



ESPAÑA

(19) ES	(11) NUMERO	(10) A I
(21)	454.294	
(22)	FECHA DE PRESENTACION	
	16-12-76	

PATENTE DE INVENCION

P.- 64.778
264-027-
Spain

(30) PRIORIDADES:	(32) FECHA	(23) PAIS
(31) NUMERO		
641.279	16-12-75	EE.UU.
747.033	2-12-76	" "

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12K 1/04	

(64) TITULO DE LA INVENCION

"UN METODO PARA DETECTAR LA PRESENCIA DE UN MICROORGANISMO EN UNA MUESTRA DE FLUIDO".

(71) SOLICITANTE (S)

UNIVERSITY OF VIRGINIA y NATIONAL AERONAUTICS AND SPACE ADMINISTRATION

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

Charlottesville, Virginia, y Washington, D.C., respectivamente en Estados Unidos de América.

(72) INVENTOR (ES)

Judd R. Wilkins y Glenn E. Stoner.

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE

DON FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ

LFG

**POOR
QUALITY**

P.-64.778

1

FUNDAMENTO DE LA INVENCIONCampo de la Invención

5 La presente invención se refiere a un método para detectar microorganismos que pueden encontrarse presentes en cualquier foco que se desee ensayar para descubrir la presencia de microorganismos. Más especialmente, la presente invención se refiere a un método para detectar la presencia de microorganismos depositando un foco de microorganismos en una célula que contiene dos electrodos, uno de los cuales está protegido de exposición a los microorganismos, y un medio nutriente, y detectando el cambio de potencial entre el electrodo de medida expuesto al microorganismo que crece y el electrodo de referencia.

10

15

Descripción de la Técnica Anterior

En la actualidad, se conocen diversos métodos para la detección de microorganismos que pueden encontrarse presentes en diversos focos que incluyen medios acuosos tales como sangre, plasma, medios de fermentación y semejantes. Los métodos se dividen, por lo general, en dos clases de detección de los cuales el primero es un ensayo de clasificación para determinar si se encuentra presente o no en una muestra un número grande de microorganismos. Si se obtiene un ensayo positivo en la primera etapa, se emplea un segundo nivel de ensayo para determinar el tipo y cantidad de organismo presente. Lo más corriente es que los métodos que establecen tanto la identidad como la cantidad de microorganismo se basen en una sucesión de etapas de cultivo, crecimiento y observación de los microorganismos. Se obser-

20

25

30

1 van grados de crecimiento en los cultivos que provienen de
diluciones múltiples de la misma muestra. Observando el mo-
mento en que las muestras diluidas alcanzan poblaciones ob-
servables puede estimarse la concentración de microorganis-
5 mos en las muestras primitivas.

La estimación de poblaciones de microorganismos se efectúa lo más generalmente mediante una de tres técnicas. La primera técnica es una técnica de cultivo en placa con agar nutriente en el que se deja crecer un microorganism
10 mo sobre un substrato de una sustancia nutriente con agar y se observa visualmente el crecimiento del microorganismo y después mediante observación microscópica. Este es el método más común en uso clínicamente.

El segundo tipo de técnica incluye varios métodos
15 que pueden ser clasificados como métodos químicos. Un método de análisis lleva consigo disponer un microorganismo en un medio de crecimiento con glucosa marcada con carbono-14. El microorganismo metaboliza la glucosa radiactiva y desprende $C^{14}O_2$, que se recoge y cuenta. Aun cuando pueden obtener-
20 se resultados positivos mediante este método en un periodo de tiempo relativamente corto, el método viene afectado por diversas complejidades de operación, es costoso y peligroso desde el punto de vista de la necesidad de manipular muestras radiactivas. Otro método analítico para determinar el
25 tipo y cantidad de bacterias presentes en una muestra se basa en la reacción quimioluminiscente entre luciferasa y luciferina en presencia de ATP. Se hacen crecer las bacterias en un cultivo y después las células se someten a lisis para liberar el ATP presente en ellas. El ATP liberado reacciona
30 con la combinación de luciferasa-luciferina con lo que se

1 emite luz quimioluminiscente que es detectada por un fotomultiplicador y usada para determinar la cantidad del organismo presente. La desventaja principal de esta técnica es el coste de los materiales que intervienen en la reacción.

5 Todavía otro método químico lleva consigo una medida basada en la conversión metabólica del ión nitrito en el ión nitrato. Sin embargo, este método es aplicable solamente a algunas bacterias y levaduras.

El tercer tipo de técnica usada para la detección
10 de microorganismos lleva consigo métodos no químicos. Un método implica la evaluación de suspensiones de microorganismos relativamente transparentes mediante contadores de partículas modificados. Sin embargo, el método no es específico y no proporciona una distinción entre microorganismos vivos y
15 muertos, ni incluso entre materias en partículas de carácter no biológico. Un segundo método implica la detección de microorganismos aplicando una corriente alterna a través de un par de electrodos que han sido colocados en un medio que contiene un microorganismo y observando el cambio de impedancia de la corriente en función del crecimiento del microorga
20 nismo. No obstante esta técnica aparentemente no es susceptible de automatización como cabría esperar del dispositivo y el método.

Es conocido un sensor bioquímico descrito por Rohrbach y otros, Patente de Estados Unidos 3.403.081, que se
25 usa para detectar elementos traza y venenos en medios líquidos y gaseosos. El sensor se construye colocando en un electrolito un electrodo de medida tal como un cilindro calibrado de alambre, inerte, de níquel, platino, acero inoxidable
30 o semejante sobre el que se impregna una colonia de un mi-

1 croorganismo o una enzima, y un electrodo de referencia tal
como el electrodo normal de calómelanos. Los cables de cada
electrodo se unen a un voltímetro. El organismo o enzima im
pregnados o en estrecha proximidad con el electrodo de medi
5 da genera una corriente dentro de la célula ocasionando reac
ciones químicas en la superficie del electrodo o favorecien
do reacciones químicas que producen sustancias que a su vez
proporcionan reacciones de despolarización en el electrodo.
El dispositivo actúa admitiendo en el dispositivo un elemen
10 to traza o un veneno que desactiva la enzima o mata o desac
tiva el microorganismo ocasionando de este modo un cambio en
la diferencia de potencial entre los electrodos que se detec
ta por un cambio en las lecturas del voltímetro. Consideran
do el hecho de que la enzima o microorganismo favorece o cau
15 sa una reacción química considerable en el electrodo de medi
da que se detecta mediante un voltímetro normal en el circui
to de la célula, la corriente generada en el interior de la
célula debe ser sustancial. El dispositivo electroanalítico
de la presente invención que se usa para determinar el tipo
20 y cantidad de un microorganismo en una solución, por otra
parte, no requiere la impregnación de una colonia de tamaño
apreciable de un microorganismo sobre el electrodo de medida
sino que opera más bien detectando un microorganismo en solu
ción que se concentra gradualmente en torno al electrodo de
25 medida. Otra distinción crítica entre el método y el aparato
de la presente invención y el método de la referencia es que
el circuito del presente sistema debe contener un potencióme
tro de alta impedancia y no el voltímetro convencional usado
en el proceso de referencia, debido a que el presente siste
30 ma depende de la medida de una diferencia de potencial seme

1. jante al electrostático entre el electrodo de medida y el
microorganismo en solución. Si se usara un voltímetro nor-
mal en el circuito de la presente invención, demasiada co-
rriente podría ser tomada por el voltímetro lo que podría
5 destruir la diferencia de potencial semejante al electros-
tático, relativamente delicado, entre el electrodo de medi-
da y el microorganismo concentrado en torno a la superficie
del electrodo.

Por consiguiente, continúa existiendo la necesi-
dad de un método para determinar rápida, económica y auto-
10 máticamente tipos y cantidades de microorganismos diversos
mediante una técnica conceptualmente sencilla y económica.

"BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS"

15. La Figura 1 muestra una curva de respuesta de po-
tencial (en el eje de ordenadas en 40 mV/DIV) para el creci-
miento de Pseudomonas frente al tiempo (en el eje de absci-
sas 24 min/DIV), en 10 ml de medio de caldo de Trypticasa y
soja;

20. la Figura 2 muestra dos curvas de potencial fren-
te a tiempo que demuestran la influencia de bacteriófagos
que impiden el crecimiento sobre cepas bacterianas de E.co-
li. En dicha Figura 2 la flecha indica el momento en que se
añade el bacteriófago;

25. la Figura 3 es una realización de una forma de la
célula electroanalítica de la presente invención;

la Figura 4 es otra realización de la célula elec-
troanalítica de la presente invención en la que la célula
ha sido adaptada para actuar en parte como una jeringa;

30. la Figura 5 es una realización del dispositivo de

1 la presente invención en el que la cámara del dispositivo se equipa con medios para hacer pasar una muestra de líquido que contiene un microorganismo al dispositivo por la acción del vacío;

5 la Figura 6 es una realización del dispositivo de la presente invención que, en parte, es una aguja adecuada para la toma de muestras de líquidos del cuerpo;

la Figura 7 es un registro en una banda de papel de potencial frente al tiempo para el cultivo de E.coli;

10 la Figura 8 es un registro en una banda de papel de una serie de cultivos de E.coli en que se hizo variar la concentración bacteriana del inóculo inicial en cada muestra;

15 la Figura 9 muestra una gráfica de comparación de potencial frente a tiempo para un organismo que produce hidrógeno (E.coli) y un organismo que no produce hidrógeno (alcaléscente);

20 la Figura 10 es un diagrama de correlación de potencial y radiactividad en el electrodo de medida en función de la concentración celular para alcaléscentes radiactivos en medios de caldo de tripticasa y soja;

25 la Figura 11 muestra dos gráficas de potencial frente a tiempo obtenidas de un sistema de electrodos de calomelanos-alambre de platino y un sistema de electrodos de níquel-níquel en el mismo medio de cultivo de caldo de tripticasa y soja de alcaléscentes; los electrodos de níquel se sitúan como en la Figura 3;

30 la Figura 12 muestra varias curvas de potencial frente a tiempo que indican la influencia de impedimento de crecimiento del antibiótico ampicilina sobre S.epidermidis;

1 y

la Figura 13 muestra diversas curvas de potencial frente a tiempo que indican la influencia de impedimento del crecimiento de cefalotina sobre K.pneumoniae.

5

Para una mejor comprensión de las figuras 7-12 que consisten en representaciones gráficas, debe tenerse en cuenta que:

10

- En las figuras 7, 8, 9 y 11 en el eje de ordenadas se representa el potencial de electrodo (voltios frente a ENC) y en el eje de abscisas el tiempo de incubación en horas.

15

- En la figura 10 en el eje de la izquierda se representa el potencial del Pt frente al ENC (Voltios) y en el de la derecha la radiactividad del electrodo (unidades). En el eje horizontal se representa la concentración de bacterias en células/mililitro.

20

- En las figuras 12 y 13 en el eje vertical se representa el potencial negativo (40 mV div para la Figura 12 y 500 mV div para la Figura 13; en el horizontal el tiempo (24 min div.).

En la Figura 7 se observa un período de retardo (0-8 horas), un período de subida rápida (entre 8 y 10 horas) y un período de caída de las 10 a las 24 horas.

25

En la Figura 8 los valores dados son células/mililitro.

En la Figura 9 la rama superior de la curva que se bifurca se refiere al productor de H_2 (E. COLI) y la rama inferior se refiere al no productor de H_2 (ALKALSCENCE).

30

En la Figura 10 --O-- representa el potencial del Pt frente a ENC y -- Δ -- representa la radiactividad de seg-

1 mentos de electrodo.

En la Figura 11 --o-- representa Pt-calomelanos
y --Δ-- representa Ni-vidrio poroso-Ni.

5 DESCRIPCION DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

El descubrimiento en que se basa el método y el
aparato de la presente invención es que la presencia de ciertos niveles de población de un microorganismo dado en un medio fluido confinado en una célula que contiene un electrodo de medida y un electrodo de referencia, genera cambios de potencial en el interior de la célula debido a una diferencia de carga electrostática entre un organismo vivo y el electrodo de medida. El potencial se mide mediante un potenciómetro de alta impedancia que se fija mediante cables conductores a los electrodos de la célula. Se ha encontrado que todos los microorganismos exhiben una carga electrostática relativamente negativa en solución, frente al electrodo que se usa como electrodo de medida lo que hace, por consiguiente, que todos los microorganismos sean capaces de detección mediante el método de la presente invención. Se cree que los microorganismos que crecen emigran gradualmente a la superficie expuesta del electrodo de medida que es algo positiva con respecto a los microorganismos. Con objeto de que exista una diferencia de potencial entre los electrodos de medida y de referencia, es esencial que el electrodo de referencia o bien sólo esté en contacto con el medio de cultivo y no con los microorganismos, o no sea sensible a la carga de los microorganismos y que los microorganismos se concentren por sí mismos en torno al electrodo de medida. Por ejemplo
30 cuando un alambre metálico o semejante se usa como electro-

1 do de referencia, el electrodo está protegido normalmente
de los microorganismos por una sustancia permeable al flui-
do pero impermeable a los organismos. Cuando se usa como
electrodo de referencia un dispositivo tal como el electro-
5 do de calomelanos, éste está protegido normalmente de los
microorganismos por la envoltura de vidrio. La acumulación
de microorganismos en torno al electrodo de medida altera
el potencial del electrodo de medida con respecto al elec-
trodo de referencia y por consiguiente se establece un cam-
10 bio de potencial entre los electrodos debido a las interac-
ciones carga-carga en el electrodo de medida. El cambio de
voltaje generado mediante esta interacción electrostática
es el medio por el que puede detectarse la presencia de mi-
croorganismos en solución.

15 La estructura de la célula que confina los microor-
ganismos en crecimiento y a la que están unidos los electro-
dos, puede fabricarse a partir de cualesquiera materiales
convenientemente usados habitualmente en la fabricación de cé-
lulas electroanalíticas tales como vidrio, plástico y seme-
20 jantes. Puede usarse cualquier material que sea adecuado pa-
ra tal uso, no interfiera con el crecimiento o viabilidad
de los microorganismos, y no afecte al voltaje generado en
el interior de la célula.

25 La célula electroanalítica se proporciona con un
medio de cultivo para el crecimiento de los microorganismos
colocado en el interior de la célula. Puede ser usado cual-
quier medio de cultivo de los que se usan comúnmente para
el cultivo de microorganismos, y, por consiguiente, el tipo
de medio de cultivo usado no es crítico. Los medios de cul-
30 tivo adecuados incluyen infusiones de cerebro-corazón, cal-

1 do de tripticasa y soja (GTS), base de caldo al rojo fenol
+ 1% de glucosa, caldo de tripticasa y soja + CO_2 , leche,
cerveza, glicolato de sodio y semejantes. La cantidad de me-
5 dio de cultivo dispuesta en el interior de la célula de me-
dida, como es lógico, no es crítica.

Los electrodos de medida y referencia unidos a la
célula pueden fabricarse con el mismo material conductor o
pueden ser de materiales diferentes. Habitualmente, el elec-
trodo de medida se fabrica con cualquier material de electro-
10 dos adecuado, en cualquier forma conveniente, y se une a la
célula de modo que una parte del mismo esté en contacto con
el medio líquido situado dentro de la célula. Materiales ade-
cuados a partir de los que puede fabricarse el electrodo de
medida, incluyen los metales nobles tales como plata, plati-
15 no, paladio, oro y semejantes, wolframio, molibdeno, níquel
y semejantes, y aleaciones metálicas diversas tales como ace-
ro inoxidable, níquel-cromo y plata-paladio. La forma del
electrodo no es crítica y puede tomar cualquier configura-
ción adecuada tal como alambre, tira, bobina o semejante.

20 El electrodo de referencia puede fabricarse con
cualquiera de los materiales de electrodos adecuados, usa-
dos para el electrodo de medida. Así pues, concebiblemente,
el electrodo de referencia puede ser del mismo material que
el electrodo de medida, lo cual es una configuración de elec-
25 trodos para células galvánicas sumamente inusitada. Normal-
mente, los electrodos empleados en células galvánicas se fa-
brican de diferentes materiales con objeto de tener una célu-
la que pueda funcionar. El electrodo de referencia se une
también a la célula por cualquier medio conveniente de tal
30 modo que una parte del electrodo (tal como un extremo de un

1 alambre o tira) esté en contacto con el medio líquido en la
célula. La parte del electrodo de referencia en contacto
con el medio está habitualmente protegida del contacto con
5 los microorganismos del medio. Cuando los electrodos de me-
dida y de referencia son de metales diferentes o de aleacio-
nes, no es necesario proteger el electrodo de referencia ya
que los microorganismos se acumularán preferentemente en
torno al más positivo de los dos electrodos de la célula.
Por otra parte, cuando los electrodos de medida y de refe-
10 rencia son del mismo material, el electrodo de referencia
debe ser protegido. Puede ser usado cualquier medio por el
cual pueda protegerse el electrodo de referencia de los mi-
croorganismos que crecen, pero que al mismo tiempo permita
el contacto con el medio líquido. Así pues, por ejemplo, la
15 porción expuesta del electrodo puede encajarse en el inte-
rior de un gel tal como un gel de agar, gelatina, un gel de
dextrán, geles de carragenina-acrilimida y semejantes. Las
membranas tales como membranas de ultrafiltración de poro
relativamente grande e incluso membranas de poro grande, vi-
20 drio poroso, materiales cerámicos o películas porosas de
plástico son todas adecuadas si son impermeables a los mi-
croorganismos. Si el electrodo de referencia y el electrodo
de medida se fabrican del mismo material tal como dos elec-
trodos de acero inoxidable, que es una realización preferi-
25 da de la invención, dos electrodos de platino o semejante,
el cambio de potencial generado en la célula de electrodos
sensible está relativamente desprovisto de efectos de pares
termoeléctricos. Esto es, si los electrodos son los mismos,
no se generará voltaje que sea atribuible a efectos de pa-
30 res termoeléctricos. Si los electrodos se fabrican de meta-

1. les diferentes o aleaciones metálicas, entonces el efecto de par termoeléctrico puede existir y las lecturas de potenciales obtenidas podrían compensar la porción de voltaje atribuible al efecto de par termoeléctrico. Así pues, puede apreciarse que el efecto de par termoeléctrico que puede tener lugar con ciertas combinaciones de electrodos no es restrictivo críticamente y cualquiera que opere según el presente método sólo necesita tener en cuenta este factor.

5 El electrodo de referencia además de ser del tipo antes descrito puede ser también un electrodo de referencia normal tal como un electrodo normal de calomelanos o el electrodo de mercurio-sulfato mercurioso, el electrodo de Ag/AgCl o el electrodo de quinhidrona. Si se usa uno de estos tipos normales de electrodos de referencia, la porción del electrodo situada dentro del medio líquido en la célula no necesita estar protegida de los microorganismos, debido a que o bien la construcción de estos electrodos en una envoltura de vidrio elimina normalmente el contacto de las porciones de trabajo interiores del electrodo con los microorganismos en solución, o bien tienen un potencial que no es afectado por los microorganismos.

15 Al objeto de medir el voltaje generado en el interior de la célula electroanalítica que contiene el microorganismo que crece, es necesario conectar ambos electrodos de la célula a un potenciómetro de alta impedancia. El tipo de potenciómetro usado no es crítico, con el único requisito de que sea del tipo de alta impedancia. El potenciómetro debe tener una impedancia de entrada comprendida entre 10^7 ohmios y 10^{10} ohmios, preferiblemente mayor de 10^8 ohmios. Si se usa un potenciómetro de impedancia relativamente baja podría

1 arrastrarse demasiada corriente a través del dispositivo
de medida alterando de este modo la interacción carga-car-
ga entre el electrodo de medida y los microorganismos. Con
la destrucción del potencial electrostático en el electro-
5 do, no pueden obtenerse lecturas de potencial. Como es ló-
gico, pueden añadirse también al dispositivo de instrumen-
tación otros aparatos accesorios compatibles con el poten-
ciómetro de alta impedancia tales como un amplificador y
un dispositivo registrador.

10 En la ejecución de una medida según el procedi-
miento de la presente invención, se introduce una muestra
de microorganismos en el medio de cultivo situado dentro de
la célula. En una realización una muestra líquida de un mi-
croorganismo puede ser inyectada en la célula a través de un
15 obturador que se cierra por sí mismo, que cierra hermética-
mente la célula a la atmósfera, o es introducida en la cé-
lula por la acción del vacío. Los microorganismos pueden
ser introducidos también en la célula en forma de una mues-
tra gaseosa, con la condición de que los microorganismos sean
20 introducidos en el medio de cultivo de la célula. Una carac-
terística básica de la presente técnica es que puede esta-
blecerse una línea de base estable mediante el instrumento
registrador que está unido al potenciómetro de alta impedan-
cia y cuya gráfica cambia de potencial en función del tiem-
25 po antes de que sea alcanzada la concentración mínima detec-
table (CMD) del microorganismo que crece. En otras palabras,
la línea de base estable es equivalente a un valor de cero
para la función de dE/dt . El crecimiento del microorganismo
tiene lugar y una vez el nivel de población alcanza la con-
30 centración mínima detectable, normalmente desprendida entre

1 aproximadamente 5×10^4 y 5×10^5 organismos/1 ml para todos ex-
cepto para los microorganismos que crecen con mayor lentitud,
el microorganismo puede ser detectado por el voltaje genera-
do. El voltaje que se mide en lecturas de milivoltios, cam-
5 bia siempre en dirección negativa. Esto es debido a que la
carga sobre los microorganismos es más negativa que la que
existe sobre el electrodo de medida. Para microorganismos
que crecen con lentitud tales como el bacilo de la tubercu-
lisis, sin embargo, la concentración detectable inferior
10 puede ser tan baja como 1×10^3 organismos/1 ml. En los ca-
sos en que el método de la invención se use para detectar
microorganismos que crecen con lentitud, la célula puede ser
agitada sacudiendo, por ejemplo, o por cualquier otro medio
adecuado. La agitación de la solución que contiene los mi-
15 croorganismos facilita el crecimiento de los microorganismos
en algunos casos y por tanto puede reducir el período
de retardo para la detección del microorganismo. No obstan-
te, ya que la presente invención requiere una acumulación
neta de organismos en el electrodo de medida con objeto de
20 que existan las interacciones eléctricas carga-carga neces-
arias, una agitación demasiado vigorosa puede separar los mi-
croorganismos y eliminar el cambio de potencial. El interva-
lo de temperatura a lo largo del cual los microorganismos
son cultivados y eventualmente detectados, está comprendido
25 entre 15° y 60°C , y preferiblemente entre 32° y 37°C . La
presión no es un factor crítico en las medidas dado que el
crecimiento y detección de los microorganismos pueden ocu-
rrir bajo condiciones de vacío parcial así como también a
presiones superiores a la atmosférica. Así pues, por ejem-
30 plo, el método de la presente invención se presta a la detec-

1. ción de microorganismos que crecen bajo presión, como en la fabricación de cerveza.

5 El método de la presente invención puede ser usado para detectar con éxito cualquier tipo de microorganismo que pueda ser cultivado en el medio nutriente dispuesto en el interior de la célula electroanalítica o añadido a la célula en una concentración adecuada. Asimismo no es absolutamente necesario para los microorganismos que crezcan o metabolicen con tal que permanezcan vivos. Esto es debido a su viabilidad que les proporciona su carga negativa, que ellos pierden al morir. Así pues, el método es aplicable a la detección de levaduras, hongos y bacterias. Ejemplos específicos de bacterias que pueden ser detectadas mediante el método de la presente invención incluyen las bacterias que no producen hidrógeno, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus, Listeria monocytogenes, Pseudomonas aeruginosa, Moraxella, Shigella alkaliscens, Diplococcus pneumoniae, Bacillus subtilis, y Hemophilus influenzae. Son ejemplos adecuados de levaduras que pueden ser detectadas las especies Candida tales como Candida albicans y Candida rugosa, especies de Hansenula tales como Hansenula anomala, especies de Pichia tales como Pichia membranaefaciens, especies de Torulopsis y Saccharomyces cerevisiae. Ejemplos adecuados de hongos incluyen las diversas especies de Aspergillus tales como Aspergillus auricularis, A. barbae, A. bouffardi, A. calvatus, A. concentricus, A. falvus, A. fumigatus, A. giganteus, A. glaucus, A. gliocladium, A. mucoroides, A. nidulans, A. niger, A. ochraceus, A. pictor y A. repens y las especies del gran grupo de hongos conocidos como Fungi Imperfecti.

10

15

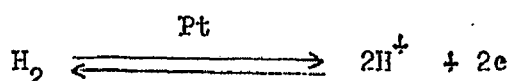
20

25

30

1 Cierta número de bacterias forman una clase de
 bacterias que se conocen por su capacidad para desprender
 hidrógeno durante su crecimiento. Estas bacterias incluyen
 5 Escherichia coli, Enterobacter aerogenes, Serratia marces-
cens, Proteus mirabilis, Citrobacter intermedium, Citrobac-
ter freundii, Salmonella y Klebsiella. Dado que estas bac-
 terias emigran hacia el electrodo de medida como lo hacen
 todos los microorganismos, su desprendimiento de hidrógeno
 tiende a concentrarse en torno al electrodo de medida.

10 La presencia de hidrógeno en el electrodo de me-
 dida amplia muy sustancialmente las características del
 electrodo de tal modo que se hace similar al bien conocido
 electrodo de hidrógeno. Así pues, en efecto, existe un ti-
 po de electrodo de medida completamente diferente para la
 15 medida de organismos que producen hidrógeno y para organis-
 mos que no producen hidrógeno. El principio que soporta el
 funcionamiento del electrodo de hidrógeno es que existe el
 siguiente equilibrio en la superficie del electrodo metáli-
 co, habitualmente platino u oro:



Queda claro de esta expresión que existe un equilibrio en-
 25 tre hidrógeno molecular e iones hidrógeno en solución y son
 las variaciones en el equilibrio lo que determina el poten-
 cial del electrodo. Una vez establecido el equilibrio en la
 superficie del electrodo, el electrodo recibe el nombre de
 "no polarizable" o electrodo de referencia. El electrodo nor-
 mal de hidrógeno (referencia) es platino en una solución
 30 ácida de pH=0 con una solución saturada de hidrógeno mole-

1 ular a una temperatura definida. Se define que el electro-
do normal de hidrógeno (ENH) tiene un potencial de 0,00 vol-
tios y forma la base relativa para la escala de potenciales
de todas las otras reacciones de electrodo así como también
5 establece la base de la serie electromotriz de metales.

En un aspecto más específico de la medida de bac-
terias que producen hidrógeno, se usa un electrodo de calo-
melanos como electrodo de referencia en combinación con un
electrodo de medida metálico. El electrodo de calomelanos
10 tiene un potencial de + 0,23 voltios aproximadamente con res-
pecto al ENH y dado que el medio de cultivo tiene un pH -
aproximadamente neutro ó de 7, el electrodo de hidrógeno de
medida tiene un potencial de aproximadamente -0,42 voltios
con respecto al ENH. Así pues, el electrodo de medida para
15 bacterias que producen hidrógeno tiene un potencial de apro-
ximadamente -0,65 voltios; es decir $(-0,42) - (+0,23) = -0,65$
en dirección negativa con respecto al calomelanos. Ya que
en realidad nunca se consigue una presión de una atmósfera
de hidrógeno en el electrodo de medida por efectos de dilu-
20 ción atmosférica debidos a CO_2 , nitrógeno y semejantes, se
consigue un potencial de nivelación de aproximadamente -
-0,4 a -0,5 voltios frente al calomelanos en las medidas
obtenidas con bacterias que producen hidrógeno.

En la medida de ambos tipos de microorganismos,
25 que producen hidrógeno y que no le producen, se observa ini-
cialmente un tiempo de retardo desde el momento en que la
célula analítica es inoculada con el microorganismo y el mo-
mento en que el microorganismo alcanza niveles de población
suficientes para ser detectados. Después de ésto, el poten-
30 cial continúa aumentando en sentido negativo hasta que se

1 obtiene un potencial máximo en que se estabiliza el poten-
cial. Después, a medida que avanza el tiempo, el potencial
retrocede hacia potenciales más positivos. Para microorga-
5 nismos que no producen hidrógeno, el cambio total en lec-
turas de milivoltios está comprendido entre aproximadamen-
te 200 y 300 milivoltios. En el caso de organismos que pro-
ducen hidrógeno, los aumentos de potencial negativos inicia-
les son atribuibles a la presencia del organismo solamente.
Después de ello, a medida que los efectos de la acumulación
10 de hidrógeno en el electrodo se hace significativa, el po-
tencial crece de modo acusado hacia potenciales apreciable-
mente más negativos, que son obtenidos para microorganismos
que no producen hidrógeno. El aumento negativo de potencial
atribuible a la presencia de hidrógeno en el electrodo de
15 medida asciende a aproximadamente 500 milivoltios.

Las lecturas de potencial obtenidas para cada me-
dida representan la suma del cambio de potencial ocasiona-
do por la presencia del microorganismo en solución y los
cambios de potencial atribuibles a otros factores de la so-
20 lución y el sistema que causan cambios menores en el poten-
cial. Estos factores son característicos del medio líquido
particular presente en la célula así como también de los
electrodos usados, y deben ser determinados mediante una
lectura de potencial del medio, libre de la presencia de
25 cantidades detectables del microorganismo particular que
ha de ensayarse. Consiguiendo una medida de este potencial
de fondo, puede determinarse con facilidad, por consiguien-
te, que cambio del potencial total es ocasionado por la pre-
sencia de microorganismos. Una realización interesante de
30 la presente invención es que proporciona un método para de-

1. tectar una mezcla de microorganismos en una muestra que se
desea ensayar. Cuando una muestra que contiene una mezcla
de 2 ó más tipos de especies de microorganismos se cultiva
5 en el interior de la célula analítica, el microorganismo
que alcanza primeramente su límite mínimo detectable es
aquel que será detectado por el sistema. Con este conocimien
to, es evidente, por tanto, que el técnico experimentado
puede alterar las condiciones de cultivo tales como la tem-
peratura y el tipo de medio de cultivo para favorecer el cre-
10 cimiento de un tipo de microorganismo en detrimento de los
otros microorganismos y, por tanto, detectar preferentemen-
te un microorganismo sobre otros. Por ejemplo, con objeto
de detectar coliformes fecales en una mezcla de microorga-
nismos, la temperatura del medio de cultivo puede ser ele-
15 vada para matar preferentemente los otros microorganismos
para que sólo permanezcan los coliformes.

El volumen del medio líquido dentro de la célula
electroanalítica no es crítico. Como es lógico, el medio lí-
quido debe estar en contacto iónico con ambos electrodos.
20 El volumen del medio de cultivo líquido puede tener cual-
quier tamaño razonable que el técnico experimentado puede
determinar con facilidad. Naturalmente, a medida que el vo-
lumen del líquido aumenta, mayor es la dilución del microor-
ganismo y más baja es la respuesta obtenida que resulta. Se
25 apreciará que la célula electroanalítica herméticamente ce-
rrada puede contener un medio de cultivo en ella antes de
la introducción del microorganismo o el medio de cultivo y
la muestra de microorganismo pueden ser introducidos en la
célula al mismo tiempo. La cantidad de microorganismos in-
30 troducidos en la célula no es crítica y no necesita estar

1 comprendida dentro de límites fijados.

5 Puede conseguirse un entendimiento adicional del método de la presente invención con referencia a la Figura 1 que muestra dos registros simultáneos de potencial frente a tiempo, de una muestra de Pseudomonas aeruginosa de 10^4 células/ml en el inóculo inicial, cultivada en un medio de cultivo de tripticasa y soja a 37°C durante un periodo de varias horas, en dos células electroanalíticas separadas. Cada curva muestra la respuesta de potencial del organismo en función del tiempo. Para la primera hora o dos, la gráfica no muestra una respuesta significativa. Después, el organismo comienza a alcanzar concentraciones detectables mínimas como puede ponerse de manifiesto por el incremento gradual de la lectura del potencial en ambas células. 10 La curva comienza entonces a retroceder gradualmente después de alcanzar su valor máximo debido a la muerte eventual de algo de la población celular.

15 La invención ha sido descrita hasta aquí en términos de medir directamente la presencia de microorganismos vivos en una célula electroquímica. En otra realización de la invención pueden comprobarse sustancias o agentes que cambian o destruyen la viabilidad microbiana tales como exposición de los microorganismos existentes en la célula a un antibiótico, anticuerpos séricos, toxinas químicas, virus, por ejemplo bacteriófagos, o cualquier otro agente antimicrobiano o anticelular. Así pues, el efecto de un agente antimicrobiano puede ser comprobado por dos métodos:

20 1) añadiendo un agente antimicrobiano a diluciones tipo de cultivos en alguna concentración antes de alcanzar la CMD; y 30

1 2) añadiendo el agente antimicrobiano a la CMD o
por encima de ella. El método de la presente invención es
útil, por tanto, para ensayar la susceptibilidad antimicro-
biana en la investigación de la actividad de nuevos antibió-
5 ticos, o en la supervisión de desarrollos en un organismo
tales como el desarrollo de resistencia a un antibiótico
por el organismo. De suma importancia es que la evidencia
in vitro de interacciones bacteria-antibiótico permite al
clínico predecir la eficacia in vivo de un medicamento en
10 particular. El presente método es útil en el ensayo de la
susceptibilidad microbiana cuando el organismo causante no
responde de modo predecible a antibióticos, como se indica
en la Tabla 1 que figura a continuación, y también cuando
el organismo es susceptible invariablemente a un medicamen-
15 to en particular, como indica la Tabla 2 que figura a con-
tinuación.

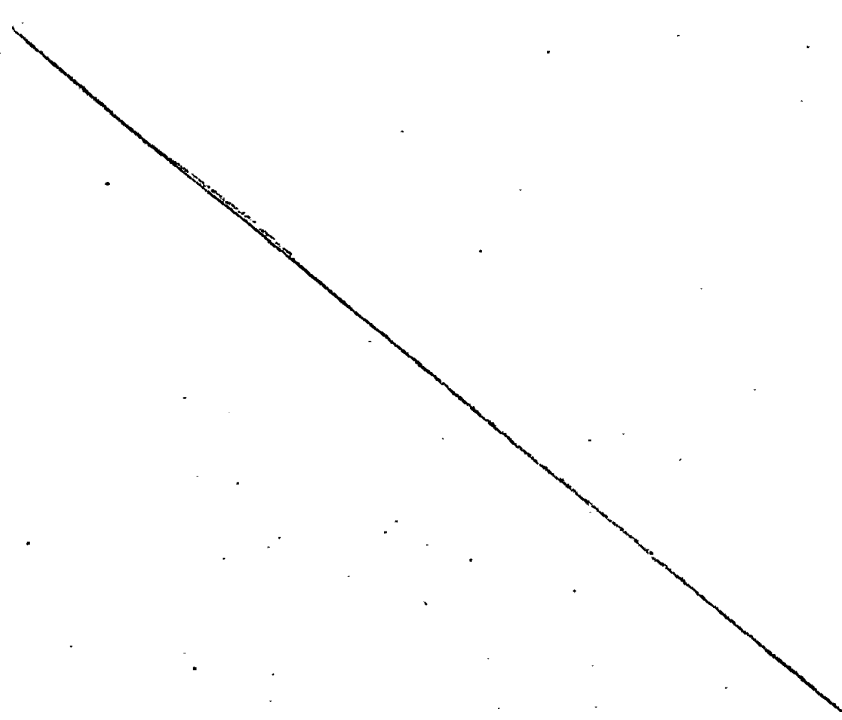


TABLA 1

1 MICROORGANISMOS CON RESPUESTA ANTIMICROBIANA QUE NO PUEDE
PREDECIRSE

<u>Organismo</u>	<u>Agente al que el organismo puede ser sensible</u>
5 <u>Staphylococcus aureus</u>	Penicilina G, meticilina, cefalotina, vancomicina
<u>Escherichia coli</u>	Ampicilina, cefalotina, tetraciclina, kanamicina.
10 <u>Klebsiella pneumoniae</u>	Cefalotina, tetraciclina, kanamicina, cloranfenicol.
10 <u>Pseudomonas aeruginosa</u>	Gentamicina, tobramicina, carbenicilina, polimixina B.
<u>Proteus mirabilis</u>	Penicilina (moderadamente resistente) ampicilina, kanamicina.
15 <u>Proteus vulgaris</u>	Tetraciclina, kanamicina, cloranfenicol
<u>Enterobacter aerogenes</u>	Tetraciclinas, cloranfenicol, kanamicina
<u>Salmonella</u>	Ampicilina, tetraciclina, cefalotina, kanamicina.
<u>Shigella</u>	Como arriba (<u>Salmonella</u>)
20 <u>Listeria monocytogenes</u>	Penicilina G, eritromicina, cloranfenicol.

TABLA 2

MICROORGANISMOS CON RESPUESTA ANTIMICROBIANA QUE PUEDE PREDECIRSE

<u>Organismo</u>	<u>Agente al que el organismo es uniformemente sensible.</u>
<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	Penicilina G, eritromicina.
<u>Diplococcus pneumoniae</u>	Todas las penicilinas, cefalotina, eritromicina vancomicina,
<u>Streptococcus pyogenes</u>	Los mismos que los Diplococcus.
<u>Clostridium perfringens</u>	Todas las penicilinas, cefalotina, tetraciclina
<u>Haemophilus influenzae</u>	Penicilina G, ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol.
<u>Haemophilus pertussis</u>	Los mismos que <u>H. influenzae</u>
<u>Brucella</u>	Tetraciclina.
<u>Corynebacterium diphtheria</u>	Eritromicina, penicilina G.
<u>Neisseria meningitidis</u>	Penicilina G, ampicilina.

La Figura 2 muestra otro ejemplo de un agente que perturba el crecimiento de un microorganismo. Las curvas "A" y "B" muestran las respuestas de potencial-tiempo para el crecimiento de una cepa de E.coli en un medio de cultivo, en el que se añadieron al microorganismo en crecimiento concentraciones diferentes de bacteriófago ϕ_x , es decir 10^4 fagos/ml y 10^5 fagos/ml respectivamente, una vez alcanzada la CMD. El tiempo requerido para que el potencial alcanzara su máximo después de añadir el virus está en razón inversa con el logaritmo de la concentración de virus en el momento de la adición, es decir,

$$1 \quad \log C \text{ del virus} \propto \frac{1}{Z_{\text{máximo}} - Z_{\text{CMD}}}$$

Mediante esta técnica el análisis de la concentración de virus puede ser conseguida en menos de una hora.

5 Los dibujos siguientes representan diversas realizaciones de la célula electroanalítica de la presente invención.

La Figura 3 muestra una realización de una célula electroanalítica en el que la cámara 1 está herméticamente cerrada con un obturador elástico 2 que cierra herméticamente por sí mismo. El electrodo de medida 3 se une y asegura en la cámara a través de una abertura (que no se muestra) en la pared de la cámara. La porción 4 del electrodo 3 se extiende a través de la pared de la cámara de modo que su superficie está expuesta al medio de cultivo 5 en la cámara a través de una abertura (que no se muestra) en la base de la misma. La porción 7 del electrodo de referencia situada en el interior de la cámara está protegida de cualquier microorganismo presente dentro del medio de cultivo por los medios de protección 8. Los medios de protección 8, el electrodo de medida 3 y el electrodo de referencia 6 pueden prepararse con los materiales antes descritos. En el uso del dispositivo antes descrito, una cantidad apropiada de una muestra fluida que contiene un microorganismo se inyecta a la cámara a través del obturador. Los terminales exteriores de los electrodos de medida y de referencia se unen después mediante cables a los terminales apropiados de un potenciómetro de alta impedancia y el medio es comprobado a medida que crecen los microorganismos.

30 Otra realización de la célula electroanalítica

1 de la presente invención se muestra en la Figura 4. En es-
te dispositivo, la célula es esencialmente una jeringa de
cámara 11 y émbolo 12. La base de la cámara está provista
de un conducto hueco adecuado 13 que puede ser una aguja hue-
5 ca, un tubo de caucho o semejante, un extremo 14 del cual
sobresale a través de la cámara y los medios de protección
de los microorganismos 15 en la masa del medio de cultivo
16 en el interior de la cámara. El dispositivo está equipa-
do con el electrodo de medida 17 que está unido a la cámara
10 a través de una abertura (que no se muestra). La porción 18
del electrodo está en contacto con el medio de cultivo. El
electrodo de referencia 19 está unido y fijado a la base de
la cámara a través de una abertura (que no se muestra). La
porción del electrodo dentro de la cámara 20 termina en el
15 interior de los medios de protección 15.

El dispositivo de la Figura 4 está adaptado para
que el mismo dispositivo pueda ser usado para sacar o expul-
sar directamente fluidos de un cuerpo vivo a un medio de cul-
tivo y unirse inmediatamente a un potenciómetro para que pue-
20 da ser comprobado el crecimiento de cualquier microorganismo
presente en el fluido del cuerpo.

Todavía otra realización de la célula de la presen-
te invención se muestra en la Figura 5. El dispositivo en es-
te caso está adaptado para que un fluido que contiene un mi-
25 croorganismo que ha de analizarse pueda ser sacado a la cáma-
ra 30 a través del conducto de entrada 31 por medio de vacío
aplicado al conducto 32. Ambos conductos se muestran como
sobresalientes a través del obturador de cierre hermético
elástico 33, sin embargo, puede apreciarse que ambos conduc-
30 tos pueden unirse al dispositivo a través de las paredes de

1 la cámara 30 si se desea. A medida que la muestra de fluido
es aspirada hacia el dispositivo por la fuerza del vacío,
cae sobre el medio de cultivo 34 y se mezcla en su interior.
El electrodo de medida 35 se une al dispositivo a través de
5 una abertura (que no se muestra) de modo que el extremo de
medida del electrodo (36) sobresale hacia el medio de culti
vo. El electrodo de referencia 37 se une al dispositivo de
un modo similar en la base de la cámara de modo que el ex-
tremo 38 dentro de la cámara se proyecta a los medios de pro
10 tección 39 que protegen el extremo del electrodo de los mi-
croorganismos existentes en el medio de cultivo. El disposi
tivo puede ser usado del mismo modo que el dispositivo que
actúa por la fuerza del vacío en vez de mediante inyección
a través del obturador de cierre hermético.

15 Todavía en otra realización del dispositivo de la
presente invención, como muestra la Figura 6, las partes en
funcionamiento se encuentran presentes dentro de una aguja.
Así pues, el dispositivo se fabrica con un conducto 40 que
puede ser una aguja hueca, el interior de la cual está dis
20 puesto concéntricamente con medios eléctricamente aislantes
41. El cable 42 está unido a la superficie exterior de la
aguja para que actúe como electrodo de medida. El alambre
43 está dispuesto dentro del núcleo interior hueco 44 de los
medios aislantes y unido a la base del núcleo aislante 45
25 por medios de protección 46. El aparato de aguja se une des
pués a una cámara herméticamente cerrada, en que se ha hecho
vacío (que no se muestra) que puede contener un medio de cul
tivo. Cuando se usa, la aguja se inyecta en un sujeto y los
fluidos que contienen el microorganismo que se desea medir
30 son sacados. Los cables unidos a la aguja pueden ser unidos

1 entonces a un potenciómetro de alta impedancia para medir
los microorganismos existentes en el fluido.

5 En otra realización del dispositivo de la presente invención (que no se muestra), el dispositivo de la Figura 3 puede cerrarse herméticamente o empaquetarse bajo vacío para proporcionar vacío dentro del dispositivo. La base de la cámara del dispositivo está provista de una aguja hueca herméticamente cerrada cuyos extremos unidos se proyectan a través de la base y de los medios de protección hacia el medio de cultivo. El dispositivo puede ser usado para sacar un fluido que contiene un microorganismo a la cámara, sencillamente inyectando el extremo libre de la aguja en el cuerpo de un animal, por ejemplo, con lo que la acción de la inyección y/o la presión del líquido rompe el cierre existente en el interior de la aguja y el líquido sale hacia el dispositivo por la acción del vacío.

15 La presente invención posee una extensa variedad de campos de aplicación, ya que la presente invención es aplicable siempre y cuando se desee detectar la presencia de microorganismos en una muestra. Así pues, la presente invención puede ser usada para detectar la presencia de bacterias en un medio fluido biológico o no biológico. El método de la invención puede ser usado como una técnica de selección de antibióticos para determinar la eficacia de un antibiótico. Por ejemplo, un microorganismo puede ser cultivado en una célula y añadirse a la misma un antibiótico. El medio puede ser observado después para detectar la influencia del antibiótico sobre las lecturas del potencial obtenidas. Las aplicaciones biológicas incluyen la detección de microorganismos en líquidos del cuerpo tales como orina, sangre,

1 líquidos cerebro-espinales, esputos, líquido amniótico, lí-
quido sinovial, plasma y dializados de un riñón artificial.
La presente técnica es aplicable también a cultivos de teji-
dos de la garganta, cultivos de tejidos vaginales y cervica-
5 los y biopsias de tejidos. La presente técnica encuentra
una aplicación adicional para la detección de microorganismos
en medios que producen alcohol tales como los proceden-
tes de madera, granos, melazas, líquidos sulfíticos y resi-
duales; líquidos procedentes de la producción de vinos y
10 cervezas y de la producción de glicerina. Todavía otro cam-
po de aplicación es en la fermentación de ácidos orgánicos
tales como ácido láctico, ácido cítrico, ácido fumárico y
ácido acético. Todavía otro campo general de aplicación es
en la industria de tratamiento de alimentos, en particular
15 en el envasado y producción de bebidas y alimentos enlata-
dos. Todavía otros campos de aplicación incluyen suminis-
tros de agua rurales, municipales y regionales, depósitos
de alojamiento de agua y depósitos sépticos.

Habiendo descrito la invención en líneas genera-
20 les, puede obtenerse un conocimiento adicional mediante re-
ferencia a ciertos ejemplos específicos que se proporcionan
en esta Memoria con propósitos de ilustración solamente y
que no están destinados a ser limitativos, a menos que se
especifique de otro modo.

25 EJEMPLO 1

Para el procedimiento experimental específico des-
crito a continuación se obtuvieron las siguientes bacterias
que producen hidrógeno, de la Colección Americana de Culti-
vos Tipo (Rockville, Maryland) US.A.

30 E.coli (12014), E.aerogenes (13046), S.marcescens

1 (13880), C.intermedium (6750), C.freundii (8090) y P.mira-
bilis (12453).

5 Los cultivos fueron mantenidos a 5°C sobre tubos inclinados de agar con tripticasa y soja (ATS, BBL) y se transfirió mensualmente.

Preparación del inoculum, cuentas de viables, y medios.

10 Se prepararon inóculos para las medidas de hidrógeno haciendo diluciones 10 veces mayores de un cultivo en caldo de tripticasa y soja (BBL) de 24 horas, en caldo de peptona al 0,05% estéril y añadiendo 3 ml de diluciones apropiadas a 27 ml de base de caldo al rojo fenol con 1,0% de glucosa (Difco) previamente calentado a 35°C. En un número de ensayos limitado fueron ensayados miembros del grupo coliforme en caldo de lauril triptosa (Difco). Se hicieron
15 cuentas de viables esparciendo diluciones apropiadas de la serie de diluciones 10 veces mayores sobre AST y contando las colonias después de 35 h de incubación a 35°C. Se hicieron cuentas de viables asimismo sobre cada organismo en
20 el momento del desprendimiento de hidrógeno y al cabo de 24 horas de incubación.

Medidas de hidrógeno

25 El aparato experimental para medir el desprendimiento de hidrógeno por los organismos de ensayo estaba constituido por un tubo de ensayo (25 por 90 mm) que contenía dos electrodos más caldo y organismos y estaba colocado en un baño de agua a 35°C. Los cables de los electrodos fueron conectados a un amplificador compensador de corriente continua (tipo 122, Neff, Inc., Duarte, California) que a su vez
30 estaba conectado a un registrador de banda (modelo 194, Ho-

1 neywell Industrial Div., Fort Washington, Pa). El amplifi-
cador compensador de corriente continua servía para igualar
la alta impedancia del sistema de ensayo de electrodos con
el registrador de banda. El desprendimiento de hidrógeno fue
5 medido por un aumento de voltaje en la dirección catódica
(negativa) y se registró en el registrador de banda.

Los electrodos empleados en el aparato eran un
electrodo normal de calomelanos (SCE-Beckman Instruments
Inc., Fullerton, California) como electrodo de referencia
10 adherido a un obturador de plástico, y se formó un electro-
do de platino configurando una tira de platino para que se
adaptara a la circunferencia del tubo de ensayo; una sec-
ción del platino fue colocada en el exterior de un tubo de
ensayo para que se uniera al cable del amplificador. Duran-
15 te el funcionamiento el electrodo de platino y el tubo de
ensayo fueron esterilizados por vapor mediante las técnicas
de autoclave convencionales. El electrodo de referencia (BNC)
unido al obturador de plástico, se esterilizó por exposición
durante 30 minutos a dos lámparas ultravioleta (15T8, Gene-
20 ral Electric Heights, Ohio) alojadas en una caja de plásti-
co transparente. Un número de ensayos efectuados demostró que
esta técnica era eficaz para esterilizar los electrodos de
referencia.

El registro de banda de la curva de respuesta en
25 milivoltios para $1,9 \times 10^0$ células de E.coli por mililitro
se muestra en la Figura 8. Característicamente, para organis-
mos que producen hidrógeno, el registro muestra un período
de retardo durante el cual el microorganismo está creciendo
pero se encuentra presente en poblaciones insuficientes pa-
30 ra proporcionar una respuesta. Una vez la población del mi-

1. microorganismo ha alcanzado un nivel suficiente, se aprecia una respuesta que es atribuible al microorganismo. A medida que la cantidad de hidrógeno desprendido se hace suficiente, las características de respuesta del electrodo cambian rápidamente como puede apreciarse por el aumento súbito de potencial. El período de caída una vez alcanzado el potencial máximo (400 a 500 milivoltios) ocurrió en un período de 3 a 4 horas.

Las relaciones entre el tamaño de inóculo y la duración del período de retardo para diversos inóculos de E.coli se indica en la Figura 8. Se obtuvieron períodos de tiempo de retardo comprendidos entre 1 hora para 10^6 células/ml y 7 horas para 10^0 células/ml, lo que indicó (1) que cada aumento de células de 10 veces reducía el tiempo de retraso en 60 a 70 minutos y (2) que la concentración celular media en el momento de una rápida acumulación de hidrógeno era de 1×10^6 células/ml. Dado que los estudios iniciales no mostraron diferencias en las curvas de respuesta para células lavadas o sin lavar, estos estudios fueron efectuados con células sin lavar. Además, no se apreciaron diferencias en las curvas de respuesta o en los tiempos de retardo entre coliformes, E.coli, E.aerogenes, y C.intermedium, cuando se ensayaron en caldo de lauril triptosa o caldo de rojo fenol suplementado con glucosa. Los análisis por cromatografía gaseosa de gas separado de la cabeza mostraron que para los cultivos usados en este estudio, el nivel de H_2 para cultivos de 24 horas estaba comprendido entre 4 y 10% en volumen. La única excepción fue el S.marcescens en el que se estimó el H_2 como indicios ($\leq 1\%$). Estudios límite indicaron que el pH no había cambiado marcadamente antes o duran

1 te el tiempo en que se detectó H_2 .

Ejemplo 2

5 La Figura 10 muestra una comparación de las características de potencial de una bacteria que produce hidrógeno (E.coli) y una bacteria que no produce hidrógeno (Alkalescons). Cada bacteria se cultivó en un medio de cultivo de lauril-triptosa-glucosa inoculando cada medio con 1 ml de una muestra que contenía 100 células/ml. Las características de respuesta fueron medidas mediante un par de
10 electrodos de platino-calomelanos. Los registros muestran las características de respuesta mucho mayores en el sistema que contenía las bacterias que producen hidrógeno en comparación con las características de respuesta de las bacterias que no producen hidrógeno. Nótese que se observa el
15 mismo tiempo de retardo cuando el inóculo inicial y las velocidades de crecimiento eran iguales.

Ejemplo 3

Los datos de la Figura 10 proporcionan una correlación que muestra que el cambio de potencial de un medio
20 de cultivo de un organismo alcalescente en función de la concentración celular. Una muestra de 1 ml de un alcalescente radiactivo (tamaño del inóculo inicial 100 células/ml) se cultivó en 10 ml de un medio de cultivo de Triptica-
25 sa y soja a 37°C. Cada vez se hizo una lectura del potencial, se tomó una muestra del electrodo y se midió la radiactividad. Las gráficas indican claramente incrementos correspondientes de potencial y radiactividad en función de la
30 concentración celular. Los datos indican con claridad que las células se concentran de modo creciente en torno a la superficie del electrodo y que la respuesta de potencial es

1 ocasionada por esta acumulación de células en torno al electrodo.

Ejemplo 4

5 Una muestra de 1 ml de alcalescente fue cultivada en 10 ml de medio de caldo de Tripticasa y soja durante 7 horas. El crecimiento de las bacterias fue comprobado al mismo tiempo por dos sistemas de electrodos diferentes, es decir, un sistema de alambre de platino-calomelanos y un sistema de níquel-níquel en el que se protegió un electrodo de níquel de los organismos mediante un vidrio poroso. Como
10 puede deducirse haciendo referencia a la Figura 11, ambas curvas obtenidas son esencialmente las mismas excepto que el sistema de electrodos de níquel-níquel no parece ser tan sensible como el sistema de platino-calomelanos.

15 Ejemplo 5

Una muestra de 1 ml de Pseudomonas aeruginosa se cultivó en caldo de tripticasa y soja en una célula descrita en la Figura 3, en la que tanto el electrodo de medida como el electrodo de referencia eran de acero inoxidable del tipo 3 ó 4. El material de protección en este ejemplo era agar peptonado con 10 mg/ml de NaCl. Cuando la población celular alcanzó 9×10^4 células/ml, se detectó el cambio de potencial mostrado en la Figura 1.

Ejemplo 6

25 Se siguió el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 5 con la excepción de que el organismo cultivado era E.coli en un medio de caldo de tripticasa y soja. Se observó una lectura de potencial a un nivel de población de $1,2 \times 10^5$ células/ml.

30 Ejemplo 7

1 Se siguió el mismo procedimiento de los Ejemplos
5 y 6 con la excepción de que el medio de cultivo era un
medio de glicolato de sodio y el organismo era Shigella al-
5 kalescens. Se observó una lectura de potencial a un nivel
de población de $8,6 \times 10^4$ células/ml.

Ejemplo 8

 Se siguió el mismo procedimiento de los Ejemplos
5-7 con la excepción de que el medio de crecimiento era gli-
colato de sodio + 0,5 ml de sangre humana y el organismo
10 era Hemophilus influenzae. Se observó una lectura de poten-
cial a un nivel de población de $2,4 \times 10^5$ células/ml.

Ejemplo 9

 Se siguió el mismo procedimiento de los Ejemplos
5-8 con la excepción de que el organismo era Bacillus subti-
15 lus en un caldo nutritivo al 1% con 0,5% de NaCl a 30°C. Se
observó una lectura de potencial a un nivel de población de
 $2,3 \times 10^3$ células/ml.

Ejemplo 10

 Se siguió el mismo procedimiento de los Ejemplos
20 5-9 excepto que el organismo era Candida tropicalis y el me-
dio de cultivo era caldo nutriente al 10% con 30% de dextro-
sa, a 30°C. La detección tuvo lugar a $3,1 \times 10^5$ células/ml.

Ejemplo 11

 Se usó la célula de la Figura 4 para cultivar el
25 hongo Aspergillus niger en caldo de tripticasa y soja a 25°C.
Se observó una lectura de potencial a un nivel de población
de 10^4 células/ml.

Ejemplo 12

 Se lavó un cultivo de Pseudomonas aeruginosa en so-
30 lución amortiguadora no nutritiva (Solución amortiguadora de

1 fosfato o SAF) y se dejó sin alimentar a 15°C durante 48 ho-
ras. Las células mantenidas en este estado no se dividen ni
metabilizan pero están técnicamente vivas. Por consiguiente
5 ellas tienen todavía una carga negativa. Estas células fue-
ron añadidas después a una célula, descrita en la Figura 4,
con electrodos de acero inoxidable, pero el caldo nutriti-
vo fue reemplazado con SAF. A una población de 2×10^5 célu-
las viables/ml se observó señal.

Ejemplo 13

10 Dos muestras de leche de vacuno se añadieron a cé-
lulas del tipo descrito en la Figura 3. Una muestra estaba
pasterizada y la otra era leche "cruda". La leche servía tan-
to como medio de cultivo y como inóculo en ambos casos. Los
electrodos eran de acero inoxidable y la membrana era de agar
15 salino. El experimento se efectuó a una temperatura de 37°C.
Cada muestra produjo una señal a aproximadamente 10^5 células/
ml, pero la leche "cruda" desarrolló la señal en 2, 5 horas
y la leche pasterizada alcanzó 10^5 células y dió una señal
a 4,5 horas.

20 Ejemplo 14

Ensayos de susceptibilidad microbiana

Reactivos y medios

Lotes idénticos de medios y agentes antimicrobia-
nos fueron usados en los ensayos de susceptibilidad efectua-
25 dos. Los medios usados fueron agar de tripticasa y soja (ATS)
y CTS de BBL (Baltimore Biological Laboratories, Cockeysvi-
lle, Maryland). Los 12 agentes antimicrobianos usados en los
experimentos, que fueron escogidos sobre la base de su utili-
dad clínica, eran tipos de referencia de laboratorio que in-
30 cluían los antibióticos siguientes: penicilina G potásica,

POOR
QUALITY

1 cefalotina sódica, tobramicina, clorhidrato de vancomicina
y sulfato de estreptomina, obtenidos de Eli Lilly y Co.;
tetraciclina y carbenicilina, obtenidas de Pfizer Laborato-
ries; ampicilina y nafcilina sódica de Wyeth Laboratories;
5 kanamicina y meticilina de Bristol Laboratories y gentami-
cina de Schering.

La acción de un medicamento antibacteriano contra
una bacteria susceptible es o bien bacteriostática o bacteri-
cida. Un agente bacteriostático simplemente inhibe el creci-
10 miento bacteriano, un efecto que es reversible al retirar el
agente antimicrobiano. Los agentes bactericidas producen un
efecto de muerte irreversible sobre el organismo susceptible
al medicamento. De los 12 antibióticos, todos son bacterici-
das con la excepción de la tetraciclina que es bacteriostá-
15 tica. La Penicilina G, ampicilina, nafcilina, meticilina, y
carbenicilina, pertenecen en su totalidad a la familia de la
penicilina y por tanto su modo de acción lleva consigo inter-
ferencia con la síntesis de las paredes celulares de las bac-
terias. Esto es también cierto de la cefalotina, una cefa-
20 losporina, y la vancomicina, un glicopéptido. Los antibióti-
cos aminoglicosídicos kanamicina, estreptomina y gentami-
cina ocasionan informaciones equivocadas específicas del có-
digo genético al nivel de los ribosomas, interfiriendo por
ello con la síntesis de proteína de la bacteria. Esto resul-
25 ta asimismo del uso de la tetraciclina, que evita específi-
camente la unión de RNA de transferencia activado por amino-
ácidos a los ribosomas.

Cultivos

Los cultivos siguientes se obtuvieron de Hoffmann-
30 LaRoche, Inc. y procedían de la Colección Americana de culti

1 vos Tipo (ATCC) los organismos indicados: Escherichia coli
"Cepa Seattle" ATCC 25922, Klebsiella pneumoniae, ATCC
27736; Pseudomonas aeruginosa, ATCC 9721. Estas bacterias
5 son bacterias gram negativas. Las siguientes bacterias son
gram positivas: Staphylococcus aureus, "Cepa Seattle" ATCC
25923; Staphylococcus epidermidis ATCC 14990; y Staphylococcus
pyogenes, ATCC 10389. Además, se obtuvieron muestras
clínicas de estos mismos seis organismos de aislados de sen-
sibilidad procedentes del Hospital de la Universidad de Vir-
10 ginia, Departamento de Patología Clínica, Sección de Bacte-
riología. Estos organismos tanto patógenos como no patóge-
nos (Staphylococcus epidermidis) fueron escogidos debido a
que son algunos de los organismos que se encuentran más fre-
cuentemente en aislados de clínicas.

15 Preparación del Inoculum y Cuentas de viables

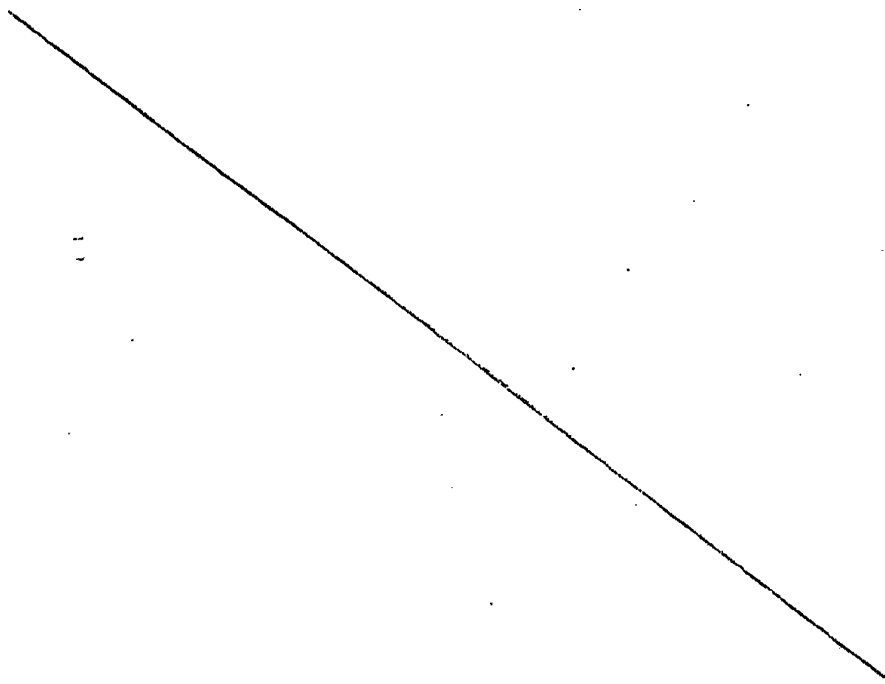
Se prepararon los inóculos haciendo una dilución
100 veces mayor x 2 de un cultivo durante la noche en caldo
de tripticasa y soja del organismo a ensayar en caldo de
tripticasa y soja estéril previamente calentado a 35°C. Así
20 pues, la dilución total de la solución de reserva de la no-
che era 10^{-4} . De la serie de 10^{-4} se pasaron 0,3 ml a un tu-
bo de ensayo (Falcon, desechable nº 2057) que contenía 2,7
ml de CTS si era el control de crecimiento o 2,6 ml de CTS
más 0,1 ml de una concentración particular de un antibióti-
25 co, apropiada para ser ensayada. El antibiótico se pesó en
una balanza analítica, conforme al tipo de actividad de ca-
da agente, y se diluyó con agua destilada estéril en un ma-
traz aforado para conseguir una solución de reserva de 1000
mcg/ml que se congeló después en porciones alícuotas peque-
30 ñas. Se obtuvieron también otras diluciones, según fue necce

1 sario, para ensayar la susceptibilidad, mediante la adición
de agua destilada estéril a esta concentración de reserva.
Las cuentas de viables fueron hechas mediante diluciones
apropiadas en placa partiendo de la serie de 10^{-4} en ATS
5 y contando colonias después de 24 horas de incubación a 35°C .
Cuentas de viables fueron hechas también sobre cada microor-
ganismo en el momento de la CMD y otra vez al cabo del perio-
do de ensayo de 24 horas para confirmar la concentración mí-
nima inhibitoria (CMI).

10 El aparato experimental usado en este estudio pa-
ra comprobar la inhibición de crecimiento debida a la adi-
ción de antibióticos consistía en tubos de ensayo, incluyen-
do hasta 8 de tamaño 17 x 100 mm, cada uno de los cuales
contenía un electrodo en combinación de Pt-ENC esteriliza-
15 do (por ebullición) (Sargent-Welch, S-30101-15), más CFS,
microorganismos y antibiótico cuando era apropiado, situado
en un bloque de calentamiento a 35°C . Los cables de los elec-
trodos fueron conectados a un potenciómetro de alta impedan-
cia (mayor de 10^8 ohmios), o un dispositivo distante de medi-
20 da del voltaje, que a su vez se conectó a un registrador de
banda (Hewlett Packard, tipo 680M). Se midió el crecimiento
microbiano mediante el aumento de voltaje en dirección nega-
tiva con el tiempo, registrado sobre el registrador de ban-
da.

25 La Figura 12 es un registro de banda de la curva
de respuesta antimicrobiana de un experimento de cuatro ca-
nales constituido por una muestra clínica de la bacteria
Gram-positiva que no produce hidrógeno Staphylococcus epi-
dermidis tratada con 0,012, 0,5 y 1,0 mcg/ml del antibióti-
30 co ampicilina, como se indica en las curvas B, C y D respec-

1 tivamente. La curva A muestra la curva de respuesta de una
muestra de control de S.epidermidis que no había sido tra-
tada con ampicilina. La Figura 13 es un registro de banda de
la curva de respuesta antimicrobiana de un experimento de
5 seis canales constituido por una muestra de cultivo ATCC de
la bacteria patógena Gram-negativa que produce hidrógeno
Klebsiella pneumoniae tratada con 0,3, 0,4, 0,5 y 1,0 y 2,0
mcg/ml de cefalotina como muestran las curvas B', C', D',
E' y F', respectivamente. La curva A' muestra la curva de
10 respuesta de una muestra de control de K.pneumoniae que no
había sido tratada con cefalotina. Ambas figuras muestran
que el crecimiento de las bacterias respectivas es inhibido
de modo creciente mediante el antibiótico particular usado.
La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la
15 cantidad de agente antimicrobiano que inhibe totalmente el
crecimiento del microorganismo que se está ensayando. Las
Tablas 3 y 4 que figuran a continuación muestran los valores
de la CMI de diversos antibióticos para un número de microor-
ganismos, determinada mediante el método de la presente in-
20 vención:



1

TABLA 3

VALORES DE LA CMI DETERMINADOS ELECTROANALITICAMENTE/BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS

5

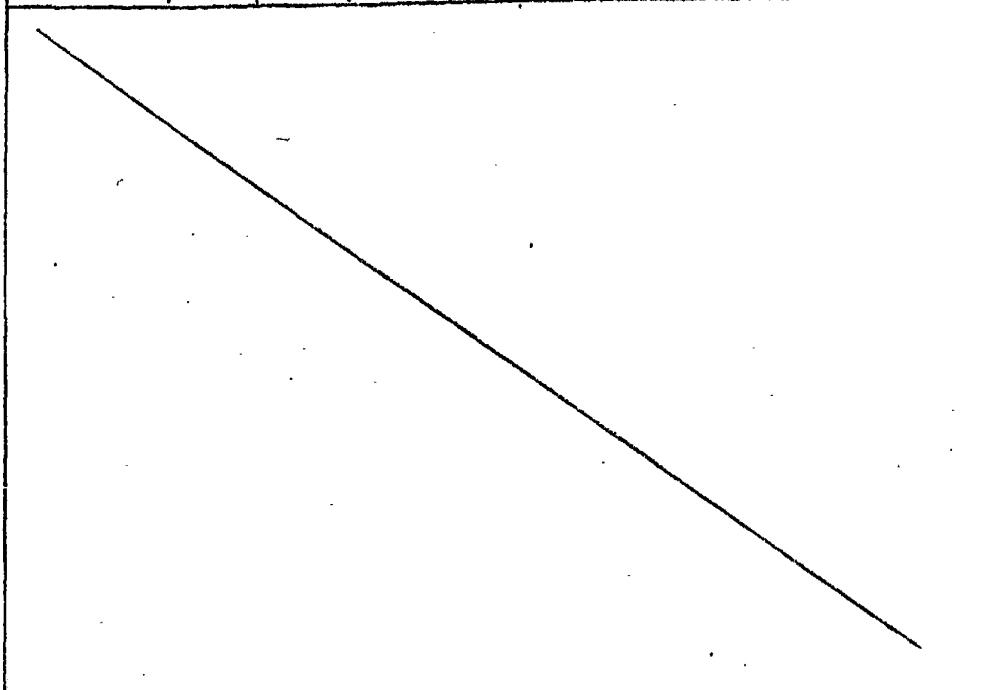
Antibiótico: Concentración en mcg/ml.

10

15

20

Organismo	Amp	Carb	Cef.	Tetra	Kana	Genta	Estrep	Tobra
E. coli (ATCC)	4,0	4,0	8,0	1,0	3,0	0,5	9,0	-
E. coli (clínico)	6,0	5,0	9,0	4,0	4,0	1,0	9,0	-
K. pneumoniae (ATCC)	32	>128	1,0	5,0-6,0	3,0	0,5	5,0-6,0	-
K. pneumoniae (clínico)	-	>128	-	5,0-6,0	4,0	0,5	6,0	-
P. aeruginosa (ATCC)	>128	64	>360	64	32-64	2,0	-	4,0
P. aeruginosa (clínico)	>128	64	>360	64	64	4,0	-	8,0



1

TABLA 4

VALORES DE LA CMI DETERMINADOS ELECTROANALITICAMENTE/BACTERIAS
GRAM-POSITIVAS

5

Organis- mo	Antibiótico: concentración en mcg/ml.								
	Pen G	Amp	Naf	Met	Cef	Tetra	Vanco	Kana	Stre
10 S.aureus (ATCC)	0,05	0,12-0,6	0,5	0,7	0,15-0,2	2,0	1,0	0,2	8,0
S.aureua (clínico)	0,05	0,12	0,5	0,7	0,8-1,6	2,0	2,0	0,5- 1,0	8,0
15 S.epider- midis (ATCC)	0,08-0,1	1,0	0,5- 1,0	0,5- 1,0	0,1	1,0- 2,0	1,5	0,4	4,0
20 S.epider- midis (Clínico)	0,1	0,8- 1,0	0,5- 1,0	0,5- 1,0	0,5- 1,0	2,0	2,0- 3,0	0,6	4,0- 6,0
25 S.pyogenes (ATCC)	-	-	-	-	-	-	0,1- 0,5		0,1
S.pyogenes (Clínico)	-	-	-	-	-	-	0,5		0,1

1 Habiendo descrito ahora totalmente esta invención,
será evidente para una persona de habilidad normal en la
técnica que pueden efectuarse muchos cambios y modificacio-
nes en la misma sin apartarse del espíritu o extensión de la
5 invención como se ha indicado en esta Memoria.

REIVINDICACIONES

10

Los puntos de invención propia y nueva, que se
presentan para que sean objeto de la presente solicitud de
Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que
se recogen en las reivindicaciones siguientes:

15

1ª.- Un método para detectar la presencia de un
microorganismo en una muestra de fluido, que comprende cul-
tivar un microorganismo en un medio de cultivo líquido que
está en contacto con un electrodo de medida y un electrodo
de referencia, y detectar la variación de potencial entre
20 dichos electrodos, que proviene de la emigración y acumula-
ción de dicho microorganismo adyacente a la superficie de
dicho electrodo de medida, formando así una interacción car-
ga-carga entre dicho electrodo de medida y los microorganismos
acumulados, midiendo dicha variación de potencial con
25 un potenciómetro de alta impedancia.

2ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en el
que dicho potenciómetro de alta impedancia tiene una impedan-
cia de entrada de 10^7 a 10^{10} ohmios.

3ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en el
30 que la porción de dicho electrodo de referencia expuesta a

1 dicho medio de cultivo está protegida de dicho microorga-
nismo por medios de protección permeables al medio de cul-
tivo pero impermeables al organismo.

5 4ª.- Un método según la reivindicación 3ª, en el
que dichos medios de protección son un gel.

5ª.- Un método según la reivindicación 4ª, en el
que dicho gel es gel de agar.

10 6ª.- Un método según la reivindicación 3ª, en el
que dicho electrodo de medida y dicho electrodo de referen-
cia se fabrican con el mismo metal.

7ª.- Un método según la reivindicación 6ª, en el
que dichos electrodos se fabrican con níquel, oro, platino,
plata o acero inoxidable.

15 8ª.- Un método según la reivindicación 3ª, en el
que dichos electrodos se fabrican con metales diferentes.

20 9ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en el
que dicho electrodo de medida es un electrodo metálico y
dicho electrodo de referencia es uno de los electrodos nor-
males de calomelanos o el electrodo de mercurio-sulfato mer-
curioso.

25 10ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en
el que dicho medio de cultivo se selecciona entre el grupo
que consta de infusión de cerebro-corazón, caldo de tripti-
casa y soja, base de caldo con rojo fenol + 1% de glucosa,
caldo de tripticasa y soja + CO₂, leche, cerveza y glicola-
to de sodio.

11ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en el
que dicho microorganismo es una bacteria, hongo o levadu-
ra.

30 12ª.- Un método según la reivindicación 11ª, en

1 el que dicha bacteria es un organismo que no produce hidró-
geno seleccionado entre el grupo que consta de Staphylocco-
ccus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus,
5 Listeria monocytogenes, Pseudomonas aeruginosa, Moraxella,
Shigella alkalascens, Diplococcus pneumoniae, Bacillus sub-
tilus y Hemophilus influenzae.

13ª.- Un método según la reivindicación 10ª, en
el que dicha levadura es una especie de Candida, Hansenula,
Pichia, Torulopsis o Saccharomyces.

10 14ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en el
que dicho microorganismo se cultiva a una temperatura de 15
a 60°C.

15 15ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en el
que dicho microorganismo es una mezcla de dos tipos por lo
menos de microorganismos.

16ª.- Un método para detectar la presencia de un
microorganismo en una muestra de fluido.

20 Tal y como se ha descrito en la Memoria que ante-
cede, representado en los dibujos que se acompañan y para
los fines que se han especificado.

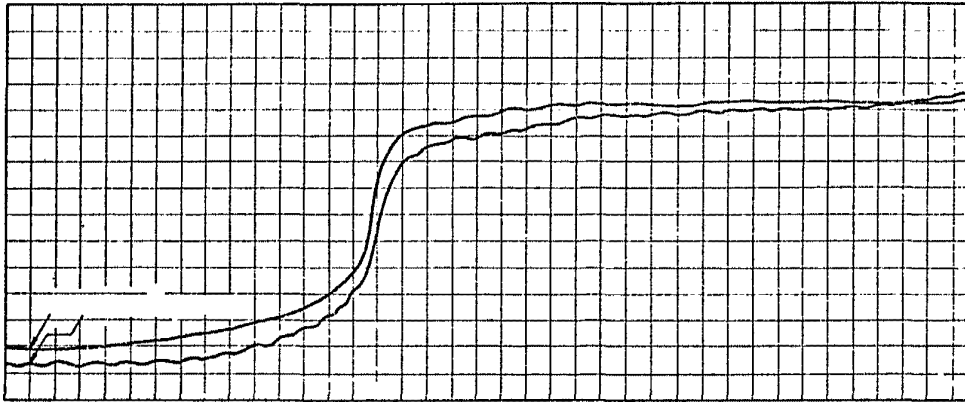
Esta Memoria consta de cuarenta y cinco hojas es-
critas a máquina por una sola cara.

Madrid, 24.FEB.1977

P.A. Fernando de Elzaburu
Por Poder.



FIG.1



Fernando de Elizaburo
Per. Poser.

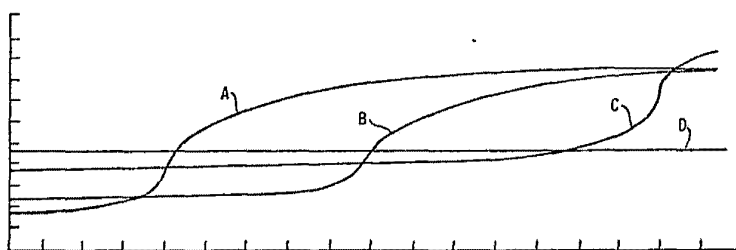


FIG. 12

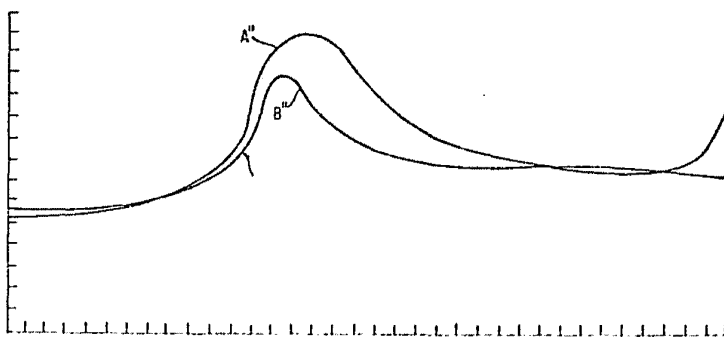


FIG. 2

Fernando de Elizaburu
Fcl Poder.

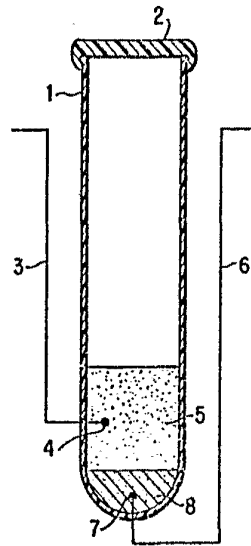


FIG. 3

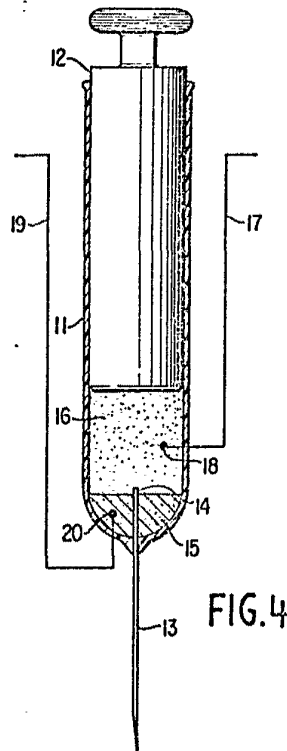


FIG. 4

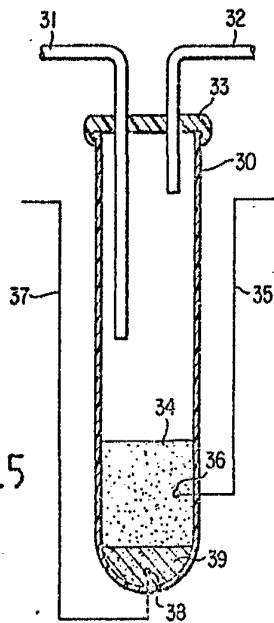


FIG. 5

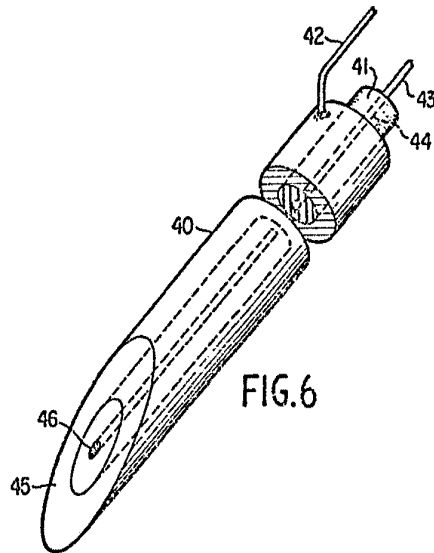


FIG. 6

Fernanda de Elizaburu
Eng. Patent.

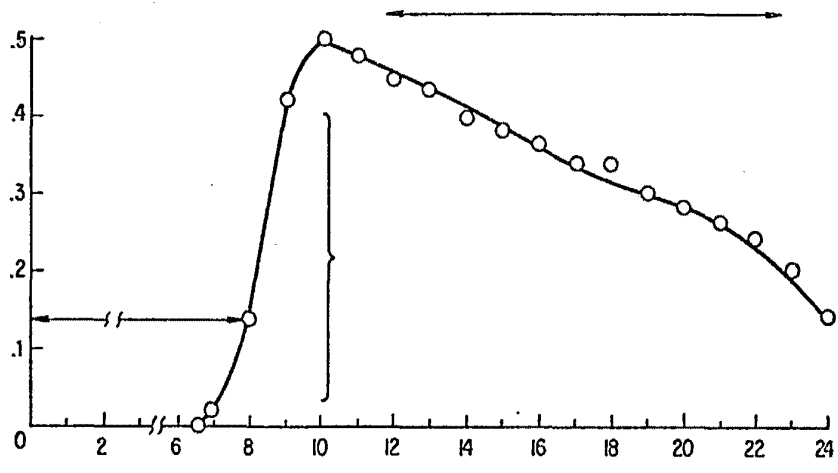


FIG. 7

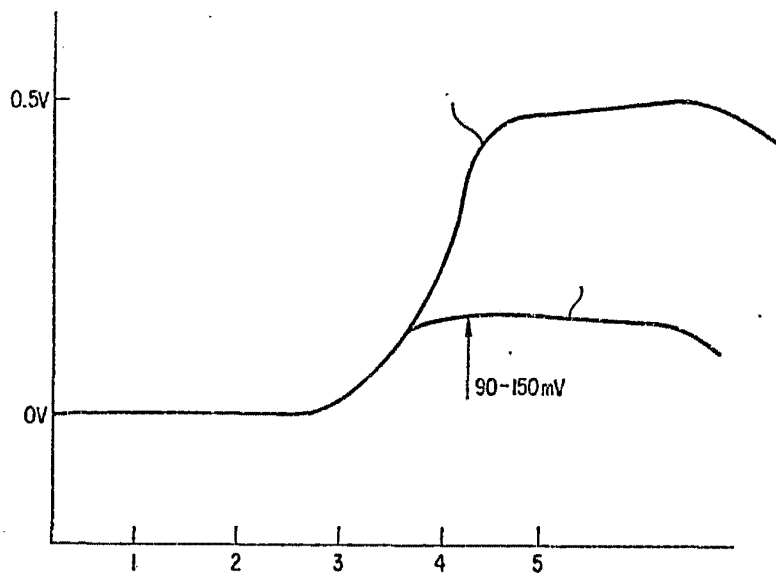


FIG. 9

Fernando de Elizaburu
Por Poder.
[Signature]

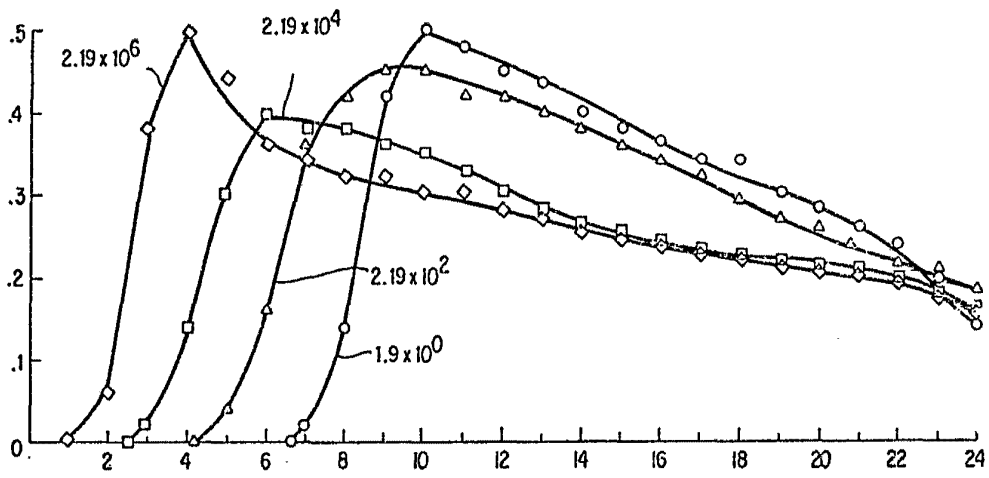


FIG.8

Fernando de Elizaburo
Por Poder

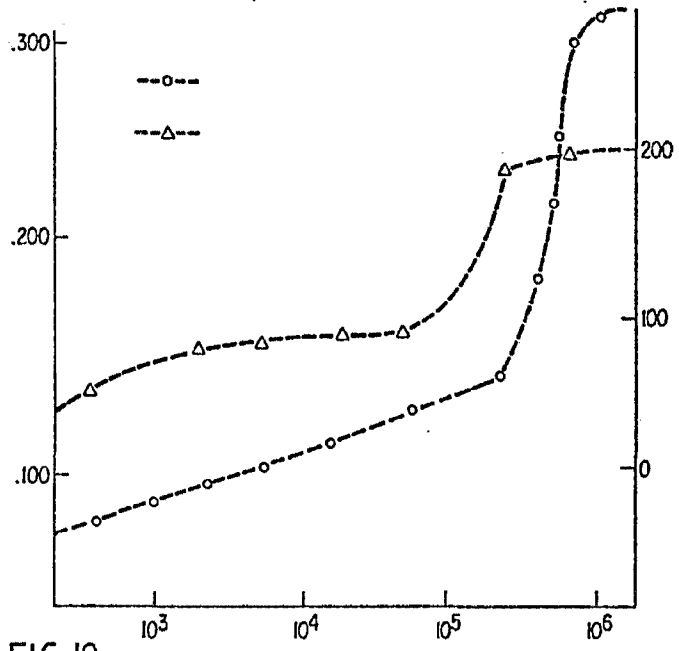


FIG. 10

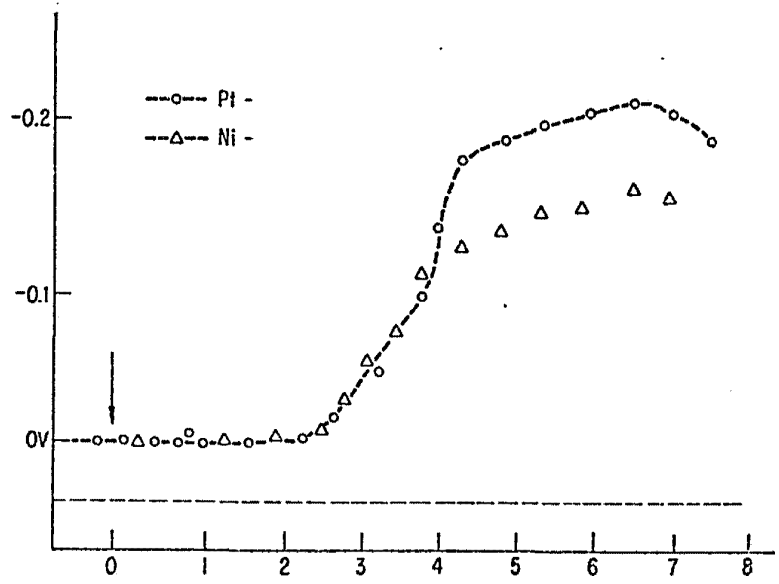


FIG. 11

Fernando de Elizaburu
Por Poder

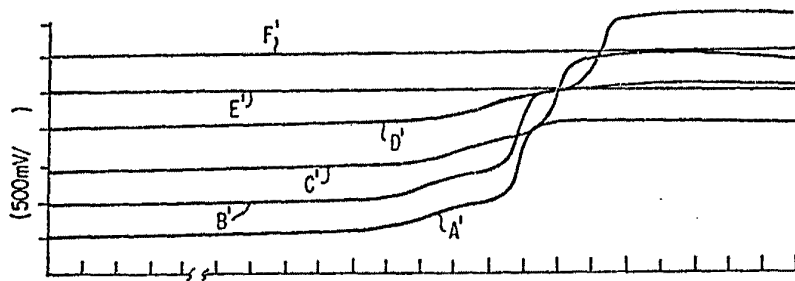


FIG. 13

Fernando de Elzaburu
Por Poder.