

20 JUL. 1978



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

11	ES	457529	10	A 1
21				
22	FECHA DE PRESENTACION = 5 ABR. 1977			

PATENTE DE INVENCION

30	PRIORIDADES:	31	NUMERO 674.473	32	FECHA 7 de Abril de 1976	33	PAIS Norteamericana.
----	--------------	----	----------------	----	--------------------------	----	----------------------

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL G01N	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
----	---------------------	----	-------------------------------------	----	-----------------------------------

64	TITULO DE LA INVENCION PROCEDIMIENTO PARA ENSAYAR LA SUSCEPTIBILIDAD DE UN MICROORGANISMO A LOS ANTIBIOTICOS.
----	--

71	SOLICITANTE (S) AMERICAN CYANAMID COMPANY.
----	---

DOMICILIO DEL SOLICITANTE Berdan Avenue, Township of Wayne, Estado de New Jersey, EE.UU.de A.
--

72	INVENTOR (ES) Eric John Messner y Albert Carl Dornbush.
----	--

73	TITULAR (ES)
----	--------------

74	REPRESENTANTE D. José Miguel Gomez-Acebo y Pombo
----	---

La presente invención se relaciona con ensayos de susceptibilidad a los antibióticos, y más particularmente con equipos de ensayo que tienen una serie de varias concentraciones de diversos antibióticos o agentes de control terapéutico, que se utilizan para determinar la interacción entre estos agentes de control y diversos microorganismos, por lo general patógenos, caracterizados por la presencia de poli(vinil pirrolidona) como agente formador de cuerpo y portador de retención de antibiótico.

Con la proliferación de antibióticos y otras drogas, tanto en el hospital y en el laboratorio como en instituciones educativas existe una demanda creciente de información concerniente a la susceptibilidad o sensibilidad de un microorganismo particular a diversos antibióticos o drogas, como así también información sobre el análisis de constituyentes particulares en la sangre, u otros líquidos biológicos.

En la patente belga N° 691.532 del 28 de Febrero de 1967, se describe antibióticos o agentes quimioterapéuticos liofilizados (secados por congelación en diversas concentraciones, incluyendo un testigo, en celdas separadas que están dispuestas en columnas e hileras en una bandeja para ensayar la resistencia de microorganismos a antibióticos o agentes. Apéndices de retención se proyectan desde la base de las celdas de cultivo para retener el material liofilizado en las celdas individuales. Tapas identificadoras cooperan con cada celda de manera de cerrar e identificar los contenidos de cada celda. En las celdas de ensayo puede estar presente, en estado liofilizado, un medio de cultivo y/o indicador. Las cel-

das y las tapas son esencialmente transparentes para permitir la observación de los cultivos.

La patente norteamericana N° 3.713.985 de Astle, concedida el 30 de Enero de 1973, describe una serie de reactivos biológicos en una serie de tasas, en una tira, o paleta, teniendo la tira colas de milano para trabar longitudinalmente entre sí un grupo de las tiras de modo de formar una bandeja. Se describe una cubierta de lámina para proteger los contenidos liofilizados durante el almacenamiento, con reconstitución de los contenidos en el momento del uso. El medio de cultivo y los organismos a ensayar son agregados secuencialmente y por separado en el momento del uso, de manera que se redispersa primeramente el reactivo testigo. Luego se inocula e incuba.

La cantidad de antibiótico que está presente para la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos está comprendida a menudo en la gama de aproximadamente 0,1 a 250 µg/ml. Siendo 0,2 ml de solución una muestra de ensayo de tamaño conveniente, la cantidad de antibiótico en una serie de cámaras estará comprendida aproximadamente entre 0,02 y 50 µg. Estas cantidades son tan pequeñas que la simple vista no sería capaz de confirmar su presencia en las cámaras de ensayo.

Utilizando poli(vinil pirrolidona) como agente formador de cuerpo soluble en agua y portador de retención de antibiótico, particularmente cuando se introduce la poli(vinil pirrolidona) y el antibiótico en cámaras de ensayo en solución acuosa, y luego se los congela y se los seca, el antibiótico forma cuerpo en la espuma de poli(vinil pirrolidona)

y ambos son mantenidos adhesivamente en la cámara de ensayo, y se comprueba conclusivamente su presencia en la cámara de ensayo por observación visual en el momento del uso. La visibilidad de la espuma proporciona confirmación física de la presencia del antibiótico, y constituye un factor de confianza psicológica para el usuario.

La poli(vinil pirrolidona) secada facilita la disolución del antibiótico, puesto que lo mantiene finamente subdividido y es soluble ella misma. La poli(vinil pirrolidona) es biológicamente inerte. Se la ha utilizado como extendedor de sangre, y en muchos ambientes biológicos. En la U.S. Pharmacopoeia se la ha incluido como "Povidone", y sus usos biológicos son ya conocidos. Es tan inerte que una cantidad de menos de 250 hasta por lo menos 10.000 $\mu\text{g/ml}$ es satisfactoria para formar una esponja capaz de contener el antibiótico. Es conveniente una concentración preferida de 2.000 $\mu\text{g/ml}$. Esto proporciona 400 μg por cada recipiente de ensayo de 0,2 ml, lo cual es conveniente tanto desde el punto de vista de la constitución como de la reconstitución, y también resulta fácilmente visible bajo la forma de una espuma para confirmar la presencia tanto de la poli(vinil pirrolidona) como del antibiótico.

De preferencia se emplea la misma concentración de poli(vinil pirrolidona) en cada cámara de ensayo para reducir la cantidad de variables, y permite que la observación visual confirme que cada calidad está uniformemente llenada.

A menudo se emplea una cantidad que no contiene antibiótico a fin de confirmar las características de crecimiento

to en ausencia de cualquier inhibición, o para confirmar la esterilidad del equipo de ensayo. Esta cámara de ensayo puede contener opcionalmente poli(vinil pirrolidona) como testigo.

5 El equipo de ensayo debe ser estéril de modo que solamente el organismo bajo ensayo será cultivado. Se emplea técnicas de esterilización durante el llenado y secado. Algunas sustancias controladoras de antibióticos o de crecimiento, que afectan la naturaleza de, y que actúan como, agente
10 inhibidor de microorganismos, pueden ser esterilizadas in situ mediante óxido de etileno, radiación, calor u otros agente compatible con la sustancia controladora de crecimiento. Ciertas de las drogas del tipo sulfa son muy estables bajo procesos de esterilización.

15 Al disponer de una cantidad de placas de ensayo con cavidades en cada una, se puede emplear un antibiótico separado en cada placa de ensayo. Diferentes pacientes en un hospital pueden tener diferentes espectros de antibióticos que deben ser ensayados.

20 Al ser apilables, se puede manipular una pila de 5 ó 10 como una sola unidad en incubación y almacenamiento. Se puede apilar convenientemente una pluralidad de placas de ensayo, 5 ó 10, con un agente deshidratante en una bolsa hasta el momento del uso. Se puede emplear una bolsa de lámina para
25 obtener máxima protección contra la humedad.

En los dibujos que se acompaña:

La Fig. 1 es un corte de una placa de cultivo con una tapa de cierre elástico de material plástico que cierra las

cavidades individuales, mostrando el antibiótico en una espuma de poli(vinil pirrolidona);

La Fig. 2 es una vista de una tapa de cierre elástico de material plástico;

5 La Fig. 3 es un corte de una cavidad llenada con una solución líquida de antibiótico y poli(vinil pirrolidona);

La Fig. 4 es un corte de la cavidad después de haber sido congelado y secado el líquido para formar una espuma;

10 La Fig. 5 muestra un corte de la cavidad con la tapa de cierre elástico en posición;

La Fig. 6 muestra los contenidos de una cavidad al ser reconstituidos mediante la adición de un líquido;

15 La Fig. 7 muestra un corte de una cavidad con la tapa de cierre elástico en posición, mostrando el líquido claro ya sea antes del crecimiento de cualquier microorganismo o habiéndose inhibido el crecimiento;

20 La Fig. 8 muestra una cavidad individual con la tapa de cierre elástico en posición, conteniendo un líquido nebuloso o turbio resultante de la propagación de microorganismos en el mismo;

La Fig. 9 es una vista en perspectiva que muestra un grupo de placas de ensayo en cada una de dos bolsas de material plástico que están incluidas herméticamente en una envoltura de lámina a prueba de humedad;

25 La Fig. 10 es una vista en perspectiva de una placa de ensayo de cultivo individual;

La Fig. 11 es una vista lateral en elevación de una placa de ensayo de cultivo individual;

La Fig. 12 es una vista de extremo de una placa de ensayo de cultivo; y

La Fig. 13 es una vista de extremo de una pila de 5 placas de ensayo de cultivo apiladas para transporte o manipulación.

5 .

Según se puede ver en las Figs. 1 y 10, la placa de ensayo de cultivo biológico 21 consiste en una plataforma plana 22 que tiene una serie de cavidades rectangulares 23. Cada cavidad rectangular tiene un fondo plano 24 y paredes aproximadamente rectangulares 25. Utilizando paredes aproximadamente paralelas, se puede hacer pasar luz a través de dos paredes aproximadamente paralelas con una mínima deformación o desviación; esto permite una inspección ya sea visual o mediante un dispositivo óptico mecánico para medir la turbidez de materiales que se encuentran en la cavidad. Es deseable que la cavidad tenga una leve inclinación de sus paredes laterales comprendida en la gama de aproximadamente $1/2$ a 4° puesto que esta inclinación permite el moldeo de cavidades y el retiro del mandril de moldeo. En ausencia de inclinación, resulta más difícil retirar el mandril; y, si la inclinación es aproximadamente mayor que 4° , la cavidad comienza a resultar algo prismática en su acción sobre la luz.

10

15

20

Según se puede ver en la Fig. 1, para la forma específica de realización ilustrada, hay una serie de 10 cavidades. Es evidente que la cantidad de cavidades puede ser distinta, pero 10 es una cantidad conveniente para la mayoría de finalidades de ensayo.

25

En el frente de la plataforma plana 22 se encuentra un

faldón frontal que se extiende hacia abajo 26. El faldón frontal proporciona rigidez adicional y también tiene un grupo de muescas orientadoras 27. Cada muesca orientadora se encuentra en una relación espacial coordinada con respecto a una cavidad. Convenientemente las muescas están centradas con respecto a cada cavidad y sirven para la finalidad de orientar la placa de ensayo con respecto a un dispositivo de lectura cuando se emplea un sistema de alimentación mecánica en relación con un sistema de lectura por densidad electroóptica.

5
10
15
20
Convenientemente, aunque no necesariamente, se puede proveer un faldón posterior 28 en la parte posterior de la plataforma plana. También, adyacentemente a la parte posterior de la plataforma, se encuentra una nervadura que es de refuerzo 29. Esta nervadura está levemente adelgazada por razones de conveniencia de moldeo y se extiende hacia abajo desde la plataforma plana sobre una distancia suficiente para que la placa de ensayo descansa horizontalmente sobre una superficie plana horizontal. De preferencia, la nervadura de refuerzo y las cavidades tienen un plano de fondo común. Esto permite que las placas de ensayo de cultivo descansen en forma plana sobre una superficie de trabajo durante el llenado y cultivo, y también permite apilar las placas de ensayo sin que tiendan a volcarse.

25
En los extremos de la placa de ensayo se encuentran agrarraderas de apilación 30. Estas agrarraderas son interiormente huecas y adelgazadas, de modo que las agrarraderas encajan unas dentro de las otras cuando se apila las placas de ensayo. El frente y la parte posterior de las agrarraderas son

convenientemente extensiones del faldón frontal y del faldón posterior 26 y 28 y tienen un miembro proyectado hacia arriba 31 y una parte superior plana 32 en cada extremo. Las extensiones de los faldones tienen un ángulo tal que, cuando están apilados, cada conjunto encaja sin doblarse pero sin un movimiento libre indeseable.

La parte superior de la plataforma plana, encima de la nervadura de refuerzo, puede tener botones espaciadores 33. Estos botones espaciadores 33 tienen un tamaño tal que, cuando se dispone en las cavidades las tapas de las mismas de cierre elástico 34, a las cuales se hará referencia más adelante, la nervadura de refuerzo toma contacto con los botones espaciadores y proporcionan una apilación vertical uniforme.

Para el transporte, incubación y almacenamiento, se cierra las cavidades y los contenidos quedan protegidos por una tapa de cavidad de cierre elástico 34. La tapa de cavidad de cierre elástico está hecho con una hoja delgada 35 de material plástico flexible. Es levemente más grande que las cavidades que deben ser cubiertas y tiene una serie de cierres herméticos de cavidad rectangulares 36 que se proyectan hacia abajo desde la misma.

Según se puede ver en las Figs. 2 y 5, cada cierre hermético de cavidad tiene una configuración rectangular de un tamaño tal que encaja en una cavidad rectangular 23. La separación entre los mismos corresponde a la separación en la serie de cavidades rectangulares 23. Los cierres herméticos de cavidad son convenientemente huecos y se extienden parcial-

mente dentro de la cavidad en posición armada. Los rebordes 37 establecen convenientemente un fácil encaje a presión en la cavidad rectangular 23 de manera que se puede fácilmente retirar y volver a colocar la tapa de cierre elástico 34 y, cuando está colocada en posición, no se desprenderá bajo el efecto de los esfuerzos de transporte y de manipulación. Sobre la tapa de cierre elástico está también provista una solapa para levantarla 38. La solapa para levantarla tiene en parte un área texturizada 39. Se forma el área texturizada durante el moldeo, texturizando el molde de modo que el área texturizada resulta áspera y acepta tinta o una etiqueta con más facilidad que la superficie lisa de la tapa de cierre elástico. La solapa de levantamiento se extiende convenientemente desde la tapa de cierre elástico alrededor de la anchura de la tapa de cierre elástico y, cuando se la dispone hacia adentro, queda adosada contra la placa de ensayo cultivada de manera que se puede levantar la solapa de levantamiento 38 con la uña de un dedo; pero se la puede hacer girar 180° alrededor de un eje vertical de manera que la solapa de levantamiento se extiende hacia afuera como un rótulo de identificación.

El área texturizada de la solapa de levantamiento de la tapa de cierre elástico, permite la identificación de una placa particular de ensayo de cultivo en una pila. Convenientemente aunque no necesariamente, se puede proveer sobre la superficie de la placa de ensayo de cultivo 21 una etiqueta 40. Convenientemente la etiqueta incluye el nombre del antibiótico o agente activo, la identificación en lo que se refiere al

número de la tanda, fechas y origen, y tiene lugar para el nombre del paciente, la fecha del ensayo y otras informaciones que se pueden agregar en el momento del uso.

5 Los extremos de las agarraderas 30 pueden llevar una leyenda moldeada 41. Es conveniente moldear una marca de fábrica o el nombre del fabricante en la superficie de la agarradera para identificación.

10 El uso de la placa de ensayo de cultivo está ilustrado en las Figs. 3 a 8. La placa de ensayo de cultivo está moldeada con 10 cavidades rectangulares. Según se puede ver en la Fig. 3, se llena la cavidad con un antibiótico líquido 42 que contiene poli(vinil pirrolidona) como agente formador de cuerpo soluble en agua y portador de retención de antibiótico. La poli(vinil pirrolidona) es biológicamente inerte y
15 no ejerce efecto sobre el antibiótico, ni sobre el medio de cultivo a los microorganismos; sin embargo, cuando se la congela y se la seca, llena la cavidad con una esponjosidad que se asemeja por su textura a un "dulce de algodón" que retiene en posición al antibiótico e impide la migración del mismo.
20

Según se puede ver en la Fig. 4, el líquido con que se ha llenado las cavidades es congelado y secado para formar un antibiótico secado en la poli(vinil pirrolidona) 43. Convenientemente, se apila un grupo de las placas de ensayo de
25 cultivo sin las tapas de cierre hermético de las cavidades, por ejemplo como se ilustra en la Fig. 3, y se dispone un grupo de estas pilas sobre los estantes de una cámara de congelación, se congela los contenidos, se evacúa la cámara y se

seca hasta el estado de una esponja mediante técnicas convencionales de liofilización. Se protege la sequedad de la esponja colocando las tapas de cierre elástico de las cavidades y se almacena en un ambiente seco hasta el momento del uso.

5 La Fig. 5 muestra la esponja secada con la tapa de cierre elástico de las cavidades en posición.

En el momento del uso, según se ilustra en la Fig. 6, se agrega un diluyente líquido a la esponja seca.

10 Comúnmente, utilizando la práctica de dilución en tubo, el diluyente líquido es un medio de cultivo apropiado 44 que ha sido inoculado con un organismo de ensayo. De preferencia, el organismo de ensayo se encuentra a una concentración normalizada de modo que los resultados de las placas de ensayo son cuantitativos además de cualitativos.

15 Teóricamente, se puede mezclar el medio de cultivo mismo con el antibiótico, secarlos y mantenerlos en almacenamiento de modo que solamente sea necesario agregar, en el momento del uso, el organismo de ensayo y un diluyente inerte, por ejemplo agua. Se prefiere agregar al medio de cultivo con el
20 organismo de ensayo (1) debido a que se puede agregar el organismo de ensayo al medio de cultivo antes de que sea agregado, para evitar una doble adición, (2) se puede elegir un medio de cultivo que es particularmente apropiado para un organismo de ensayo específico, y (3) la concentración del orga-
25 nismo de ensayo es uniforme para todos los ensayos. Muchos medios de cultivo deshidratados son higroscópicos, y por su atracción de la humedad, podrían acelerar la destrucción de algunos antibióticos. Diferentes laboratorios prefieren di-

ferentes medios de cultivo para diferentes organismos, o aún para el mismo organismo. Agregando el organismo, que se debe ensayar en el medio de cultivo, se logra una flexibilidad adicional en la selección del medio de cultivo. Además, en ausencia del medio de cultivo, existe un riesgo mínimo de que esté presente un sistema que podría favorecer el crecimiento bacteriano durante el almacenamiento.

5
10
En la Fig. 7 se muestra una cavidad que contiene una solución clara 45. Después de haberse disuelto la esponja y el antibiótico en el medio de cultivo, la solución resulta clara. Si hay suficiente antibiótico para inhibir el crecimiento del organismo de ensayo, la solución permanece clara; en caso contrario, el microorganismo crece y hará que la solución se vuelva nebulosa según se indica en 46 en la Fig. 8.

15
Una solución clara 45 no muestra crecimiento bacteriano. En cambio, la solución nebulosa 46 muestra crecimiento bacteriano.

20
25
La lectura de las soluciones para determinar el crecimiento bacteriano puede ser ya sea por inspección visual, o se la puede llevar a cabo mediante un equipo electroóptico tal como un lector fotosensible y una luz de intensidad constante. La luz puede tener una longitud de ondas o color seleccionados, de acuerdo con la solución. Se puede emplear lectores separados para cada celda o se puede emplear el mismo lector para un grupo de 10 celdas en serie en una placa de ensayo de cultivo.

Para transporte y almacenamiento, se puede incluir con-

venientemente en una envoltura de material plástico 47, según se ilustra en la fig. 9, un grupo de 5 placas de ensayo en una pila. Se puede disponer también en la envoltura un desecante para asegurar sequedad. Se puede disponer entonces
5 dos o más de estas envolturas de material plástico en una envoltura externa de hoja 48. La envoltura externa de hoja puede contener envolturas desecantes adicionales y se la cierra herméticamente de modo de proteger su contenidos contra la humedad ambiente durante un período de tiempo prolongado.

10 Cuando se la cierra herméticamente de esta manera, las placas de ensayo de cultivo que están presentes mantienen esencialmente su potencia original indicada durante varios meses y es posible esperar que las placas de ensayo resultarán satisfactorias durante por lo menos varios años.

15 El tamaño de las cavidades no es crítico, pero un tamaño de cavidad de 8 X 10 mm en la parte superior y 5 X 8 mm en el fondo, con una profundidad de 9 mm, permite trabajar con 0,2 ml de fluido con las cavidades llenadas aproximadamente hasta la mitad, y permite un tamaño conveniente para
20 el trabajo con el consumo de una cantidad mínima de reactivos y materiales. Se obtiene buenos resultados con un espesor de las celdas mismas, de la placa de ensayo y de las agarraderas, de aproximadamente 0,8 mm. Este espesor representa un término medio entre que las partes sean suficientemente
25 gruesas para tener resistencia, y suficientemente delgadas para requerir un mínimo de material. Con un espesor de esta clase, las placas de ensayo de cultivos resultan suficientemente fuertes para ser reutilizadas, si así fuera conveniente,

pero también son suficientemente económicas para que por lo general resulte más barato considerar como descartables las placas de ensayo.

EJEMPLO

5 Se provee el antibiótico que debe ser ensayado en la gama de dilución de dos veces, que es de interés, comenzando con diez frascos de 4 lt en el primero de los cuales se introduce 6 g de poli(vinil pirrolidona) (Povidone USP) y 3 lt de agua triple destilada. En cada uno de los otros nueve frascos se introduce 3 g de poli(vinil pirrolidona) y 1500 ml de agua triple destilada.

10

Al primer frasco se agrega 206,25 mg de clorhidrato de tetraciclina, después de lo cual se sacude el frasco hasta que se han disueltos sus contenidos y han quedado uniformemente distribuidos. Se introduce entonces la mitad de los contenidos del primer frasco en el segundo frasco y se sacude este último con sus contenidos hasta que quedan uniformes. Se agrega entonces la mitad de los contenidos del segundo frasco al tercer frasco, etc, y se continúa la serie hasta que se ha obtenido en el noveno frasco la dilución seriada de dos veces.

15

Se descarta la solución diluida en exceso contenida en el noveno frasco. El noveno frasco contiene solamente poli(vinil pirrolidona) y agua triple destilada. Se le puede dejar vacío.

20

Se filtra bajo condiciones estériles los contenidos de cada frasco en botellas de reactivo de 2 lt a las cuales se tapa y se las mantiene en un baño de agua enfriada con hielo para su llenado mediante técnicas estériles. No se debe retardar indebidamente el llenado. Las soluciones permanecen

25

normalmente estables y sin cambio durante por lo menos 24 hr si se las mantiene en frío, pero es preferible realizar de inmediato el llenado para asegurarse contra pérdidas de potencia.

5 Se introduce 2/10 ml de los contenidos de cada uno de los frascos en las respectivas cavidades de una placa de ensayo individual.

 Se llena las cavidades en un total de 5.000. placas de ensayo, se apila las placas de ensayo y se las dispone en bastidores en una cámara fría. Se refrigera previamente la cámara fría manteniéndola a una temperatura inferior a -40°C , manteniéndose el enfriamiento de los estantes hasta que los contenidos de todas las cavidades en todas las placas de ensayo se han congelado hasta formar un sólido. Esto debe producirse en menos de 12 hr. Después de la congelación, se evacúa la cámara fría hasta una presión total menor de 100 micrones, después de lo cual se eleva la temperatura en los estantes hasta aproximadamente 10°C y se mantiene esta temperatura hasta que sondas de temperatura provistas en el conjunto indican que la temperatura dentro de las cavidades se encuentra aproximadamente entre 5 y 10°C de la temperatura de los estantes mismos. Se calienta entonces los estantes hasta aproximadamente 30°C y, después de haberse calentado apropiadamente las placas de ensayo, se aumenta la temperatura hasta 40°C y se mantiene así la cámara durante 4 hr. En este punto los contenidos de cada cavidad se han secado completamente,

 Mientras se continúa el uso de técnicas estériles, se coloca tapas de cierre elástico de las cavidades sobre las

cavidades de la placa de ensayo secada y se apila un conjunto de cinco placas de ensayo por razones de conveniencia y se le coloca en una envoltura de material plástico de polietileno. Se coloca un paquete de 5 g de gel de sílice en cada una de las envolturas de material plástico para facilitar el mantenimiento de la sequedad. Se dispone entonces dos de estas envolturas, que contienen 5 placas de ensayo, en una bolsita de hoja externa, siendo dicha envoltura externa de hoja esencialmente impermeable a la humedad y manteniendo la sequedad de las placas de ensayo durante un período prolongado de por lo menos meses y probablemente durante por lo menos varios años, por no decir indefinidamente.

Las placas de ensayo de cultivo tienen una etiqueta sobre cada una de ellas que indica el antibiótico particular y su concentración en cada una de las cavidades, con espacio para datos de identificación en lo que se refiere a fecha, el paciente y las condiciones de ensayo bajo las cuales se emplea la placa de ensayo de cultivo. Se empaqueta una cantidad de envolturas de hojas en un recipiente de transporte, basándose la cantidad en el consumo de los clientes.

Cuando se las ha llenado en esta manera, las cavidades contienen:

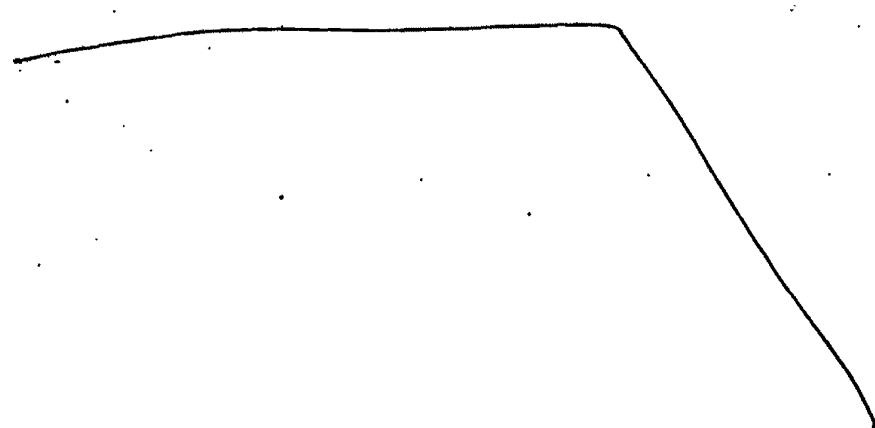


TABLA I

Cavidad N°	Clorhidrato de Tetraciclina		
	1	12,5 µg	+ 10% de exceso + 400 µg de providone
5	2	6,25 µg	" "
	3	3,125 µg	" "
	4	1,56 µg	" "
	5	0,78 µg	" "
	6	0,39 µg	" "
10	7	0,195 µg	" "
	8	0,098 µg	" "
	9	0,049 µg	" "
	10	0,00 µg	" "

Se utiliza convenientemente las placas de ensayo de cultivo para cualquier antibiótico o agente de control terapéutico tal como penicilina, ampicilina, clindamicina, eritromicina, meticilina, tetraciclina, demetilclortetraciclina, 7-dimetilamino-6-demetil-6-deoxitetraciclina, minociclina, cefalotina, gentamicina, colistina, carbenicilina, cloranfenicol, kanamicina y cualquiera de las sulfonamidas.

Se puede utilizar otros antibióticos, ya sea los conocidos o los que todavía quedan por descubrir (si cualquiera de los antibióticos requiere una gama distinta de la indicada, se podrá modificar la concentración), pero con la amplia gama cubierta por las nueve diluciones en las cavidades, se podrá obtener la dosificación apropiada para la mayoría de los antibióticos.

La décima cavidad carece de antibiótico y por lo tanto, si se la inocula con el microorganismo de ensayo, mostrará el crecimiento del microorganismo bajo condiciones no inhibidas; o, si no se la inocula, se la puede usar para comprobar que no están presentes contaminantes.

La cantidad de placas de ensayo de cultivo y la elección de las placas de ensayo de cultivo, cada una con un diferente antibiótico, dependerá de las preferencias del equipo médico que utiliza esta facilidad.

En el momento del uso, se pipeta alícuotas de caldo inoculado con el cultivo bacteriano que debe ser ensayado, en cada cavidad de la placa después de lo cual se incuban las placas durante un tiempo específico a una temperatura indicada. Se lee el ensayo mediante inspección visual para comprobar crecimiento de acuerdo con lo indicado por la turbidez o bien la ausencia de crecimiento, según queda indicado por una suspensión no turbia. Se define el punto final como la cavidad que contiene la concentración más baja de antibiótico sin crecimiento microbiano detectable. La cavidad testigo en cada placa, que carece de agente antimicrobiano, sirve como una medida del crecimiento no inhibido del cultivo bacteriano.

Se observa un crecimiento fácilmente discernible en la mayoría de los casos en 4 a 6 hr para bacterias de crecimiento rápido. Un punto final de Concentración Inhibidora Mínima (CIM), tomado en este momento, ha demostrado ser equivalente a puntos finales tomados después de 18 hr de incubación en ensayos llevados a cabo con microorganismos cuyo crecimiento es rápido. Además, los ensayos llevados a cabo con bacte-

rias que manifiestan un régimen de crecimiento más lento, indican que se puede encontrar CIM preliminares después de 4 a 6 hr de incubación, aunque se debe incubar las placas durante el total de 18 hr para obtener los resultados finales.

5 Se define el punto final como la cavidad que contiene aquella concentración de agente antimicrobiano para la cual no hay crecimiento microbiano detectable visualmente estimado como turbidez confluyente o cantidades razonables de fluculación o racimos de bacterias.

10 Una leve brumosis o una pequeña cantidad de partículas que se observan en el fondo de una cavidad, no constituyen crecimiento.

15 Se obtiene la CIM, en microgramo o unidades por mililitro, multiplicando por 5 el correspondiente valor del contenido impreso adyacentemente a la cavidad que no demuestra crecimiento.

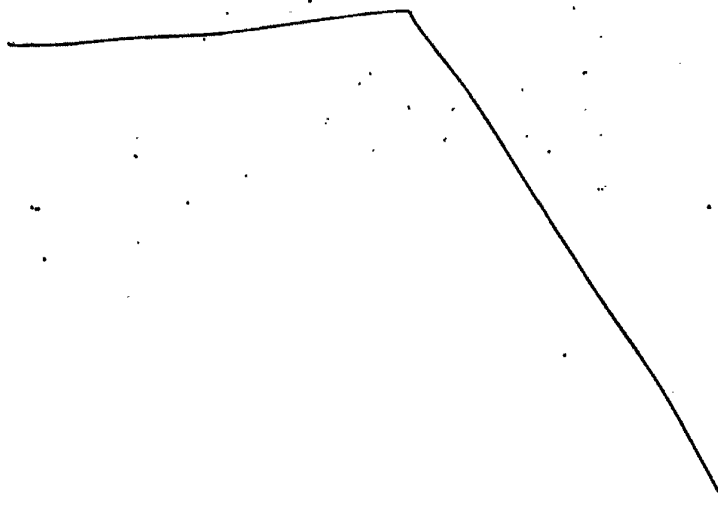
20 El uso de la poli(vinil pirrolidona) de la presente invención permite evitar dos importantes problemas que se encuentran la preparación y el uso de equipos de ensayo de la técnica anterior.

25 En primer lugar, puesto que la cantidad de antibiótico en las cavidades es una cantidad diminuta (microgramo) y está seriamente diluida y secada por congelación en la sucesión de cámaras, resulta difícil determinar visualmente, desde un punto de vista de control de calidad, si una determinada cámara contiene cualquier antibiótico. La adición de la poli(vinil pirrolidona), como agente formador de cuerpo, hace más fácil la detección visual.

En segundo lugar, el uso de la poli(vinil pirrolidona),
juntamente con un antibiótico, produce un tapón de espuma se-
cada por congelación que tiene una consistencia similar a la
del "dulce de algodón", que encaja ajustadamente en la cáma-
5 ra y se adhiere al fondo y los costados de la misma. Esta com-
binación es considerablemente menos probable que se desprenda
de la cavidad durante el cierre y apertura de las placas, y
durante el transporte y almacenamiento.

Se lleva fácilmente a solución acuosa la poli(vinil pi-
10 rrolidona) con el antibiótico y se la inocular luego fácilmen-
te con el caldo nutritivo acuoso. Además, la poli(vinil pirro-
lidona) no reacciona con el antibiótico, ni afecta su poten-
cia, ni las características de crecimiento de organismos pa-
tógenos.

15 Describa suficientemente la naturaleza del invento,
así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse
constar que las disposiciones anteriormente indicadas son sus-
ceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren
su principio fundamental.



REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para ensayar la susceptibilidad de un microorganismo a los antibióticos, mediante una técnica de dilución seriada, caracterizado porque comprende: formar una
5 serie de concentraciones de soluciones en agua de un antibiótico en una concentración uniforme de poli (vinil pirrolidona) como agente formador de cuerpo soluble en agua y portador de retención de antibiótico; introducir cantidades uniformes de dichas series de concentraciones en una serie de cámaras de
10 ensayo; congelar y secar por congelación dicha serie de concentraciones; almacenar hasta el momento del uso; y reconstituir el antibiótico en la poli (vinil pirrolidona) mediante la adición de un medio de cultivo inoculado con un microorganismo de ensayo; incubar; y leer entonces el crecimiento del microor-
15 ganismo de ensayo.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el antibiótico está presente en una serie de diluciones de dos veces que incluye por lo menos parte de la gama de 1 a 10 microgramos/ml.

20 3.- Procedimiento para ensayar la susceptibilidad de un microorganismo a los antibióticos, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria, e ilustrado en los dibujos adjuntos.



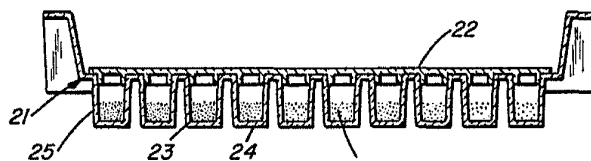


FIG. 1

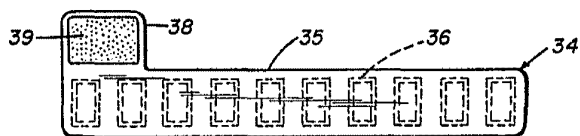


FIG. 2

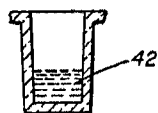


FIG. 3

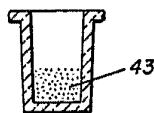


FIG. 4

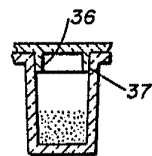


FIG. 5

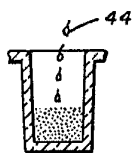


FIG. 6

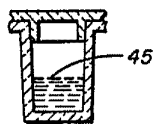


FIG. 7

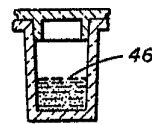


FIG. 8

**ESCALA
VARIADA**

Madrid - 5 ABR 1937

JOSE MIGUEL GOMEZ ACEBO Y POMBO
p. p. Firmado: M. Gómez bravo

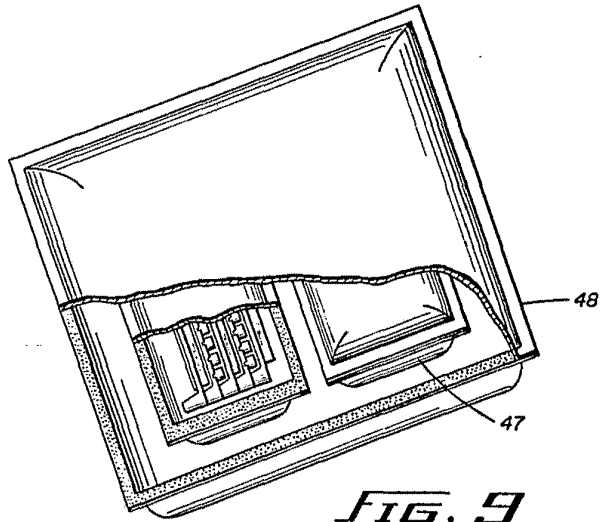


FIG. 9

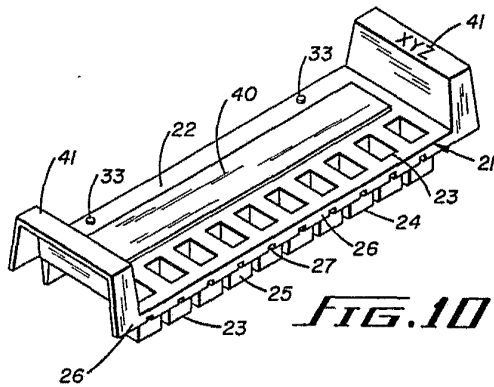


FIG. 10

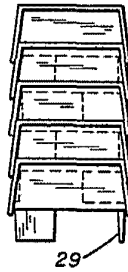


FIG. 13

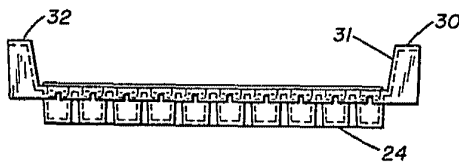


FIG. 11

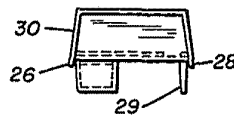


FIG. 12

ESCALA
VARIABLE

Madrid - 5 ABR 1917

JOSE MIGUEL POMBO ACERO Y POMBO
p. p. Ingeniero de la Escala de