



ESPAÑA

ES	11	NUMERO	A1
	21	445.993	
	12	FECHA DE PRESENTACION	
		12-3-76	

PATENTE DE INVENCION

60 PRIORIDADES		
61 NUMERO	63 FECHA	63 PAIS
67 FECHA DE PUBLICIDAD	61 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12K	
64 TITULO DE LA INVENCION		
PROCEDIMIENTO Y DISPOSITIVO PARA DETERMINAR LA SUSCEPTIBILIDAD DE UN MICROORGANISMO ESPECIFICO A LOS ANTIBIOTICOS.		
71 SOLICITANTE (S)		
MCDONNELL DOUGLAS CORPORATION, entidad norteamericana.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
3855 Lakewood Boulevard, City of Long Beach, Estado de California, EE.UU. de A.		
72 INVENTOR (ES)		
SANDRA F. GIBSON, Ing; Norman L. Fadler, Ing.		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
GOMEZ-ACEBO		

CONCEDIDA
-3 FEB. 1977

La presente invención se refiere en general a determinar la eficacia de los antibióticos sobre los microorganismos y, de un modo más particular, se refiere a un procedimiento y dispositivo para realizar pruebas de susceptibilidad antibiótica sin aislar microorganismos.

5.

El procedimiento clínico de rutina para determinar la sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos es básicamente una operación en dos fases que exige un mínimo de 48 horas para completarla. La primera fase comprende cultivar el organismo de una muestra, y en ese caso el microorganismo se aísla. La segunda fase comprende someter el microorganismo aislado a diversos antibióticos para determinar cual de ellos inhibe el desarrollo de los microorganismos. Como es lógico, durante el período necesario para realizar las pruebas de susceptibilidad, el estado de un paciente puede empeorar o cambiar drásticamente. Por lo tanto, es imperativo poder determinar el antibiótico apropiado y administrarlo lo más pronto posible.

10.

15.

Uno de los objetos principales del presente invento es proporcionar un procedimiento y un dispositivo para realizar pruebas de susceptibilidad antibiótica en un período de tiempo relativamente corto, que puede ser de tan solo ocho horas. Otro objeto es proporcionar un procedimiento y un dispositivo de tipo indicados que se caracteriza porque la muestra clínica se examina directamente sin aislar el microorganismo sospechoso. Otro objeto es proporcionar un aparato de manejo simple y que no exige técnicos altamente especializados. Estos y otros objetos y ventajas resultarán evidentes más adelante.

20.

25.

El presente invento se incorpora en un procedimiento y dispositivo que comprende básicamente introducir un espécimen en mezclas de un medio de cultivo elegido y antibióticos cono-

30.

5. cidos. Si el espécimen contiene un microorganismo que se ve favorecido por el medio de cultivo de una mezcla, y el microorganismo no es susceptible al antibiótico, las características ópticas de la mezcla cambiarán. El invento consiste también en los componentes y en las organizaciones y combinaciones de componentes descritos y reivindicados más adelante.

En los dibujos adjuntos, que forman parte de la memoria descriptiva, y donde los números y letras iguales se refieren a partes componentes semejantes, donde tienen lugar:

10. La figura 1 es una vista en planta de una cajita construída según el presente invento y que lo incorpora.

La figura 2 es una vista tomada a lo largo de la línea de corte 2-2 de la figura 1.

15. La figura 3 es una vista tomada a lo largo de la línea de corte 3-3 de la figura 1 y,

La figura 4 es una vista en perspectiva que ilustra el espécimen diluído introducido en la cajita.

20. Refiriéndonos ahora a los dibujos (figura 1), la referencia C indica una cajita para realizar pruebas de susceptibilidad antibióticas, o sea, pruebas para determinar los efectos de antibióticos conocidos contenidos dentro de la cajita C que ejercen sobre un microorganismo introducido en la cajita C. La cajita C permite también poder identificar el microorganismo. La cajita C tiene forma rectangular, y mide preferiblemente 5,69 cm por 0,13 cm y tiene un espesor de 0,317 cm. A lo largo de uno de sus márgenes más cortos, la cajita C tiene dos indentaciones posicionadoras separadas 2, mientras que cada uno de sus márgenes más largos tiene indentación de agarre 4 que desemboca hacia fuera de la misma cerca del margen en el que desembocan las indentaciones posicionadoras 2.

25.

30.

Las indentaciones posicionadoras y de agarre 2 y 4 permiten que la cajita C se pueda manejar mecánicamente para observación y otras finalidades. Junto a uno de sus márgenes más largos, la cajita C tiene un código de identificación apropiado en una de sus superficies principales, cuyo código identifica al paciente, el tipo de medio de cultivo, la fecha de la muestra y otros datos.

La cajita C comprende un cuerpo rígido en forma de placa de plástico 10 que tiene el mismo tamaño y forma que la cajita C y, por lo tanto, comprende las indentaciones 2 y 4. La placa 10 tiene pocitos para el desarrollo de los microorganismos 12, que se disponen en una pluralidad de grupos o filas dirigidas transversalmente. Junto a cada pocito de desarrollo 12 la placa 10 está provista además de un par de cavidades de rebose 14 y 16, y estas cavidades se unen con los pocitos 12 a través de canales de rebose 18 y 20. Los pocitos 12 y las cavidades de rebose 14 y 16 se extienden completamente a través de la placa 10.

Los pocitos 12 están todos unidos por una ramificación alimentadora longitudinal 24, ramificaciones laterales 26, y ramificaciones terminales 28, todas las cuales son canales que se abren en una sola cara de la placa 10. La ramificación alimentadora longitudinal 24 se extiende a lo largo de uno de los cantos laterales más largos de la placa 10 y es paralela a dicho canto y está intersectada por una pluralidad de ramificaciones laterales transversales 26, habiendo una ramificación lateral 26 por cada fila de pocitos 12. Los pocitos individuales 12 se conectan a las ramificaciones laterales 26 a través de las ramificaciones terminales 28 que son suficientemente largas para evitar la migración del contenido de los pocitos

tos adyacentes 12 durante el período de tiempo en cuestión. Las ramificaciones terminales 28 se dirigen hasta los propios pocitos 12 pero no hasta las cavidades de rebose 14 y 16 de estos pocitos.

5. Un orificio de llenado 30 se habilita entre la ramificación longitudinal 24 y el canto lateral adyacente que es paralelo a la ramificación 24. El orificio de llenado 20 desemboca en el conducto longitudinal 24 y fuera del canto lateral. La parte exterior del orificio de llenado 30 está ocupada por un septo ajustado 32.

10. Todos los pocitos de desarrollo de microorganismos 12 en la cajita C contienen el mismo medio de cultivo selectivo que favorece a un microorganismo específico, en el sentido de que solamente dicho microorganismo, cuando se sostiene por el medio de cultivo, cambia las características de transmisión de luz del medio del cultivo en una forma característica predeterminada relacionada con el tiempo. El medio de cultivo es un medio deshidratado por congelación y se rehidrata simultáneamente al introducir en el mismo el espécimen. Realmente, el medio de cultivo experimenta un cambio óptico como resultado de la acción metabólica del microorganismo específico y, a pesar de que en la mayoría de las circunstancias el microorganismo favorecido se desarrollará o se multiplicará en el medio selectivo, no es necesario el desarrollo para efectuar el cambio óptico característico. Otros microorganismos que pudieran vivir y/o propagarse en el medio de cultivo no producen el cambio óptico característico. Por lo tanto, cuando se observa el cambio óptico característico, es evidente que el microorganismo del espécimen vive en el medio de cultivo. Como el medio de cultivo está deshidratado por congelación, la cajita C se puede conser-

var durante periodo de tiempo relativamente largos. No obstante, el medio de cultivo debe rehidratarse antes de poder mantener al microorganismo específico con lo que cambiaran sus características transmisoras de luz. El medio de cultivo selectivo es normalmente el mismo para todos los pocitos 12 en la cajita C, pero puede variar de una cajita a otra dependiendo del microorganismo de interés. También se puede construir una cajita C con un medio diferente en los pocitos 12. Esto es conveniente cuando la apariencia externa de la enfermedad la limite a unos cuantos microorganismos.

Por lo menos en uno de los pocitos 12, es normal que el medio de cultivo selectivo no incluya antibiótico posiblemente perjudicial para el microorganismo de interés. El medio de cultivo en cada uno de los pocitos restantes 12 tiene un antibiótico mezclado con posibilidad de atacar a los microorganismos elegidos. Los antibióticos, o mezclas de los mismos, pueden variar de pocito 12 a pocito 12, y los dos pocitos diferentes 12 pueden tener el mismo antibiótico, pero en concentraciones diferentes. De este modo, los microorganismos no vivirán ni se propagarán en aquellos pocitos 12 que contengan un antibiótico al que sea susceptible el microorganismo favorecido, en el supuesto que el antibiótico tenga la concentración suficiente.

Cada superficie principal de la placa 10 se recubre con una cinta transparente 34 lo suficientemente ancha y larga para cubrir y cerrar completamente todos los pocitos 12, las cavidades de rebose 14 y 16, los canales de rebose 18 y 20 y los conductos de llenado 24, 26 y 28. La cinta 34 tiene capacidad para admitir aire en los pocitos 12, pero evita que escapen el agua y los microorganismos.

5. Para realizar una prueba de susceptibilidad antibiótica con la cajita C, un espécimen del que se sospecha que contenga un microorganismo patógeno se diluye en una cantidad pre-determinada de agua contenida en un depósito 36. El extremo inferior del depósito 36 tiene una aguja 38 que sale del mismo y esta aguja se inserta a través del septo 32 por lo que el orificio de llenado 30 y el interior del depósito 36 se ponen en comunicación (figura 4).

10. Una vez que el depósito y la cajita C se conectan a través de la aguja 38, se practica un vacío del orden de 40 mm Hg en los conductos de llenado 24, 26, 28 y los pocitos 12 de la cajita C conectando una bomba de vacío al extremo superior del depósito 36. De este modo, el interior de la cajita C se evacúa a través del agua en el depósito 36.

15. Al obtener el vacío deseado, el extremo superior del depósito 36 se ventila inmediatamente a la atmósfera, por lo que la presión en la mezcla diluyente fuerza dicha mezcla en la cajita C. De este modo, la mezcla diluyente ocupa el lugar del aire evacuado. Verdaderamente, la mezcla diluyente fluye con
20. gran rapidez a través de los conductos de llenado 24, 26 y 28 y, por lo tanto, en los pocitos 12 donde rehidrata el medio de cultivo en los mismos. La mezcla diluyente y el medio de cultivo fluyen además a los canales de rebose 18 y 20 y las cavidades de rebose 14 y 16 en sus extremos. El aire que queda en el
25. conducto 22 y los pocitos 12 se acumulará en las cavidades de rebose 14 y 16. Se observará que, a pesar de que la cinta 34 puede admitir aire en los pocitos 12, sus poros son tan pequeños que el vacío producido por la bomba persiste lo suficiente para conseguir un llenado apropiado al soltarse el vacío.

30. La cajita C se coloca entonces en un medio calen-

tado para inocular cualquier microorganismo en los pocitos 12.

5. Si el medio de cultivo para la cajita C favoreciera el microorganismo en la mezcla diluyente, el microorganismo permanecerá visible y vivirá en el pocito 12 que contiene el medio de cultivo puro. Por lo tanto, el microorganismo se desarrollará y su acción metabólica hará que el medio de cultivo experimente un cambio en sus características ópticas. Como el microorganismo favorecido por el medio de cultivo es un microorganismo conocido, así como la naturaleza del cambio de las características ópticas efectuado por el microorganismo, el cambio en las características ópticas del pocito 12 que contiene el medio de cultivo puro sirve para identificar el microorganismo.

15. No solamente el pocito 12 que contiene el medio de cultivo puro experimenta un cambio en las características ópticas, sino que también lo hacen los otros pocitos 12 que contienen un antibiótico al que el microorganismo no es susceptible. Asimismo, cualquier pocito 12 que contenga un antibiótico de concentración inadecuada experimentará también un cambio en las características ópticas. En otras palabras, el microorganismo favorecido vivirá en cada pocito 12 donde el antibiótico no sea eficaz o no en los niveles de concentración suficientes. No obstante, la ausencia de cualquier cambio en las características ópticas indica que el antibiótico es eficaz contra el microorganismo. Como el antibiótico en cada pocito 12 es un antibiótico conocido, se puede determinar cuales de los antibióticos combatirán el microorganismo

25. Los cambios significativos en las características ópticas de los pocitos 12 tienen lugar en un mínimo de dos horas a partir del tiempo en que la mezcla diluyente se introduce

30.

5. y se incuba y en máximo de 14 horas. Los cambios se pueden observar a simple vista o con un detector electroóptico. El detector electroóptico proyecta luz a través de los pocitos 12 y mide la intensidad de la luz más allá de los pocitos 12. Un cambio sensible de intensidad indica desarrollo o acción metabólica del microorganismo favorecido en un pocito 12 y, por lo tanto, el antibiótico en dicho pocito 12 no es eficaz contra el microorganismo favorecido.

EJEMPLO

10. Un medio o caldo de cultivo de bacilos coliformes, descrito en la patente Belga P 799.798, se empleó para detectar organismos coliformes (*Escherichia coli*) que se encuentran principalmente en especímenes fecales y causan infección entérica. El caldo se preparó disolviendo 10 gm de lactosa y 10 gm de gelisato en 1,0 litro de agua destilada. Después se añadió HCl o NaOH para pimer el pH a 7,4. Después se añadieron 10 gm de desoxicolato sódico. La mezcla se puede calentar para disolver los ingredientes pero no deberá calentarse hasta el punto de ebullición. Finalmente, la solución se esterilizó por filtración y se añadieron 13,3 mg de verde brillante. El caldo anterior se deshidrató por congelación para formar el medio selectivo que se cargó en uno de los pocitos 12 en su forma pura.

15.

20.

25. Por cada litro de medio antes de la deshidratación por congelación, se puede añadir uno de los antibióticos expuestos a continuación en las concentraciones indicadas para formar una mezcla para otros pocitos 12:

30.	Ampicilina	0,03 gm
	Cephalotina	0,1 "
	Colistina	0,01 "

5.	Tetracyclina	0,015 gm
	Nitrofurantoina	0,015 "
	Kanamicina	0,01 "
	Streptomycina	0,03 "
	Gentamicina	0,01 "

Para otros medios selectivos se emplean concentraciones similares.

10. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.

REIVINDICACIONES

15. 1.- Procedimiento y dispositivo para determinar la susceptibilidad de un microorganismo específico a los antibióticos, procedimiento caracterizado porque comprende evacuar aire de un pocito donde está contenido un medio de cultivo selectivo y de los pocitos donde están contenidas mezclas de medio de cultivo selectivo y antibióticos conocidos, cuyo medio de

20. cultivo favorece al microorganismo específico de forma que las características ópticas de una mezcla del medio de cultivo y agua cambian de una manera predeterminada cuando el microorganismo favorecido es sustentado y alimentado por el medio, reemplazar el aire evacuado por una mezcla diluyente compuesta

25. esencialmente por un espécimen diluido en agua, por lo que la mezcla diluyente se mezcla con el medio de cultivo selectivo en los pocitos; incubar la mezcla de cultivo y diluyente; y observar los pocitos para detectar los cambios en sus características ópticas.

30. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, ca-

racterizado porque el medio de cultivo se deshidrata por congelación y el agua de la mezcla diluyente rehidrata el medio.

5. 3.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque se observan los pocitos proyectando luz a través de los mismos y midiendo la intensidad de la luz que sale de los pocitos.

10. 4.- Dispositivo para la realización del procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque comprende una placa dotada de pocitos de detección en su interior y conductos de llenado que se dirigen hasta los pocitos, una mezcla de medio de cultivo y antibióticos conocidos por lo menos en algunos de los pocitos de detección, siendo el medio de cultivo sensible a los microorganismos en el sentido de que las características ópticas del medio de cultivo, cambian de una forma predeterminada solamente cuando un microorganismo se sustenta en el medio de cultivo.

15. 5.- Dispositivo según la reivindicación 4, caracterizado porque el medio de cultivo es selectivo en el sentido de que experimenta un cambio predeterminado en las características ópticas solamente cuando un microorganismo específico se mantiene gracias al mismo.

20. 6.- Dispositivo según las reivindicaciones 4 ó 5, caracterizado porque el mismo cultivo selectivo se encuentra en todos los pocitos, pero los antibióticos son diferentes por lo menos en alguno de los pocitos.

25. 7.- Dispositivo según la reivindicación 6, caracterizado porque por lo menos uno de los pocitos contiene solamente el medio de cultivo selectivo y no un antibiótico perjudicial para el microorganismo elegido.

30. 8.- Dispositivo según cualquiera de las reivin-

5. dicaciones anteriores, caracterizado porque comprende medios que cierran los extremos de los pocitos para retener el medio de cultivo en los pocitos, cuyos medios son transparentes de forma que el medio de cultivo puede observarse y pueden admitir oxígeno a los pocitos para mantener los microorganismos en el medio de cultivo.

10. 9.- Dispositivo según la reivindicación 8, caracterizado porque los medios que cierran los de los pocitos consisten en una cinta que se extiende a través de la placa y se adhiere a su superficie.

15. 10.- Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la placa tiene un orificio de llenado que conduce desde el exterior de la misma hasta los conductos de llenado, y porque en el orificio de llenado se coloca un septo.

20. 11.- Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la placa tiene cavidades de rebose en comunicación con cada pocito de detección a la salida de la entrada de los conductos de llenado en dichos pocitos.

25. 12.- Dispositivo según las reivindicaciones 4, 5, 6 ó 7, caracterizado porque la placa es generalmente rectangular y tiene superficie principales paralelas y un canto periférico; porque los pocitos se disponen en filas transversales y se extienden desde un área superficial hasta la otra; porque la placa tiene también un orificio de llenado que se abre en el canto periférico; porque los conductos de llenado comprenden un canal alimentador conectado con el orificio de llenado y que se dirige longitudinalmente por los extremos de algunas de las filas, extendiéndose canales laterales trans-

30.

- versalmente desde el canal alimentador, pasando al menos algunos de los canales laterales entre filas adyacentes de pocitos, y canales terminales que conectan los canales laterales de los pocitos, disponiéndose un canal terminal separado por cada pocito y abriéndose el canal alimentador, los canales laterales y los canales terminales en una superficie principal de la placa; medios para cerrar el orificio de llenado; una primera cinta extendida sobre el área superficial principal fuera de la cual se abren los pocitos y canales y sirviendo para cerrar los extremos de los pocitos y los costados de los canales en dicha superficie principal, y una segunda cinta extendida sobre la otra superficie principal y que cierra los otros extremos de los pocitos, siendo ambas cintas transparentes y adhiriéndose herméticamente a las superficies sobre las cuales se extienden,
5. por lo que los pocitos y los canales quedan aislados capaces de admitir aire en los pocitos pero suficientemente pequeños para evitar que el agua y los microorganismos escapen de los pocitos.
- 10.
- 15.

- 13.- Procedimiento y dispositivo para determinar la susceptibilidad de un microorganismo específico a los antibióticos; tal y como queda sustancialmente descrito, en la presente Memoria e ilustrado en los dibujos adjuntos.
- 20.

Esta Memoria consta de 13 hojas escritas a máquina por una sola cara

Madrid, 26 MAYO 1976

MCDONNELL DOUGLAS CORPORATION

A. GOMEZ LÓPEZ Y MUÑOZ
p. p. Firmador: L. Gasla Fernández



