

402092



Int. Cl.<sup>2</sup>: A61B

Nº 402.092

## MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un<sup>a</sup>

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: BEECHAM GROUP LIMITED.

RESIDENCIA: Beecham House, Great West Road, BRENTFORD,  
Middlesex, Inglaterra.

ENUNCIADO: PERFECCIONAMIENTOS INTRODUCIDOS EN DISPOSI-  
TIVOS DE ENSAYO PARA DETERMINAR LA SENSIBI-  
LIDAD DE UN MICROORGANISMO A UN ANTIBIOTICO.

Prioridad: Patente británica n.º 11390/71 del 26 abril 1971.



402092

1 Esta invención se refiere a un nuevo dispositivo de  
ensayo para uso en la determinación de la sensibilidad de  
los microorganismos a los antibióticos.

5 El ensayo de la sensibilidad a los antibióticos  
de los microorganismos, especialmente de las bacterias, es  
un proceso rutinario en los laboratorios clínicos. Los mé-  
todos empleados para este ensayo pueden diferir en los dis-  
tintos laboratorios pero en principio todos los ensayos  
caen en uno u otro de dos grupos. Un grupo comprende los en-  
sayos que implican la dilución en serie de la droga y el  
otro grupo comprende los ensayos que se describen como en-  
sayos de difusión. En la siguiente descripción de la técni-  
ca anterior, nos referimos en particular a los problemas  
en el ensayo de bacterias.

15 El método de ensayo de la sensibilidad de dilución  
en serie implica la preparación de una serie de concentra-  
ciones de un antibiótico, ya sea en medio sólido o líquido,  
que mantenga el desarrollo de la bacteria que ha de ser en-  
sayada. Los medios líquidos son convenientemente dispensa-  
dos en tubos de ensayo mientras que los medios sólidos son  
20 habitualmente vertidos en placas Petri. Es práctica común  
preparar la gama de concentraciones de antibiótico con una  
serie de diluciones al doble. De esta forma, la concentra-  
ción de antibiótico en cada tubo o placa Petri difiere de  
25 la del miembro adyacente de la serie en un factor de 2.  
Con objeto de realizar el ensayo, cada tubo o placa Petri  
es inoculado con la bacteria en cuestión y después de un  
periodo de incubación se observa el crecimiento bacteriano  
o la ausencia de crecimiento a cada concentración de anti-  
biótico. De esta forma se determina la concentración mínima



402092

1 de inhibición del antibiótico a la dilución más próxima  
utilizada en la serie.

Este tipo de ensayo es probablemente el método  
más satisfactorio de determinación de la sensibilidad de  
5 una bacteria al antibiótico. Sin embargo, el método es la-  
borioso y la mayor parte de los laboratorios químicos se  
sienten incapaces de utilizarlo como proceso rutinario. La  
mayoría de los laboratorios utilizan un método de difusión  
para el ensayo de la sensibilidad y entre estos el método  
10 del disco de papel es el más ampliamente empleado.

En el ensayo de sensibilidad en disco de papel,  
se prepara en primer lugar una capa de un medio de ágar ade-  
cuado en una placa Petri y después la superficie se inocula  
con la bacteria que ha de ser ensayada. Después se coloca  
15 sobre la superficie del ágar un pequeño disco de papel im-  
pregnado con el antibiótico y a continuación se incuba la  
placa Petri para permitir que tenga lugar el crecimiento  
bacteriano. Pueden colocarse convenientemente sobre la mis-  
ma placa Petri varios discos de papel, cada uno de ellos  
20 conteniendo un antibiótico diferente. Durante el periodo de  
incubación, el antibiótico se difunde desde el papel al ágar  
y establece un gradiente de concentración. Con tal de que la  
cantidad del antibiótico sobre el disco sea adecuada, el  
gradiente de concentración será tal que a alguna distancia  
25 del disco la concentración de antibiótico en el ágar corres-  
ponderá a la sensibilidad de la bacteria bajo ensayo. Después  
del periodo de incubación se producirá de esta forma una zo-  
na de inhibición; dentro de esta zona la concentración del  
antibiótico se encontrará a un nivel inhibitorio mientras  
30



402092

16 JUN 1972

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30

que fuera de esta zona la concentración será inferior al nivel inhibitorio. Como resultado del gradiente de concentración del antibiótico que se establece en este ensayo, el tamaño de la zona de inhibición producida puede ser utilizado como un índice de la sensibilidad de la bacteria bajo ensayo; una zona grande indicará que la bacteria es sensible a concentraciones bajas de antibiótico mientras que una zona pequeña indicará que la bacteria es solamente inhibida por concentraciones más altas de la droga. Sin embargo, la sensibilidad de la bacteria no es el único factor que determina el tamaño de la zona de inhibición producida en este ensayo. La cantidad de antibiótico presente sobre el disco también influye claramente sobre el tamaño de la zona. Otros factores influyen en dicho tamaño, comprendido el espesor del ágar y las velocidades relativas a las cuales se difunde el antibiótico y tiene lugar el crecimiento bacteriano. Si el número de bacterias utilizado para inocular la placa es pequeño o si la velocidad a la cual transcurre el crecimiento bacteriano es lenta, transcurrirá correspondientemente un periodo de tiempo mayor durante el cual puede tener lugar la difusión hacia afuera del antibiótico. Los niveles inhibitorios de antibiótico pueden entonces ser alcanzados en puntos más alejados del disco de lo que ocurriría en otro caso y resultarán zonas relativamente grandes de inhibición. Inversamente, los factores que favorecen el rápido desarrollo de la bacteria de ensayo dan lugar a la formación de zonas de inhibición relativamente pequeñas porque en estas circunstancias ha transcurrido menos tiempo para la difusión hacia afuera de la droga.

402092



1  
5  
10  
15  
20  
25  
30

En la puesta en práctica del ensayo de sensibilidad en disco, la importancia de la normalización del proceso ha sido subrayada por muchos autores. Algunos han recomendado procesos de normalización tanto para la puesta en práctica del ensayo como para la interpretación de los resultados. De acuerdo con estas recomendaciones, una bacteria se considera sensible a un antibiótico particular cuando el diámetro de la zona de inhibición pasa de un cierto tamaño. También se definen los diámetros de zona que indican una sensibilidad intermedia o resistencia. A pesar de estos y otros intentos para normalizar el ensayo de sensibilidad en disco, la situación continúa siendo generalmente poco satisfactoria. No está claro si esto es debido a la inadecuación de la normalización o al fallo de muchos laboratorios para poner en práctica esta normalización. En cualquier caso, la situación no es satisfactoria. En 1960, un grupo de técnicos en Birmingham llevaron a cabo un examen de los ensayos de la sensibilidad a los antibióticos, en el que se enviaron seis cultivos bacterianos a un número de laboratorios de hospitales para ensayarlos por el método rutinario del laboratorio. Los resultados mostraron una marcada ausencia de concordancia entre un laboratorio y otro. Por ejemplo, en el caso de un cultivo, quince laboratorios indicaron que el cultivo era sensible a la estreptomina mientras que trece indicaron que era resistente. Análogamente, en el caso de otro cultivo, once laboratorios informaron que era sensible a la penicilina mientras que diecinueve laboratorios informaron que era resistente. En 1965 se publicó un informe de los resultados de una prueba de los ensayos de sensi-

402092



1 bilidad a los antibióticos, organizada por el Bacteriology  
Committee de la Association of Clinical Pathologists, en  
el que tomaron parte 154 laboratorios. Se enviaron cuatro  
cultivos bacterianos a cada laboratorio para su ensayo por  
5 el método rutinario del laboratorio. El informe llegó a la  
conclusión de que "los resultados justifican las quejas de  
los clínicos de que los ensayos de laboratorio, tal como se  
realizan en la actualidad, no son fiables".

Más recientemente, se ha publicado un informe de  
10 un estudio de los ensayos de la sensibilidad a los antibió-  
ticos, en el que se enviaron dos cultivos bacterianos a 73  
laboratorios en Australia para la evaluación rutinaria de  
los antibióticos. El informe de los resultados indica que  
respecto a la penicilina G, por ejemplo, con uno de los cul-  
15 tivos 26 laboratorios informaron que era resistente y 34  
informaron que era sensible, mientras que 9 consideraron  
que su sensibilidad era intermedia. El otro organismo fué  
considerado resistente por 19 laboratorios pero sensible por  
51 y 3 laboratorios lo consideraron intermedio.

20 El método más satisfactorio para determinar la sen-  
sibilidad sería probablemente el ensayo de dilución en se-  
rie, si no fuera por el hecho de que es considerado como de-  
masiado laborioso y en este aspecto el objeto de los proce-  
dimientos de normalización es permitir que el tamaño de la  
25 zona de inhibición pueda ser relacionado directamente con  
la concentración mínima de inhibición de la bacteria bajo  
ensayo. Por lo tanto, es conveniente disponer de un ensayo  
que posea la sencillez del método del disco de papel pero  
que dé el tipo de resultado obtenido en el ensayo de dilu-  
30 ción en serie, es decir, inhibición o falta de inhibición

402092



1 del crecimiento bacteriano a concentraciones precisas del  
antibiótico.

Un objeto de esta invención es proporcionar un nue-  
vo dispositivo de ensayo para uso en la determinación de la  
5 sensibilidad de un microorganismo a un antibiótico y con el  
que se puedan obtener resultados uniformes.

Otro objeto de esta invención es proporcionar un  
dispositivo de ensayo para uso con los antibióticos que no  
son estables en medios gelificados durante el almacenamien-  
10 to, especialmente las penicilinas.

En consecuencia, esta invención proporciona un  
dispositivo de ensayo para determinar la sensibilidad de un  
microorganismo a un antibiótico, cuyo dispositivo de ensayo  
comprende un elemento básico que contiene en una de sus su-  
15 superficies planas por lo menos un pocillo poco profundo como  
el definido aquí que contiene un medio gelificado y un mate-  
rial absorbente del que por lo menos parte está impregnado  
con un antibiótico y de dimensiones tales que al ser puesto  
en contacto con el medio gelificado situado en el pocillo se  
20 consigue disponer de material absorbente impregnado de anti-  
biótico en contacto prácticamente con la superficie total  
del medio gelificado.

Preferiblemente el dispositivo de ensayo compren-  
de un elemento básico con una pluralidad de pocillos poco  
25 profundos y un material absorbente impregnado con uno o más  
antibióticos en áreas discretas, cada una de las cuales co-  
rresponde al área del medio gelificado en cada pocillo. Pre-  
feriblemente, el medio gelificado está constituido por ágar  
conteniendo nutrientes. Todavía mejor, el microorganismo some-  
30 tido a ensayo es una bacteria, Por "pocillo poco profundo"

402092



375

1 entendemos un pocillo con una profundidad inferior a 1 cm  
y preferiblemente inferior a 5 mm, siendo una capa preferi-  
da la de 2-3 mm de profundidad.

5 Con un bloque de ensayo en el que el elemento bá-  
sico tiene una pluralidad de pocillos, las áreas de antibió-  
tico sobre el material absorbente pueden contener diferen-  
tes antibióticos cada uno, a una o más concentraciones. Cuan-  
do el material absorbente es aplicado al medio gelificado,  
el antibiótico se difunde en el gel y durante un periodo ra-  
10 zonable de tiempo para dar una concentración uniforme y co-  
nocida en toda la masa del gel. Adecuadamente un periodo de  
1 a 3 horas permite alcanzar una concentración uniforme,  
según el antibiótico empleado. Las concentraciones de anti-  
biótico en el medio gelificado dependen de los criterios re-  
15 queridos en el ensayo y la normalización de las concentra-  
ciones utilizadas es efectuada fácilmente con el dispositi-  
vo de acuerdo con esta invención. Después de la difusión  
con el antibiótico en el medio gelificado, se retira el ma-  
terial absorbente y el medio gelificado se inocula con el  
20 microorganismo.

La sensibilidad en forma de inhibición del creci-  
miento a ciertas concentraciones del antibiótico puede ser  
determinada directamente por el método de esta invención,  
en lugar de indirectamente mediante el diámetro de una zo-  
25 na, por ejemplo como ocurre en el método habitual del dis-  
co de papel.

Se realizaron ensayos con un medio de ágar para  
determinar la velocidad de difusión de la penicilina G a  
través de una capa de 3 mm. Se prepararon unos bloques de  
30 ágar de 1 cm x 1 cm x 3 mm y sobre la superficie superior



402092

1 de los bloques se aplicaron unos cuadrados de papel de fil-  
tro de 1 cm, conteniendo 100 µg de penicilina G. Después de  
transcurrir determinados intervalos de tiempo, se determinó  
la concentración de penicilina en la superficie superior e  
5 inferior del ágar. Esta determinación se llevó a cabo reti-  
rando el papel antibiótico y aplicando un cuadrado de 1 cm  
de papel de filtro a la superficie superior e inferior de  
los bloques. De esta forma se recoge un volumen fijo de lí-  
quido por el papel de la superficie de ágar y la concentra-  
10 ción puede ser valorada frente a patrones preparados a par-  
tir de un ágar que contiene concentraciones conocidas de  
antibiótico. El antibiótico que queda en el papel original  
también es determinado frente a patrones apropiados.

15 Los resultados se encuentran en la Figura 1 de  
los dibujos que acompañan a esta memoria, confirmando que  
la distribución uniforme del antibiótico se produce rápida-  
mente.

20 Los resultados de otros ensayos están ilustrados  
en la Tabla I. En la Figura 0-0 y 0-0 se refieren a las con-  
centraciones de penicilina en la superficie superior e infe-  
rior del ágar, respectivamente y □-□ a la penicilina que  
permanece en el papel de filtro.

25

30

402092



1

TABLA I

<u>Antibiótico</u>	<u>Cantidad (µg)</u>	<u>Tiempo de difusión<sup>1</sup> (minutos)</u>
Penicilina G	1,0	110
	10	110
	100	110
Ampicilina	100	120
Tetraciclina	10	230
	100	230
Estreptomina	100	160
Eritromicina	100	220
Gentamicina	100	190

5

10

<sup>1</sup> Tiempo requerido para que la concentración de antibiótico en la superficie inferior del agar alcance 95 % de la concentración en la superficie superior, en una capa de agar de 3 mm de espesor.

15

Nota: Las cantidades de antibiótico aplicadas han sido seleccionadas por comodidad de determinación y no son las que necesariamente deben utilizarse en la práctica. El tiempo de difusión parece independiente de la cantidad de antibiótico empleada.

20

Se realizaron ensayos comparativos entre el método de esta invención y el método convencional de dilución en serie. Los resultados se encuentran en la Tabla II.

TABLA II

25

Comparación de los resultados del ensayo de difusión con la concentración mínima de inhibición determinada por dilución en serie convencional en agar. Se utilizaron cultivos de una noche en caldo no diluido y se empleó el mismo inoculum para inocular ambos ensayos. En el ensayo de difusión, los papeles de antibiótico se retiraron de la superficie de agar después de un periodo de 3 horas de difusión. En el ensayo de difusión, las placas fueron inoculadas con una muñequilla

30

402092



1 y las placas para la determinación de la C.M.I. fueron inoculadas con una gota utilizando un dispositivo automático que suministraba aproximadamente 0,003 ml.

		Concentración final de antibiótico en el ensayo de difusión (µg/ml) y crecimiento del organismo de ensayo <sup>x</sup>			C.M.I. por dilución en serie en ágar (µg/ml)
5	Bencilpenicilina	0,2	0,1	0,05	
	Staph. aureus Oxford	-	-	-	0,02
10	Staph. aureus T113	-	±	±	0,25
	Staph. aureus T137	-	±	+	0,125
	Ampicilina	0,5	0,25	0,12	
	Staph. aureus Oxford	-	-	-	0,05
	Staph. aureus T113	-	-	-	0,25
15	Staph. aureus T137	-	+	+	0,25
		10	5	2,5	
	E. coli 10418	-	-	±	2,5
	E. coli 37	+	+	+	25
	E. coli JT49	-	-	+	5
20	E. coli JT50	-	±	+	5
	E. coli JT52	-	-	+	5
	P. mirabilis WM77	-	-	+	5
	Salm. typhimurium CT	-	-	+	2,5
	Shigella sonnei II	-	-	+	2,5
25	Carbenicilina	100	50	25	
	Ps. aeruginosa A	-	-	+	50
	Ps. aeruginosa R59	-	-	±	12,5
	Ps. aeruginosa R1	-	-	+	25
	Ps. aeruginosa R62	-	-	+	25
30	Ps. aeruginosa R139	-	-	+	50
		10	5	2,5	



# 402092

1	E. coli 10418	-	-	+	1,25
	E. coli 100	-	-	-	1,25
	E. coli 101	-	±	+	5,0
	Enterobacter cloacae 10005	-	-	+	5,0
5	P. mirabilis H	-	±	+	5,0
	P. rettgeri C	-	-	±	5,0
	P. vulgaris B	-	-	+	1,25
	P.morganii G	-	-	-	1,25
	Tetraciclina	5	2,5	1,25	
10	E. coli 10418	-	+	+	5,0
	E. coli 37	±	+	+	5,0
	E. coli JT49	-	±	+	5,0
	E. coli JT50	-	+	+	5,0
	E. coli JT52	+	+	+	5,0
15	P. vulgaris A	-	-	-	2,5
	P.morganii A	-	±	+	2,5
	Shigella sonnei II	-	+	+	10
	Eritromicina	0,5	0,25	0,12	
	Staph. aureus Oxford	-	-	-	0,12
20	Staph. aureus T112	-	-	-	0,12
	Staph. aureus T137	-	-	-	0,5
	Staph. aureus Smith	-	-	+	0,25

- + = crecimiento  
 ± = inhibición parcial del crecimiento  
 - = crecimiento nulo.

A título de ejemplo describiremos ahora una realización específica de la invención haciendo referencia a la Figura 2 que acompaña a esta memoria, en la que el elemento básico A es una bandeja de plástico transparente delgado.

402092



1 Contiene seis hileras, cada una de tres pocillos B, siendo  
cada pocillo circular y con una profundidad de 3 mm y un  
diámetro de 18 mm. También hay un pocillo independiente pa-  
5 ra un ensayo de control, es decir, en el que no se utiliza  
antibiótico en el medio gelificado. Cada pocillo se llena  
inundando con ágar la superficie de la bandeja.

El bloque de ensayo es completado con una hoja de  
papel de filtro D impregnada en las zonas E con seis antibió-  
ticos, cada uno de ellos a tres concentraciones. Las zonas  
10 E están dispuestas sobre el papel de filtro D de tal forma  
que cuando el papel de filtro es aplicado al elemento básico,  
cada área de ágar dispone de la correspondiente área  
de papel de filtro impregnado de antibiótico en contacto  
con ella.

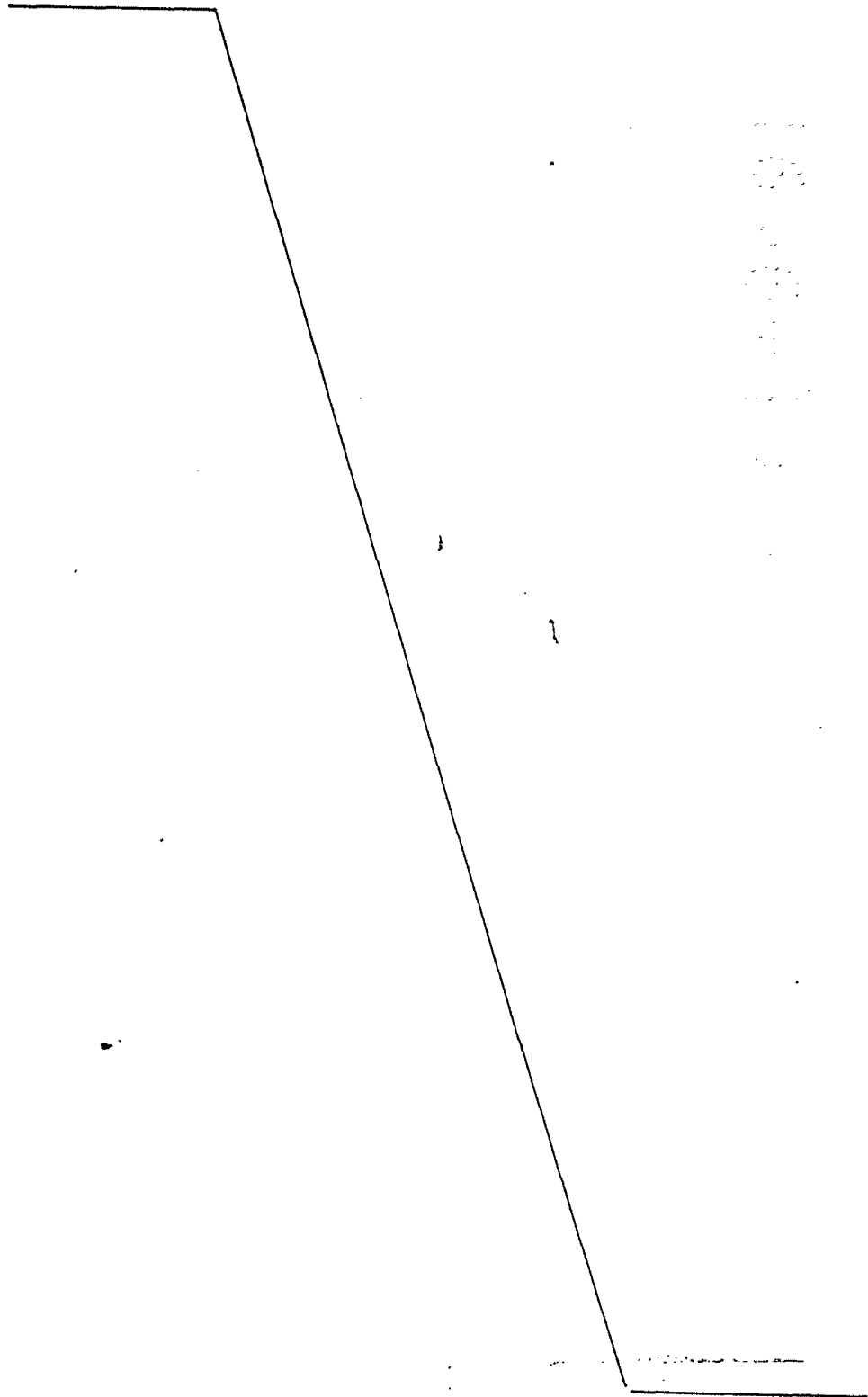
15 Otra realización específica de la invención será  
descrita haciendo referencia a la Figura 3 que acompaña a  
esta memoria, en la que el elemento básico F es una bandeja  
de plástico transparente delgado. Dispone de cuatro hileras  
de 8 pocillos G, siendo cada pocillo de 3 mm de profundidad  
20 y de 10 x 15 mm de lado; la distancia entre pocillos adyacen-  
tes a lo largo del lado más largo es de 4 mm y a lo largo  
del lado más corto es de 3 mm. Toda la bandeja es de dimen-  
siones tales que se ajusta exactamente a una tapa de dimen-  
siones de 82,5 x 124,5 mm. A lo largo de 4 pocillos cada vez  
25 se depositan convenientemente unas tiras de papel de filtro  
de 10 mm de anchura, impregnadas uniformemente con el anti-  
biótico, de forma que los papeles de filtro contienen diver-  
sas concentraciones del antibiótico y de esta forma pueden  
ensayarse cuatro muestras clínicas a 7 concentraciones dife-  
30 rentes de antibióticos con un solo control.



402092

En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30



402092



1975

REIVINDICACIONES

1

1. Perfeccionamientos introducidos en dispositivos de ensayo para determinar la sensibilidad de un microorganismo a un antibiótico, cuyo dispositivo de ensayo comprende un elemento básico que sobre una de sus superficies planas lleva por lo menos un pocillo de poca profundidad como el aquí definido, que contiene un medio gelificado, y un material absorbente del que por lo menos parte está impregnado con un antibiótico y de dimensiones tales que al ser colocado en contacto con el medio gelificado en el pocillo se dispone de material absorbente impregnado de antibiótico en contacto prácticamente con la totalidad de la superficie del medio gelificado.

5

10

15

2. Perfeccionamientos según la Reivindicación 1, en los que el elemento básico lleva una pluralidad de pocillos de poca profundidad, conteniendo cada uno de ellos un medio gelificado y un material absorbente impregnado con uno o más antibióticos en áreas discretas que corresponden cada una al área del medio gelificado en el pocillo.

20

25

3. Perfeccionamientos según la Reivindicación 1, en los que el elemento básico lleva una pluralidad de pocillos de poca profundidad, que contiene cada uno un medio gelificado, y uno o más materiales absorbentes, impregnado cada uno de ellos con un antibiótico y de dimensiones tales que los materiales pueden ser colocados en contacto con el medio gelificado en uno o más pocillos para establecer contacto prácticamente con la totalidad de la superficie del gel.

ME

30

4. Perfeccionamientos según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, en los que el medio gelificado está constituido por ágar que contiene nutrientes.



402092

1

5. Perfeccionamientos según cualquiera de las precedentes reivindicaciones, en los que el antibiótico es una penicilina.

5

6. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la patente de invención que se solicita:  
PERFECCIONAMIENTOS INTRODUCIDOS EN DISPOSITIVOS DE ENSAYO PARA DETERMINAR LA SENSIBILIDAD DE UN MICROORGANISMO A UN ANTIBIOTICO.

10

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

15

Madrid, 25 abril 1.972

, BERNARDO UNGRIA

p.p.

20

25

30

402092

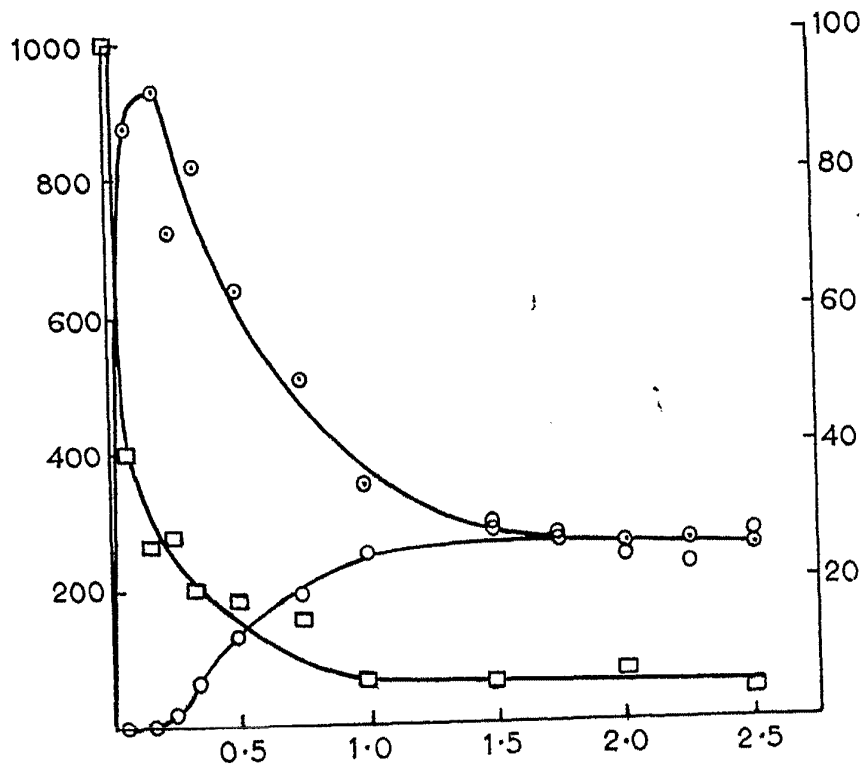
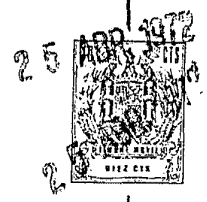


Fig. 1.

MADRID, 25 DE abril 72  
BERNARDO UNGRIA  
P. P.

402092

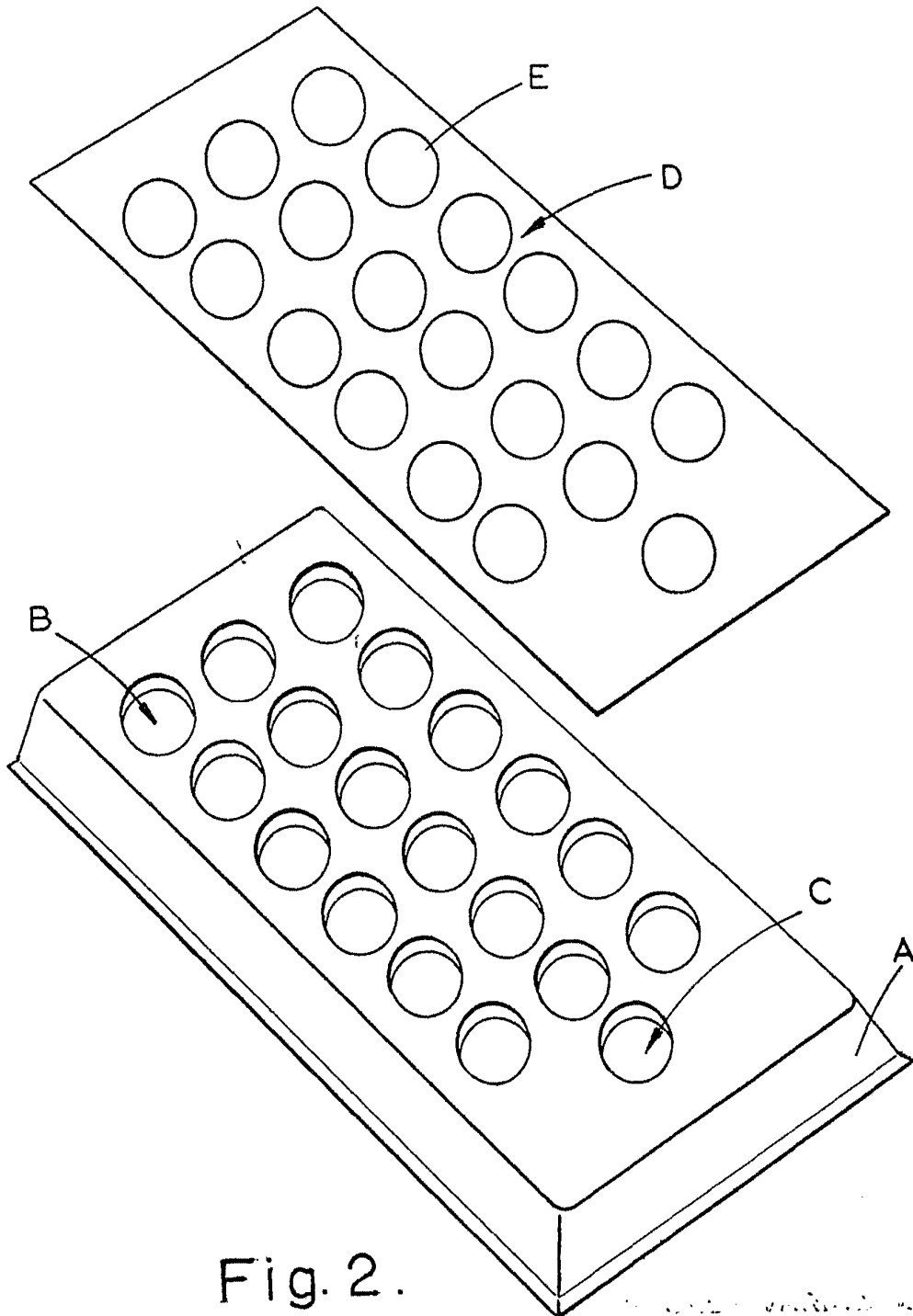


Fig. 2.

25 DE abril 1972  
BERNARDO UNGRÍA  
P. P.

402092

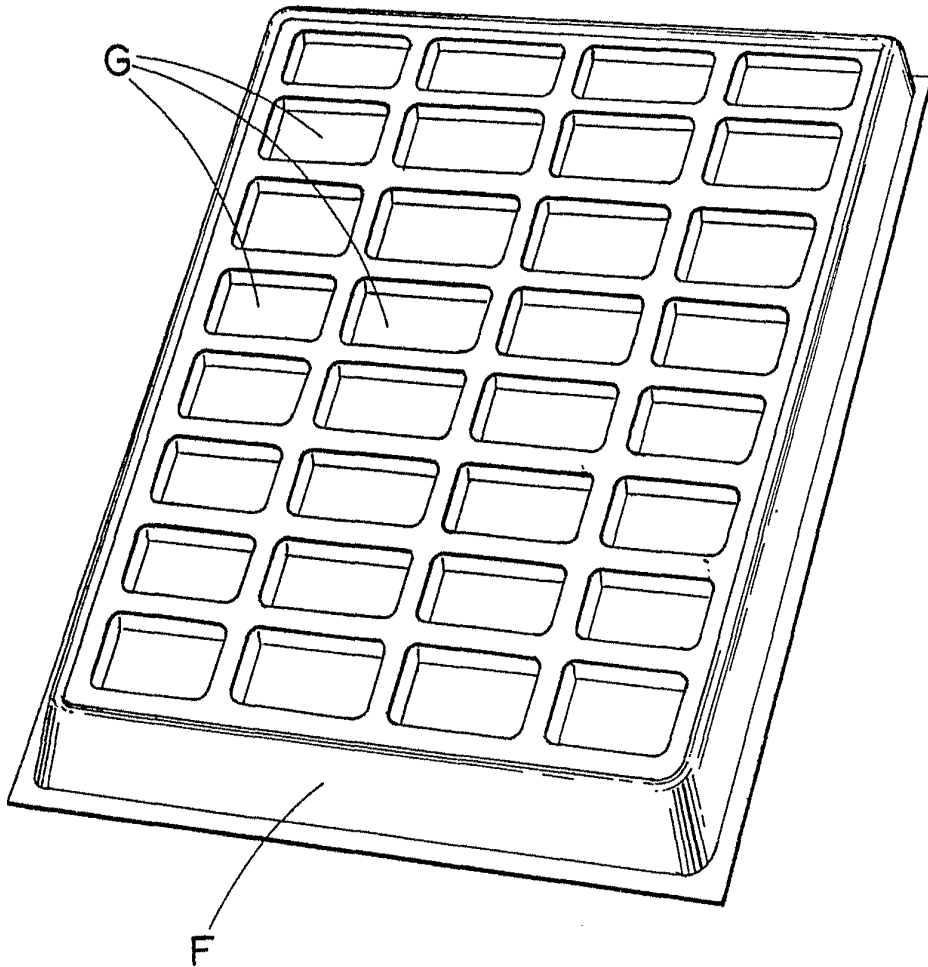


Fig. 3.

BOCA UNIVALE  
25 de abril DE 1972  
BERNARDO UNGRÍA  
P. P.