что, в общем, Rhinovirus имеет тенденцию к изменению цвета с меньшей интенсивностью, чем вирусы гриппа. На основе этих результатов, Эриохром Синий Черный В и Квинализарин могут применяться для определения различных типов Influenza против Rhinovirus. Плазмокоринт В также подходит для диагноза Parainfluenza.

Хотя данное изобретение подробно описано со ссылкой на конкретные варианты, специалистам в данной области техники, при прочтении и понимании вышесказанного, должно быть понятно, что могут быть предложены изменения, вариации и эквиваленты данным вариантам. Следовательно, объем данного изобретения должен оцениваться по предложенной формуле изобретения и любым ее эквивалентам.

Формула изобретения

45

1. Способ быстрого определения типа микроорганизмов в образце из верхних дыхательных путей, где способ содержит:

50

контакт тестовой полоски с образцом из верхних дыхательных путей, где тестовая полоска содержит, по меньшей мере, один индикатор широкого спектра, который демонстрирует первую спектральную реакцию в присутствии бактерий и вторую спектральную реакцию в присутствии вирусов, где индикатором широкого спектра является N-фенолят бетаин, тестовая полоска, кроме того, содержит сетку, которая содержит, по меньшей мере, один дифференцирующий индикатор, где сетка демонстрирует третью спектральную реакцию в присутствии одного типа

микроорганизма и четвертую спектральную реакцию в присутствии другого типа микроорганизма;

проверку индикатора широкого спектра на первую спектральную реакцию или вторую спектральную реакцию, где наличие второй спектральной реакции указывает на присутствие вируса в образце; и затем

проверку сетки на третью спектральную реакцию или четвертую спектральную реакцию.

2. Способ по п.1, где N-фенолят бетаинном является краситель Рейхардта.

3. Способ по п.1, где дифференцирующий индикатор содержит рН-чувствительный индикатор.

4. Способ по п.3, где рН-чувствительным индикатором является фталеин, гидроксиантрахинон, арилметан, ароматическое азосоединение или их производные.

5. Способ по п.1, где дифференцирующий индикатор содержит индикатор, образующий комплексы с металлом.

6. Способ по п.5, где индикатором, образующим комплексы с металлом, является ароматическое азосоединение.

7. Способ по п.1, где спектральные реакции изучают визуально.

8. Способ по п.1, где спектральные реакции происходят через около 30 мин или менее после контакта тестовой полоски с образцом и предпочтительно через около 5 мин или менее после контакта тестовой полоски с образцом.

9. Способ по п.1, где сетка демонстрирует третью спектральную реакцию в присутствии грамотрицательных бактерий и четвертую спектральную реакцию в присутствии грамположительных бактерий.

10. Способ по п.9, где грамположительные бактерии включают *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* или их смесь.

11. Способ по п.9, где грамотрицательные бактерии включают *Moraxella lacunata*, *Haemophilus influenzae*, *Chlamydia pneumoniae* или их смесь.

12. Способ по п.1, где сетка демонстрирует четвертую спектральную реакцию в присутствии одного типа вирусов и пятую спектральную реакцию в присутствии другого типа вирусов.

13. Способ по п.12, где сетка демонстрирует четвертую спектральную реакцию в присутствии риновирусов.

14. Способ по п.13, где сетка демонстрирует пятую спектральную реакцию в присутствии вируса гриппа А, вируса гриппа В, вируса гриппа С или их комбинации.

15. Способ по п.14, где сетка демонстрирует пятую спектральную реакцию в присутствии вирусов парагриппа человека.

16. Способ по любому из предшествующих пунктов, где сетка содержит от 2 до 50 отдельных адресов в сетке, предпочтительно от 3 до 40 отдельных адресов в сетке.

17. Набор для быстрого определения микроорганизмов в образце из верхних дыхательных путей, где набор содержит:

устройство для отбора тестового образца из верхних дыхательных путей хозяина; и тестовую полоску, содержащую, по меньшей мере, один индикатор широкого спектра, который демонстрирует первую спектральную реакцию в присутствии бактерий и вторую спектральную реакцию в присутствии вирусов, где индикатором широкого спектра является N-фенолят бетаин, тестовая полоска, кроме того, содержит сетку, которая содержит, по меньшей мере, один дифференцирующий индикатор, где сетка содержит от 2 до 50 отдельных адресов в сетке, и где дифференцирующий индикатор содержит рН-чувствительный индикатор, индикатор, образующий

комплексы с металлами, или оба, сетка демонстрирует третью спектральную реакцию в присутствии одного типа микроорганизма и четвертую спектральную реакцию в присутствии другого типа микроорганизма.

- 5 18. Набор по п.17, где N-фенолят бетаином является краситель Рейхардта.
19. Набор по п.17, где устройством является тампон на стержне.

10

15

20

25

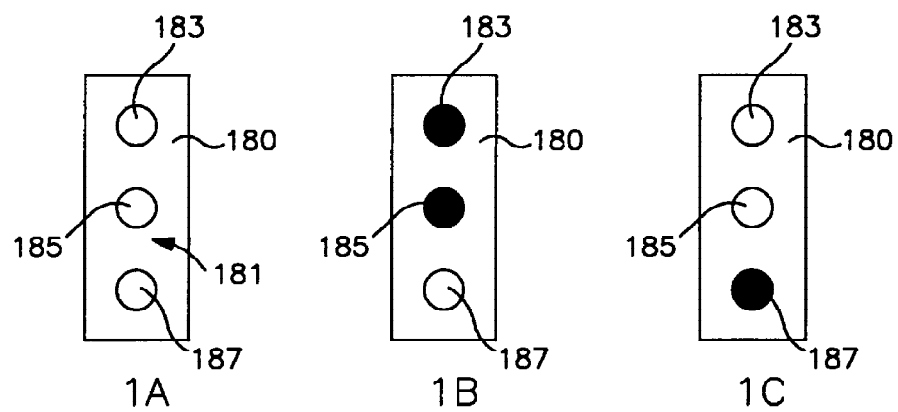
30

35

40

45

50



ФИГ. 1