

400754

16



P.- 50.241

Serial N° 124.671

Int. Cl.º: G01N

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de MILES LABORATORIES, INC.

entidad norteamericana

establecida en Elkhart, Indiana, Estados Unidos de
América

por: "UN DISPOSITIVO DE ENSAYO PARA ANALIZAR MICROORGANIS
MOS EN UNA MUESTRA "

(Clase Internacional G01n)

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En medicina, industria y por los organismos gubernamentales se llevan a cabo normalmente análisis de muestras líquidas de la presencia de microorganismos para determinar el grado de contaminación microbiológica en diferentes muestras. En muchos análisis de este tipo la presencia de microorganismos es con frecuencia de importancia secundaria, y el factor primordial a determinar es la concentración de los microorganismos en la muestra. Por ejemplo, la diagnosis de bacteriuria se determina mediante la concentración de microorganismos presente en una muestra de orina y nó por la sola presencia de microorganismos en ella. Análogamente las muestras de leche y de agua se consideran "contaminadas" solamente cuando la concentración de microorganismos presentes en ellas excede un patrón máximo definido. Lógicamente, cuando la concentración de los microorganismos excede el patrón definido, resulta valioso y con frecuencia necesario identificar los microorganismos para activar mejor el tratamiento de la infección o para determinar y aliviar la causa de la contaminación.

Un método cuantitativo de análisis de microorganismos supone la preparación de una serie de diluciones de una cantidad medida de la muestra; la inoculación de un medio nutriente de agar con una cantidad medida de una dilución; y la incubación del medio inoculado durante aproximadamente 24 horas. Si la muestra está contaminada pueden observarse visualmente y contarse las colonias individuales de los microorganismos propagados. La concentración de microorganismos por mililitro de muestra se calcula entonces multiplicando el número de colonias de mi-

400754

14 MAR 1958



5 croorganismos por la dilución de la muestra. Las colonias precisas así propagadas proporcionan una fuente pura del microorganismo para cultivar los microorganismos en medios selectivos o diferenciales para identificarlos. Este cultivo requiere frecuentemente la reincubación durante un tiempo adicional de 24 horas.

10 Las desventajas inherentes al método anterior son la necesidad de preparar una serie de diluciones de la muestra, la necesidad de preparar un medio en agar, el consumo de tiempo necesario para proporcionar tanto un análisis cuantitativo como un análisis diferencial, y la necesidad de una cantidad considerable de equipo de laboratorio limpio y esterilizado.

15 Se ha desarrollado un segundo método en el que volúmenes medidos de una muestra se filtran a través de una membrana semi-permeable. El concepto del método es seleccionar una membrana que tenga una porosidad tal que los microorganismos no puedan pasar a través de la membrana. Después de la etapa de filtración la membrana se retira del filtro y se yuxtapone en un medio nutriente de agar con lo cual los nutrientes incorporados en él pueden difundirse a través de la membrana. Después de la incubación, los microorganismos se propagan sobre la membrana y a continuación son observados y contados como en el método descrito aquí anteriormente.

25 Aunque este último método supone una mejora en ciertos aspectos sobre el método original, es necesario el equipo de filtración y además es necesario limpiar y volver a esterilizar el equipo del filtro. Además, la muestra se mide necesariamente aún antes de la filtración



necesitándose por tanto un tiempo adicional y más equipo.

El dispositivo de análisis de esta invención considera una matriz altamente absorbente impregnada con un medio nutriente que contiene los reactivos del análisis y un agente de suspensión. Para usarlo, la matriz impregnada se sumerge en él, momentáneamente o de lo contrario se satura con el líquido a inocular la matriz que absorbe un volumen conocido de muestra. Dependiendo del medio nutriente y del reactivo usado puede realizarse un análisis semicuantitativo o diferencial. Análogamente pueden inocularse varios dispositivos, conteniendo cada uno un medio y un reactivo diferentes, y pueden realizarse simultáneamente tanto análisis semicuantitativos como diferenciales. Además, se ha determinado que pueden obtenerse resultados fidedignos de análisis semicuantitativos y diferenciales en menos de 12 horas.

TECNICA ANTERIOR

Se conoce actualmente un dispositivo de ensayo o análisis que muestra un método para inocular una matriz impregnada de nutriente por inmersión directa de ella en la muestra a analizar. Este dispositivo se describe en la patente norteamericana núm. 2.904.474 e incluye generalmente una tira de papel impregnada con un medio nutriente que contiene una sustancia de ensayo, teniendo la tira un soporte separable y una vaina para cerrar herméticamente la tira a efectos de incubación.

La ausencia de un agente de solidificación en el dispositivo anterior ha demostrado presentar las desventajas siguientes: 1) elución de los nutrientes solubles y de las

400754



14 MAR 1978

sustancias de ensayo en el medio durante la inmersión del dispositivo en la muestra, 2) las sustancias solubles remanentes en la tira después de la inmersión tienden a difundirse hacia la porción más inferior de la tira debido a un flujo gravitatorio, y 3) los microorganismos móviles no logran localizarse y por ello no logran formar las colonias precisas o las localizaciones necesarias para los fines de análisis semicuantitativo.

5

10

15

20

25

30

La provisión de un agente de solidificación en el dispositivo de ensayo de esta invención permite al dispositivo superar todos los inconvenientes descritos previamente en la técnica anterior. El dispositivo de ensayo de esta invención se adapta así para la inoculación con la muestra directamente y por ese medio elimina la necesidad para medir y/o diluir previamente la muestra. La inoculación directa y sin dilución proporciona el medio de cultivo sustancialmente con el mismo medio ambiente que la muestra para reducir el tiempo normalmente requerido por los microorganismos para ajustarse a un medio ambiente nuevo, aunque adecuado, y por medio de ello activa su propagación. La provisión de un dispositivo de ensayo para realizar análisis diferenciales y capaz de ser inoculado directamente con la muestra permite llevar a cabo a la vez análisis semicuantitativos y diferenciales.

Un dispositivo para analizar microorganismos en una muestra adaptado para ser inoculado por inmersión en una muestra líquida e incubada en un recipiente precintable, comprendiendo el dispositivo una matriz formada de un material altamente absorbente, preferiblemente papel de



filtro, impregnado con un medio nutriente convencional que incluye los reactivos apropiados y un agente de solidificación, impidiendo éste último la elución de los materiales impregnados durante la inmersión y permitiendo la localización de formaciones de colonias en la matriz. Puede proveerse un soporte y un recipiente para formar un dispositivo integral de análisis.

Un objeto de esta invención es proporcionar un dispositivo de análisis mejorado para analizar microorganismos en una muestra.

Otro objeto de esta invención es proporcionar un dispositivo de análisis para cultivar microorganismos que es capaz de ser inoculado por inmersión en una muestra líquida.

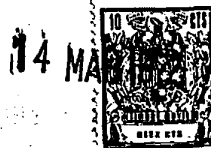
Es también otro objeto de esta invención proporcionar un dispositivo de ensayo sencillo y fiable capaz de analizar la concentración de microorganismos contenidos en una muestra líquida sin medir o diluir la muestra.

Es todavía otro objeto de esta invención proporcionar un dispositivo de ensayo adaptado para analizar diferencialmente microorganismos en una muestra, el cual dispositivo puede incularse directamente con la muestra.

Es aún otro objeto de esta invención proporcionar un dispositivo que es capaz de analizar microorganismos en una muestra sin equipo extrínseco superficial, el cual equipo necesita limpieza y esterilización.

Otro objeto de la invención es proporcionar un dispositivo de ensayo capaz de cultivar microorganismos contenidos en una muestra de ensayo dentro de un periodo de tiempo relativamente corto.

400754



Todavía otro objeto de esta invención es proporcionar un dispositivo de ensayo para cultivar microorganismos que es simple, económico, desechable y fidedigno.

5 Estos objetos y otras características y ventajas se mostrarán fácilmente aparentes con referencia a la descripción siguiente cuando se tome conjuntamente con los dibujos adjuntos.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

10 La Figura 1 es una vista en alzado lateral del dispositivo de ensayo de esta invención encerrado dentro de un recipiente;

15 la Figura 2 es una vista fragmentaria a escala ampliada de un corte del dispositivo de la Figura 1 separada del recipiente, estando tomada dicha vista a lo largo de la línea 2-2 de la Figura 1; y

las figuras 3, 4, 5 y 6 son vistas en planta de matrices del dispositivo presentando localizaciones de colonias en conjunción con ellas.

DESCRIPCION DE LA REALIZACION PREFERIDA

20 Haciendo referencia a los dibujos y particularmente a la Figura 1, el dispositivo de ensayo de esta invención se indica de una manera general mediante el número 10. El dispositivo de ensayo 10 incluye generalmente una matriz absorbente 11 unida a un soporte 12 y encapsulable dentro de un recipiente precintable 13.

25 La matriz 11 está formada de un material muy absorbente plano, tal como un papel de filtro absorbente, o similar, impregnado con un medio nutriente adecuado que incluye un reactivo y un agente de suspensión. La matriz 11

400754

14 MA



se adapta para ser inoculada sumergiéndola dentro de la muestra de ejemplar a ensayar, evitando por este medio la necesidad descrita aquí anteriormente de medir y/o diluir la muestra. Por tanto, es necesario que la matriz ll tenga una capacidad de absorción constante conocida, con la finalidad de determinaciones semicuantitativas. Así, si la matriz ll se sabe que absorbe un volumen conocido de la muestra, por ejemplo, 0,2 ml., la concentración de microorganismos en la muestra puede determinarse fácilmente, como se describe aquí a continuación.

Debe entenderse que una vez rehidratada la matriz muy absorbente ll en una muestra líquida, un volumen específico de la muestra se absorbe por la matriz ll y cualesquiera microorganismos presentes en la muestra absorbida son absorbidos análogamente por la matriz ll. De esta forma se inocula la matriz ll. Cuando la matriz inoculada ll impregnada con un medio nutriente adecuado se incuba, los microorganismos se cultivan y forman colonias.

Así para los fines de esta descripción el término "microorganismo" se refiere a la clase general de microorganismos que comprende fermento, otros hongos o bacterias presentes en la muestra a analizar. El término "colonia" se refiere al "microorganismo" subsiguiente al cultivo. El término "localización de colonias" indica el emplazamiento de una colonia, como se observa sobre la matriz ll y es sinónimo para el fin de esta descripción al término "colonia".

El medio nutriente puede ser cualquier medio convencional, o modificación de este, que se sepa proporciona un medio ambiente adecuado para el análisis seleccionado. Si

400754

14



se desea un análisis semicuantitativo, puede usarse un me-
dio nutriente tal como Bacto Brain Heart Infusion, dispo-
nible comercialmente de Difco Laboratories, Detroit, Mi-
chigan. Este tipo de medio se considera un medio general
5 y se conoce como capaz de cultivar la mayoría de los mi-
croorganismos. Si se desea un análisis diferencial, se
selecciona un medio nutriente que se sepa posee la capa-
cidad de proporcionar un ensayo positivo en presencia de
algunos microorganismos pero que deje de hacerlo en presen-
10 cia de otros microorganismos. Ejemplos de medios adecua-
dos útiles para este fin son la Formulación de Christensen
descrita en el Journal de Bacteriology, 42: 461 que se sa-
be da una reacción positiva para las especies Proteus pe-
ro que proporcionará una reacción negativa para otros mi-
15 croorganismos gram negativos, y el Citrato Simmons que es
bien conocido por su capacidad para cultivar organismos
que utilizan citratos, tales como las especies de -
Klebsiella y Enterobacter y su incapacidad para cultivar
aquellos otros que no puedan utilizar citratos, tales co-
20 mo la Escherichia coli.

El reactivo incluye preferentemente un indicador ca-
paz de proporcionar un cambio de color en la matriz ll co-
mo respuesta a un cultivo positivo de microorganismos. El
reactivo puede incluirse en el medio nutriente y puede com-
25 prender un indicador de pH simple, tal como el rojo de fe-
nol empleado normalmente en la formulación de Christensen.
Este indicador cambia de amarillo naranja a rosa brillan-
te en presencia de un microorganismo, por ejemplo especie
Proteus, capaz de romper la urea en la formulación. Análo-
30 gamente el reactivo puede incluir un indicador tipo oxida



dación-reducción, tal como uno de los distintos compuestos de tetrazolio, por ejemplo el cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (incoloro), el cual compuesto se reduce a un formazano, por ejemplo trifenilformazano (rojo intenso) por la mayoría de los microorganismos durante su crecimiento. Al preparar la matriz ll para un análisis semicuantitativo, se recomienda el trifeniltetrazolio, como indicador, ya que el producto reducido trifeniltetraformazano, no solo proporciona un color visible brillante, sino que además tiene la característica de ser insoluble. La última propiedad junto con el agente de suspensión descrito en esta memoria más adelante facilita la formación de localizaciones de colonias separadas y precisas.

La adición de un agente de suspensión en la formulación de impregnación es necesaria para evitar la elución del medio soluble y del reactivo de la matriz ll durante la inmersión de ella dentro de una muestra líquida y para localizar los microorganismos en la matriz ll seguidamente a la inoculación. La capacidad del agente de suspensión para localizar los microorganismos y mediante ello permitir la formación de colonias separadas y precisas en y sobre la matriz ll es particularmente importante en la realización de análisis semicuantitativos. El agente de suspensión se emplea en la formulación, en concentraciones que varían desde aproximadamente 0,1% hasta aproximadamente 5% en peso, con un margen preferido de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 3,0% en peso.

El agente de suspensión se caracteriza por ser soluble en solución acuosa, formando una suspensión coloidal viscosa. Los agentes de suspensión que se han encontrado

400754



son adecuados bien solos o en combinación, para este fin, son coloides, gomas inertes, algas marinas, alginatos y diferentes polisacáridos y polipéptidos.

5 Una vez que la matriz 11 está impregnada se seca a continuación. Ya que una temperatura elevada puede afectar a algunos de los materiales nutrientes y de análisis impregnados en la matriz 11, se ha encontrado que es preferido secar la matriz 11 impregnada, a vacío o en una estufa con tiro forzado a aproximadamente 40-60°C durante
10 1 a 3 horas.

15 Para proporcionar un dispositivo de análisis 10 integral conveniente, la matriz 11 impregnada seca se une a un soporte o asa 12. El soporte 12 es un miembro prolongado formado preferentemente de un material insoluble rígido, tal como una tira de poli(tereftalato de etileno) o similar. Ya que la matriz 11 está adaptada para fines microbiológicos más que para fines químicos, debe tenerse un cuidado especial para fijar la matriz 11 al soporte 12 con un adhesivo microbiológicamente inerte. Para este fin
20 resultan adecuadas ciertas cintas adhesivas de doble cara, tal como ~~4~~ 415 y 419, disponibles comercialmente de 3M Company, Minneapolis, Minnesota. Se ha comprobado también que la matriz 11 puede fijarse fácilmente al soporte 12 mediante ligazón sin afectar ni la matriz 11 ni el medio
25 impregnado ni el reactivo. Para facilitar esto, se dispone entre el soporte 12 y la matriz 11 una hoja fina de polietileno 14 (Figura 2), y se aplica suficiente calor al lado 16 del soporte 12 distante de la matriz 11 para hacer que la banda se funda y ligue la matriz 11 al soporte 12.

30 La matriz 11 (figura 1) y el soporte 12 unidos se

400754

14 MAR 1972



colocan entonces en el recipiente capaz de ser cerrado herméticamente 13, esterilizado y el recipiente 13 se cierra herméticamente. Normalmente se ha encontrado a este fin cualquier recipiente convencional 13 capaz de ser vuelto a cerrar herméticamente. Se ha encontrado que es aceptable para este fin una bolsa de polietileno o similar, la cual se cierra herméticamente a lo largo de sus lados 17 y 18 y del fondo 19. La parte superior 21 del recipiente o bolsa 13 se provee preferentemente con una tapa convencional de cierre hermético 22 que por fricción cierra herméticamente el recipiente 13 después de la aplicación de presión sobre él, y se elimina la necesidad de instrumentos especiales de cierre hermético. Con preferencia, el recipiente 13 está formado de un material transparente claro que permite al operador observar visualmente y "leer" la matriz 11 dentro del recipiente 13 sin exponer ni al operador ni al laboratorio a los microorganismos cultivados.

Para su uso, el recipiente 13 se abre y el soporte estéril 12 y la matriz 11 se sacan de él. La matriz 11 se sumerge dentro de la muestra líquida para analizar, tal como orina, leche, agua, o similar, para rehidratar e inocular la matriz 11. La matriz 11 inoculada y el soporte 12 unido se vuelven a colocar asépticamente en el recipiente 13, y el recipiente 13 se vuelve a cerrar herméticamente y se incuban a temperatura óptima, dependiente del microorganismo sospechado, durante por lo menos 4 horas. La mayoría de los microorganismos se incuban ópticamente a temperaturas que varían desde aproximadamente 4°C hasta aproximadamente 40°C y con preferencia desde aproximadamente 35°C hasta aproximadamente 39°C. A continuación del período

400754

74 MAR



do de incubación, la matriz ll se observa visualmente y se "leen" los resultados del análisis particular. Si el análisis es un análisis semicuantitativo, se observan, como se describe aquí a continuación, la aparición de puntos coloreados indicando localizaciones de colonias y la densidad de ellas. Si el análisis es un análisis diferencial, se observa el color de la matriz, cuyo color es indicativo de un cultivo positivo o negativo. Una vez que se conocen los resultados de los análisis, el dispositivo 10 puede esterilizarse y desecharse. Sin embargo, se ha observado que la esterilización no afecta a la mayoría de cambios de color formados en la matriz ll como resultado del cultivo de los microorganismos, y el dispositivo 10, o simplemente la matriz ll, puede guardarse como un registro permanente, si se desea.

Debe ser entendido por aquellos versados en la técnica que la mayoría de los análisis de concentración se expresan en unidades de 10 elevadas a una cierta potencia para indicar la concentración relativa de microorganismos presentes en un mililitro de muestra. Esto puede fácilmente entenderse con referencia a las figuras 3-6 en las que se ilustran las localizaciones de colonias, tal como aparecen sobre la matriz ll en distintas concentraciones. Las localizaciones de colonias 23a y 23b en las Figuras 3 y 4, respectivamente, pueden ser fácilmente contadas, mientras que en las Figuras 5 y 6, la multiplicidad de localización de colonias 23c y 23d es tan grande que un recuento específico sería muy difícil. Sin embargo, ya que el número de localizaciones de colonias es solamente relativo, la concentración de microorganismo por mililitro puede visua-



lizarse y determinarse fácilmente comparando la densidad de las colonias que aparecen sobre la matriz ll con una carta o patrón comparativo.

5 Con el fin de ilustrar esto, se supone que se conoce que cada una de las matrices lla a lld en las Figuras 3-6 absorben 0,2 ml de una muestra acuosa. Puede entonces determinarse fácilmente que el número y densidad de localizaciones de colonias 23a observable en la Figura 3
10 indica que hay 4 localizaciones de colonia 23a contenidas en 0,2 mililitros de la muestra indicativa de 20 microorganismos en 1,0 mililitros en la muestra analizada. Sin embargo, ya que las concentraciones expresadas son solo relativas, una concentración de esta cantidad se indica generalmente como 10^1 microorganismo por mililitro. La
15 Figura 4 expresaría 10^2 ó aproximadamente 100 microorganismos por mililitro.

20 En las Figuras 5 y 6 el número de localizaciones de colonias 23c y 23d están muy aumentadas, y a este propósito, la densidad de las localizaciones de colonias determinan la concentración de los microorganismos en la muestra. La Figura 5 indicaría 10^3 ó aproximadamente 1000 microorganismos por mililitro y la Figura 6 expresaría 10^4 microorganismos por mililitro. Las concentraciones superiores a 10^5 microorganismos por mililitro aparecería sobre la matriz ll como un color sustancialmente sólido,
25 dando a la matriz ll una apariencia de color confluyente.

Los ejemplos siguientes ilustrarán el dispositivo mejorado de ensayo de esta invención.

400754

14 M



EJEMPLO I

Un dispositivo de ensayo

Se añadieron 20,0 gramos de alginato de sodio a 1 litro de agua destilada y se agitó hasta disolución. Se añadió la siguiente formulación a esta solución:

5

Cerebro de ternera, infusión	220 gramos
Corazón de vaca, infusión	275 gramos
Proteosa Peptona	11 gramos
Dextrosa	2,2 gramos
10 Cloruro Sódico	5,5 gramos
Fosfato disódico	2,75 gramos
Cloruro de trifeniltetrazolio	0,165 gramos
Polysorbate 80	0,1 ml (0,01%)

10

15

Los ingredientes se mezclaron íntimamente hasta disolverse en la solución de alginato hasta dar un pH final de 7,4.

20

Se sumergieron en la solución anterior hojas de papel de filtro Schleicher y Schuell Nº 470, hasta que se saturaron completamente y se escurrieron entre dos varillas de vidrio muy juntas para separar el exceso de disolución de ellas y para asegurar la uniformidad de impregnación. Se secaron entonces las hojas en estufa de tiro forzado durante aproximadamente dos horas a 55°C. Las hojas deshidratadas se cortaron a continuación en tiras midiendo 1 x 2 centímetros, habiéndose encontrado que ese tamaño de tira absorbe 0,2 ml de muestra líquida.

25

Se prepararon soportes para las tiras cortando hojas de poli(tereftalato de etileno) en bandas, midiendo aproximadamente 1 x 6 centímetros. Para unir las tiras a



los soportes, se colocaron las tiras sobre una mesa acolchada y sobre cada tira se colocó una hoja delgada de polietileno. A continuación se colocaron las bandas sobre las hojas de polietileno, de forma tal que cada tira estaba dispuesta adyacente a un extremo de cada banda. Se colocó sobre la parte superior de las bandas una placa calefactora calentada aproximadamente a 138°C, para fundir las hojas de polietileno y ligar la tira a las bandas. Los soportes y las tiras unidas a ellos se colocaron a continuación en recipientes transparentes capaces de ser cerrados herméticamente y esterilizados con óxido de etileno.

EJEMPLO II

Análisis Semi-cuantitativo

15 a. Preparación de las muestras para análisis.

Se prepararon las muestras para análisis propagando cultivos de Escherichia coli, Proteus mirabilis, Enterobacter aerogenes, Pseudomonas aeruginosa, Estafilococcus aureus y Streptococcus fecalis en caldos de infusión de cerebro corazón hasta una turbidez máxima (1-5x10⁹ células por mililitro). Se prepararon series de diluciones 1:10 de cada cultivo usando solución salina como diluyente para proporcionar series de suspensiones bacterianas de cada cultivo en el margen teórico de 10¹ hasta 10⁷ células por mililitro.

25

b. Análisis de las muestras

Para analizar cada una de las diluciones anteriores de la muestra de análisis, se empleó un dispositivo de análisis como el descrito en el Ejemplo I. Se abrió el re

400754



5 recipiente y se sacó de él el soporte y la tira. Se sumer-
gió la matriz estéril deshidratada en una de las dilucio-
nes de la muestra para inocular y rehidratar la matriz
o tira. La tira inculada junto con el soporte, se colocó
de nuevo en el recipiente. El recipiente se cerró hermé-
ticamente entonces para evitar la deshidratación de la
tira y se colocó en una cámara de incubación mantenida
a 37°C durante un periodo de aproximadamente 12 horas.
Se realizó un recuento convencional en placa en cada una
10 de las diluciones de la muestra para verificar las concen-
traciones de células contenidas en ellas y para servir
como control mediante el cual los resultados observados
en el dispositivo de análisis pudieran compararse.

15 Subsiguientemente al periodo de incubación, se ex-
trajeron los dispositivos del incubador y las matrices
fueron observadas a través de los recipientes transparen-
tes. La reducción del trifeniltetrazolio incoloro por los
microorganismos al trifeniltetraformazano de color rojo
púrpura fué visible en todas las tiras incubadas. En aque-
20 llas tiras que habían sido inculadas con muestras que te-
nían una concentración celular de menos de 10^5 células
por mililitro se observaron puntos coloreados rojo púr-
pura definidos y precisos indicadores de una localización
de colonia, dichos puntos aumentaban en número conforme
25 aumentaba la concentración conocida de las muestras de
análisis. Se observó un color rojo púrpura confluyente
en todas las tiras inculadas con una muestra que tenía
una concentración de 10^5 células por mililitro o mayor.

30 Comparando el número de puntos que aparecen en las
tiras con las concentraciones celulares en las muestras



de análisis se halló que existía una relación definida y precisa. Se observó que la densidad o número de puntos aumentó de acuerdo con la concentración de microorganismos en las muestras de análisis.

5 Cuando se repitieron los análisis usando muestras clínicas de orina, muestras de leche fresca pasteurizada. Calidad A y una muestra de leche estropeada se obtuvieron sustancialmente los mismos resultados. Las localizaciones de colonias en las tiras correspondían a los resultados obtenidos mediante un control de recuento de agar en placa.

10 Cuando otros agentes de suspensión comunes, tales como distintos alginatos, colas inertes de polisacáridos, polisacáridos lineales, algas marinas y concentraciones bajas de ágar, se sustituyeron por alginato sódico en la formulación del Ejemplo I, se observaron sustancialmente los mismos resultados, porque las colonias propagadas se localizaron y se obtuvo una determinación semicuantitativa.

15 Cuando se repitieron los análisis usando un dispositivo preparado de acuerdo con el Ejemplo I, solamente ausente un agente de suspensión, se observaron las tiras con un color confluyente rosa o rojo púrpura a todas las concentraciones después de la incubación. De esa forma, se encontró que era imposible una determinación semicuantitativa de las diluciones de la muestra en ausencia del agente de suspensión por fallo para localizar los microorganismos.

EJEMPLO III

Análisis diferencial

20 Se añadieron 20,0 g de alginato sódico a 1 litro de agua destilada para preparar una solución de él de acuerdo

400754

14 MAR



do con el procedimiento del Ejemplo 1. A esta solución se añadió una Fórmula de Chistensen modificada que tenía la formulación siguiente:

5	Peptona	1,00 g
	Glucosa	1,00 g
	ClNa	5,00 g
	PO ₄ H ₂ K	2,00 g
	Urea	20,00 g
10	Rojo de Fenol	0,12 g
	Polysorbate 80	0,1 ml

La formulación fué mezclada íntimamente con la solución de alginato sódico hasta que se disolvió y la solución resultante se impregnó en papel de filtro S & S No. 470 de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo I. Se secaron las hojas de papel impregnado en una estufa a vacío a 40°C durante un periodo de aproximadamente 2 horas. Las hojas impregnadas deshidratadas se cortaron en tiras, se unieron a soportes, se colocaron en recipientes y se esterilizaron como se describe en el Ejemplo I.

Se sacaron del recipiente a continuación los soportes y las tiras y se inocularon en todas las diluciones de muestra descritas en el Ejemplo IIIa que contenían Proteus mirabilis, Enterobacter aerogenes y Escherichia coli y se incubaron durante aproximadamente 12 horas a 36°C.

Se observó un color rosa confluyente en todas las tiras inoculadas en todas las concentraciones de las soluciones de la muestra que contenía Proteus mirabilis. No hubo cambio aparente en las tiras inoculadas con las muestras de análisis que contenían Enterobacter aerogenes y Escherichia coli.

400754

14 MAR



EJEMPLO IV

Análisis diferencial

Se añadieron 20,0 g de alginato sódico a 1 litro de agua destilada para preparar una solución como se describe en el Ejemplo I. A esta solución se añadió un medio citrato de Simmons modificado que tenía la formulación siguiente:

	$PO_4H_2NH_4$	1,00 g
	ClNa	5,00 g
10	SO_4Mg	0,20 g
	PO_4HK_2	1,00 g
	Citrato sódico	2,00 g
	Azul de bromotimol	0,80 g
	Polysorbate 80	0,1 g

15 La formulación anterior se mezcló íntimamente y se disolvió en la solución que fué impregnada entonces en hojas de papel de filtro S & S Núm. 470 y se repitió el procedimiento de preparación de un dispositivo de análisis como se describe en el Ejemplo I.

20 Las tiras así preparadas se inocularon y rehidrataron en todas las concentraciones de las tres muestras de análisis del Ejemplo III y se incubaron durante aproximadamente 12 horas a 37°C.

25 Las tiras inoculadas en todas las concentraciones de las muestras de análisis que contenían Enterobacter aerogenes cambiaron de un color verde pálido confluyente a un color azul brillante confluyente indicando la presencia de especies Enterobacter. Las tiras inoculadas en las muestras de análisis que contenían Proteus Mirabilis y Escherichia coli
30 mantuvieron un color verde pálido confluyente.

400754 24 MAR 1953



EJEMPLO V

Análisis diferencial

5 Se añadieron 20,0 g de Kelzan, un polisacárido lineal disponible comercialmente de Kelco Laboratories de San Diego, California, a un litro de agua destilada para preparar una solución de él. A esta solución se añadió un medio Levine EMB modificado que tenía la formulación siguiente, y se agitó a fondo hasta que se mezcló y se disolvió.

10	Peptona	10,0 g
	Lactosa	10,0 g
	Fosfato dipotásico	2,00 g
	Eosina Y	4,00 g
	Azul de metileno	0,650 g
15	Polysorbate 80	0,1 ml

Se prepararon tiras mediante impregnación de la disolución resultante en hojas de papel de filtro S & S no. 470 y se hicieron dispositivos de análisis de acuerdo con el Ejemplo I.

20 Las tiras se sumergieron en todas las concentraciones de las muestras de análisis descritas en el Ejemplo III. Las tiras inoculadas en las muestras que contenían - Escherichia coli se observó que tenían un brillo metálico verde característico. Los dispositivos inoculados en las
25 muestras de análisis que contenían Enterobacter aerogenes y Proteus mirabilis se observó que permanecían en un color violeta oscuro exento de todo brillo.

30 Aunque la descripción y los ejemplos anteriores se dirigen primordialmente a un dispositivo de análisis que tiene una matriz unida a un soporte y contenida en un re-

400754

14 MAR 1972



5 cipiente, debe reconocerse que la invención se refiere tam-
bién a solamente la producción de la matriz impregnada.
Por ejemplo, puede usarse equipo de laboratorio convencio-
nal tal como pinzas y cajas de porta-objetos para susti-
10 tuir el soporte 12 y el recipiente 13, respectivamente.
La matriz deshidratada estéril podría sujetarse por las
pinzas y sumergirse en las muestras para ser analizadas
y a continuación colocada en una caja de porta-objetos
e incubada. Análogamente, la matriz impregnada 11 puede
15 rehidratarse e inocularse si se desea, añadiendo un vo-
lumen medido de la muestra directamente a la matriz 11 en
lugar del procedimiento de inmersión descrito en esta me-
moria anteriormente.

15 Además, resultará claro a los expertos en la técnica
que el dispositivo es adaptable para detectar la presencia
de microorganismos en muestras distintas de líquidos. Para
su empleo en esta forma, la matriz 11 puede rehidratarse
con agua estéril, o similar, e inocularse por contacto
con la muestra "sólida" a analizar.

20 Se entiende también que la presente invención no
está limitada a los materiales muy absorbentes específi-
cos, medios nutrientes, reactivos o agentes de suspensión
descritos en los anteriores ejemplos, ya que un experto
en la técnica reconocerá que pueden emplearse variedad o
25 combinación amplias de materiales muy absorbentes, medios
nutrientes, reactivos y agentes de suspensión para llevar
a cabo el objetivo del nuevo dispositivo de análisis.

30 En resumen, la presente invención se refiere a un
dispositivo de análisis o ensayo adaptado para analizar
microorganismos en una muestra, teniendo el dispositivo

400754



una matriz absorbente impregnada con un medio nutriente
incluyendo un reactivo y un agente de suspensión. El dis-
positivo de análisis se adapta para ser inoculado median-
te inmersión en una muestra de análisis y para cultivar
5 los microorganismos contenidos en dicha muestra después
de la incubación. El nuevo dispositivo de análisis puede
proporcionar selectivamente un análisis semicuantitativo
o un análisis microbiológico diferencial relativamente
rápido de una muestra siguiendo un procedimiento simple
10 y económico.

Esta solicitud, que corresponde a la presentada
en los Estados Unidos de América el 16 de Marzo de 1.971,
bajo el Núm. 124.671, se acoge a los beneficios del Artícu-
lo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

15

REIVINDICACIONES

20

Los puntos de invención propia y nueva que se pre-
25 sentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de

14-7-74

-23-

ME

400754



Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

5 1ª.- Un dispositivo de ensayo para analizar microorganismos en una muestra, cuyo dispositivo está adaptado para ser inoculado con una muestra e incubado en un recipiente susceptible de ser cerrado herméticamente, comprendiendo el dispositivo: una matriz absorbente impregnada con un medio nutriente, incluyendo un reactivo y un agente de suspensión.

10 2ª.- Un dispositivo de ensayo según la reivindicación 1ª, en el que dicha matriz incluye un material plano muy absorbente.

15 3ª.- Un dispositivo de ensayo según la reivindicación 2ª, en el que dicho material muy absorbente tiene una capacidad de absorción constante conocida.

4ª.- Un dispositivo de ensayo según la reivindicación 2ª, en el que dicho reactivo incluye un indicador de color.

20 5ª.- Un dispositivo de ensayo según la reivindicación 4ª, en el que dicho indicador es cloruro de trifeniltetrazolio.

25 6ª.- Un dispositivo de ensayo según la reivindicación 2ª, en el que dicho agente de suspensión incluye una sustancia soluble capaz de formar una suspensión coloidal viscosa en una solución acuosa.

14-7-74

mfe

400754

16 JUL.



7^a.- Un dispositivo de ensayo según la reivindicación 2^a, en el que dicho agente de suspensión se selecciona de un grupo consistente en coloides, algas marinas, gomas inertes, polisacáridos y alginatos.

5 8^a.- Un dispositivo de ensayo según la reivindicación 7^a, en el que dicho agente de suspensión es alginato sódico.

10 9^a.- Un dispositivo de ensayo según la reivindicación 7^a, en el que dicho agente de suspensión es un polisacárido lineal.

10^a.- Un dispositivo de ensayo según la reivindicación 1^a, en el que dicha matriz está fijada a un soporte alargado rígido.

15 11^a.- Un dispositivo de ensayo para analizar microorganismos en una muestra.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan y con los fines que se han especificado.

20 Esta Memoria consta de veinticinco hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 16 JUL. 1974

P.A.

Asiento de Elizaburt
Por Poderes

mce

14-7-74

400754

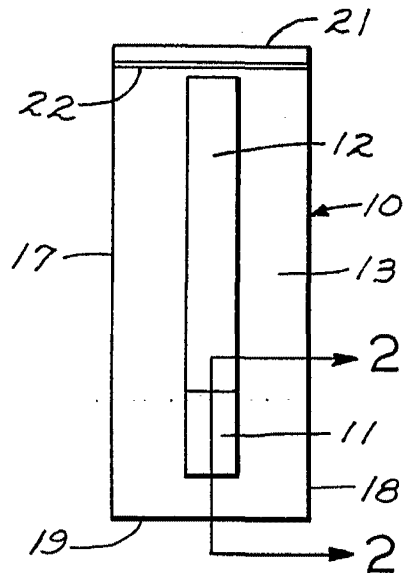


FIG 1

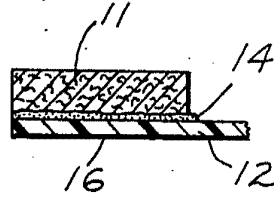


FIG 2

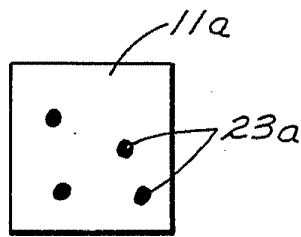


FIG 3

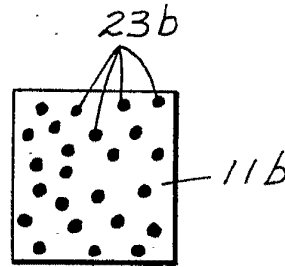


FIG 4

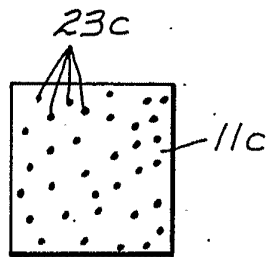


FIG 5

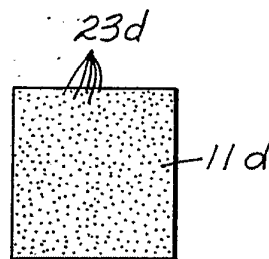


FIG 6

Alberto de la Cruz
For Podes