

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

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

(19) ES	(11) NUMERO	(10) AT
(21)	466.104	
(22)	FECHA DE PRESENTACION	
	18-1-78	

PATENTE DE INVENCION - 5 DIC. 1978

(30) PRIORIDADES:	(32) FECHA	(33) PAIS
(31) NUMERO		
763.719	28-1-77	EE.UU.
842.736	17-10-77	" "

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	601N	

(64) TITULO DE LA INVENCION

"UN METODO Y UN APARATO FOTOMETRICO PARA IDENTIFICAR CEPAS DE MICROORGANISMOS EN UNA MUESTRA LIQUIDA"

(71) SOLICITANTE (ES)

PFIZER INC. 241428 CASE
5845 A

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

235 East 42nd Street, Nueva York, Nueva York, Estados Unidos de América

(72) INVENTOR (ES)

Alan Clarkson Curtiss, Charles Blake Bidwell, Bruce Henry Sielaff, Julius Praglin, James Edward McKie y David Kenneth Longhenry

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE

D. ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ (P.- 68.001)

El presente invento se refiere a un método para identificar cepas de microorganismos en una muestra líquida, así como a un aparato para llevar a cabo el método.

En la patente estadounidense 3.832,532, y en patentes afines, se describen un método y un aparato para probar la susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos; de acuerdo con el presente invento, el método y el aparato aludidos se adaptan para identificar varias cepas de bacterias determinando los índices de dispersión de la luz (IDL) correspondientes a un grupo especial de compuestos antimicrobianos, que poseen características importantes por lo que se refiere a la identificación de cepas de microorganismos, y analizándolas mediante un método de computación, por ejemplo, una técnica estadística de la función discriminante cuadrática, para identificar los microorganismos a los cuales se aplican los compuestos antimicrobianos. Se ha descubierto que 14 agentes antimicrobianos deparan una identificación segura en extremo, y se considera que el grupo

de agentes de identificación podría reducirse sin sacrificar demasiado la seguridad. De preferencia, los agentes deben ser unos que no se empleen comúnmente con fines terapéuticos para evitar los errores que provienen de cepas que se han vuelto inmunes a varios agentes antibióticos de uso terapéutico. Un grupo de dichos agentes, establecido actualmente, incluye alrededor de 36 miembros (que se describirán más adelante, y de los cuales pueden seleccionarse varios para efectuar una identificación segura mediante técnicas estadísticas).

La idea de utilizar modelos de susceptibilidad antibacteriana o inhibitorios del crecimiento, para identificar bacterias, no es completamente nueva. En 1971, (Gilard, G. L., 1971; Appl. Microbiol. 22:821-823) descubrió que podía aplicarse los perfiles de la susceptibilidad para contribuir a la identificación de bacterias gram-negativas no fermentadoras de la lactosa. Utilizó datos de susceptibilidad relativos a 16 antibióticos, obtenidos por el método de difusión en disco de agar. Sutter y Finegold (Sutter, VL. y S.M. Finegold, 1971; Appl. Microbiol. 21:13-20) emplearon los perfiles de susceptibilidad para distribuir los bacilos anaerobios gram-negativos en cinco grupos diferentes. Luego, fueron necesarias más pruebas para completar la identificación.

Friedman y MacLowry (Friedman, R., y J. MacLowry, 1973; Appl. Microbiol. 26:314-317) utilizaron un modelo matemático Baysean para clasificar bacterias. Sus datos fundamentales abarcaron apuntes de probabilidad relativos a los perfiles de susceptibilidad de 31 especies de bacterias. Dichos datos se reunieron en un período de varios años. Al clasificarse por este método 1,000 ejemplares clínicos, hubo una concordancia del 86% con la identificación lograda mediante los procedimientos bioquímicos comunes.

La patente estadounidense 3.852m532 describe un método y un aparato para probar la susceptibilidad a los antibióticos, junto con una determinación del índice de dispersión de la luz (IDL) de las bacterias sometidas a la prueba. En las siguientes patentes estadounidenses: 3.832,532, 3.895,661, 3.889,011, 3.901,588, 3.934,753, 3.942,899 y Des. 230,587 se describen unos métodos auxiliares y el equipo que se emplean en dichas determinaciones. El equipo que se describe en el sistema antes mencionado combina la velocidad de la automatización con la flexibilidad de los procedimientos manuales. Está construido para determinar la susceptibilidad de una bacteria a un grupo integrado hasta por 12 agentes antimicrobianos simultáneamente. El resultado correspondiente a cada agente antimicrobiano es un

índice de la susceptibilidad que se denomina "índice de dispersión de la luz" (IDL). El índice se extiende de 0.00 (resistente) a 1.00 (susceptible), en incrementos de 0.01. De 3 a 5 horas después de iniciarse la prueba, se dispone de los resultados del experimento, excepto por lo que se refiere a ciertos organismos de crecimiento lento. Un objetivo del presente invento consiste en proporcionar un método, un aparato y agentes de identificación adecuados para identificar bacterias, de acuerdo con una determinación de los valores del IDL de unas soluciones de muestra que reaccionan con los agentes.

Conforme al invento, se suministra un método para identificar cepas de microorganismos en una muestra líquida; dicho método se caracteriza por las etapas que consisten en dividir la muestra en submuestras; inocular simultáneamente cada una de las submuestras con un agente, diferente y especial, inhibidor del crecimiento, cuya reacción con las submuestras presenta características capaces de identificar la cepas de los microorganismos en las submuestras; la mayor parte de los agentes especiales inhibidores del crecimiento no se utilizan comúnmente con fines terapéuticos con respecto al microorganismo; incubar las submuestras por un lapso breve, con el fin de producir diferencias potencialmente

importantes en el crecimiento de cada uno de los microorganismos; descifrar fotométricamente, o de otro modo, el crecimiento de los microorganismos en cada una de las submuestras; completar las lecturas de todas las submuestras en un breve intervalo de tiempo, por lo cual, materialmente se anulan las diferencias en el crecimiento de cada submuestra con relación a las diferencias de tiempo, y comparar las lecturas del crecimiento con una serie de datos de identificación del organismo referentes a los agentes especiales inhibidores del crecimiento, identificándose así las cepas del microorganismo en las submuestras.

Al llevar a cabo el presente invento, se utiliza un número seleccionado, de 10 a 14 por ejemplo, de un grupo de alrededor de 36 agentes especiales inhibidores del crecimiento de los organismos, v.gr.: agentes antimicrobianos (que se describirán en lo sucesivo), para determinar los valores del IDL en soluciones de muestra de bacterias que reaccionan con los agentes. Los datos numéricos del crecimiento, obtenidos al comparar la dispersión de la luz, se analizan, por ejemplo, mediante técnicas auxiliadas por computadora, para identificar las cepas de bacterias. Un método sumamente útil que se utiliza con computadora es la técnica estadística de la función discriminante cuadrática y forma parte de

la modalidad preferida del presente invento, aunque pueden emplearse otros métodos estadísticos, con menores grados de éxito.

Esta metodología se adapta particularmente bien para usarse con el método y el aparato de la patente estadounidense 3.832,532, pero también pueda adaptarse por cualquier persona, bien enterada en la técnica, para aplicarse con cualquier método que sirva para probar la susceptibilidad y que depare una medida razonablemente cuantitativa del crecimiento del organismo en presencia de sustancias inhibitoras.

Probablemente, la metodología que se describe en la patente estadounidense 3.837,746 puede adaptarse también para emplearse con este método en la identificación de bacterias.

Por lo tanto, el invento no se limita al aparato que se describe en las patentes aludidas, sino que puede usarse con cualquier método de verificación capaz de cuantificar el crecimiento bacteriano con respecto a varios agentes inhibitoras. Una modalidad que se prefiere entraña la combinación del método analítico, que se expone adelante, con un sistema de susceptibilidad rápido, como el que se describe en la patente estadounidense 3.832,532. Sin embargo, la aplicación general del concepto del invento no se limita a ninguna metodología parti-

cular, rápida o convencional, para cuantificar la susceptibilidad.

El "IDL" se refiere al índice inhibitorio cuantitativo que produce el sistema Autobac verificador de la susceptibilidad. No obstante, este índice puede ser substituido por cualquier otro índice graduado conveniente del crecimiento cuantitativo, generado por otro sistema verificador, sin perder su aplicabilidad.

Las características y ventajas novedosas del presente invento se harán evidentes a los expertos en la técnica después de leer la siguiente descripción, junto con el dibujo que se acompaña, en el cual, los números de referencia semejantes indican partes semejantes, y en el cual: la figura 1 es un diagrama parcialmente esquemático de un aparato que se asocia para llevar a cabo el método del presente invento, y una parte de él incluye modalidades de aspectos del aparato del presente invento. La figura 2 es una vista tridimensional de una forma de aparato que constituye la consola central de una modalidad del invento.

Como se muestra en la figura 1, el sistema de la técnica anterior 10 para determinar la efectividad respectiva de varios antibióticos diferentes (12 por ejemplo) para inhibir el crecimiento de las bacterias, incluye: una cubeta de plástico desechable 12, en la

1 cual se efectúan las pruebas de susceptibilidad; un sur-
 tidor de discos 14, que sirve para introducir unos dis-
 cos en la cubeta 12; una incubadora-sacudidora 30, pa-
 ra incubar y agitar las cubetas, y un analizador foto-
5 métrico automático de la dispersión de la luz 62, para
 evaluar el crecimiento bacteriano y estampar los resul-
 tados en una forma o cinta preimpresa 22, como se des-
 cribe en detalle en la patente estadounidense 3.832,532.
 Sin embargo, pueden emplearse otros métodos para evaluar
10 el crecimiento, por ejemplo los siguientes: absorbencia
 óptica, cuenta de células, medida de la impedancia, con-
 centración de ATP, elevación o generación de radioisó-
 topos a partir de compuestos irradiados, elevación de
 oxígeno, producción de CO₂, producción de calor y reac-
15 ciones químicas debidas al aprovechamiento metabólico o
 metabolitos de desecho. Si bien, estas metodologías pue-
 den diferir por lo que se refiere a conveniencia y pre-
 cisión, el presente invento muestra que la metodología
 de la identificación es independiente de la metodolo-
20 gía que se utiliza para contar el crecimiento; o deter-
 mina el grado de inhibición, siempre que el método sea
 capaz de obtener un resultado cuantitativo suficiente pa-
 ra aplicarse a la evaluación estadística.

 Antes del procedimiento experimental que se
25 describe con detalle en la presente, se obtiene un

1 ejemplar clínico, se traslada a una caja de Petri 20
y se incuba durante la noche. En seguida, varias colo-
nias de morfología semejante se recogen de la placa por
el bacteriólogo utilizando una malla 24, y se suspenden
5 arremolinándolas en una solución salina contenida en
un tubo 13. En ciertos casos, esta etapa puede omitir-
se, cuando es probable que un solo organismo haya cau-
sado la infección. En dicho caso, el inóculo puede pre-
pararse en una dilución adecuada de sangre centrifuga-
10 da, líquido cerebroespinal u orina filtrada. Si se uti-
liza la forma de normalización con el fotómetro, la sus-
pensión que se encuentra en el tubo se ajusta a una con-
centración bacteriana normal, la cual se comprueba en el
analizador 62, introduciéndola por un orificio de la cu-
15 bierta y se lee en el contador 68. Dos ml. de la suspen-
sión anterior se incorporan a 18 ml. de un caldo eugóni-
co dispuesto en un tubo de ensayo de parte superior ros-
cada 78. El tubo de ensayo 78 se atornilla en una cubeta
de plástico 12, y mediante una sencilla manipulación el
20 contenido del tubo de ensayo se traslada uniformemente
a 13 cámaras de pruebas de la cubeta. Los agentes anti-
microbianos, preferentemente absorbidos en unos discos
de papel, se incorporan entonces a través de los ori-
ficios que se destapan al quitarse el cierre median-
25 te el surtidor de discos 14 y se mantienen suspendidos

1 en el medio de crecimiento en 12 lóbulos desconectados
de las cámaras por medio de unos dedos tubulares de
plástico situados en la parte superior de la cubeta.
La cámara número trece es el control. La cubeta 12 se
5 incuba entonces durante 3 horas en una incubadora-sacu-
didora 30 construida para contener hasta 30 cubetas. Al
concluir las 3 horas, una cubeta 12 se introduce en el
aparato analizador 62, y se evalúa el crecimiento ocu-
rrido en cada cámara. Al comparar con la cámara de con-
10 trol se calcula el efecto inhibitorio respectivo de ca-
da agente antimicrobiano contenido en las cámaras, y se
imprime, según se describe con detalle en la patente es-
tadunidense número 3.832,532.

15 Las partes siguientes se describen en detalle
en la Patente de EE.UU. 3.832.532: tubos de cartucho
39; abrazaderas de fijación 42; palanca 51; estanterías
54; termostato de seguridad 60; botón de control de ve-
locidad 63; botón de control de temperatura 65; medi-
dor 65a; panel de control 66; ranura del impresor 70;
20 alojamiento del instrumento 72; puerta 75; conmutador
de energía 77.

25 En la figura 2 se muestra una consola 62A pa-
ra llevar a la práctica el presente invento, la cual
es semejante al aparato que se describe en la patente
estadunidense 3.832,532, junto con el aparato y con los

1 métodos que se describen en las otras patentes afines aludidas en la presente. La consola 62A tiene las siguientes semejanzas y diferencias con respecto al aparato que se expone en la patente 3.832.532.

5 1. Panel Anterior: el tamaño del panel anterior se extiende por toda la anchura del instrumento, para dejar espacio para el Teclado E y el Exhibidor Numérico D.

10 2. El juego de interruptores, utilizado en un principio para establecer la constante de fondo de la máquina, se sustituyó por una almohadilla de Teclado A.

3. La Ranura Impresora B, el Contador de Inóculos F y el Panel de Control C no experimentaron cambios.

La forma de operación es la siguiente

15 1. Una vez que se ha seleccionado el procedimiento y entrado la constante de fondo, el funcionamiento de la máquina es exactamente igual al que se describe en la patente estadounidense 3.832.532.

20 2. La forma de operación se selecciona oprimiendo los botones apropiados del Teclado E. Por ejemplo, la máquina se instala para efectuar una prueba normal de susceptibilidad oprimiendo sucesivamente los botones que tienen la marca AEROBIC SUSCEPT TEST (Prueba Aerobia de Susceptibilidad). Al oprimirse el botón, la luz indicadora apropiada se enciende para indicar la forma seleccionada para el funcionamiento del aparato. Se inicia una prueba aerobia de identificación, oprimiendo sucesivamente los botones que llevan la marca AEROBIC IDENT TEST.

25 3. El cálculo y la entrada de la constante de

30

fondo se inician indicando la forma de prueba que se desea al oprimir CAL en lugar de TEST. Así pues, para calcular la constante de fondo que se requiere en el presente procedimiento de susceptibilidad, debe oprimirse AEROBIC SUSCEPT CAL. En seguida, el operador coloca dos o más cubetas inoculadas de la manera prescrita, para calibrar. La máquina computa automáticamente el promedio de cámaras correspondiente a cada cubeta, así como el promedio global de todas las cubetas colocadas y exhibe este número en el Exhibidor Digital D. Si este número es satisfactorio para el operador, oprime el botón ENTER del Teclado E, y el número se conserva en la memoria para utilizarse en el procedimiento. Al oprimirse el botón TEST, la máquina vuelve a la forma normal de operación.

Si se requiere una constante de fondo de valor específico, éste puede entrar por conducto de la almohadilla de Teclado A y del botón ENTER del Teclado E.

Cualquier cubeta que tenga más de dos cámaras que difieran del valor promedio computado de dispersión de la luz, en más de una cantidad predeterminada, es rechazada automáticamente y se pide al operador que coloque una cubeta adicional.

4. Los espacios vacíos provistos en el Teclado F permiten incorporar a la máquina hasta 20 procedi-

mientos adicionales, activando los botones en blanco y agregando en el interior un circuito modular de enchufe.

El método del presente invento se lleva a la práctica de la manera siguiente: las cubetas de plástico, que se describen en las patentes estadounidenses 3.895,661 y Des. 230,587, que se guardan en bolsas de plástico, se sacan de sus recipientes. Un cierre plástico, flexible y blanco, se desprende de la parte superior de la cubeta. A continuación, la cubeta se introduce en el surtidor de discos, como se describe en la patente estadounidense 3.899,011, y el surtidor de discos se activa, soltando discos antimicrobianos seleccionados hacia cada una de las cámaras de la cubeta. Sólo un disco se surte a cada cámara, y el material contenido en ese disco se ha seleccionado previamente según la susceptibilidad antimicrobiana o la capacidad para diferenciar las especies de bacterias. En seguida, el cierre de tira blanca vuelve a ponerse sobre la cubeta.

La etapa siguiente consiste en seleccionar una cepa bacteriana de la placa de aislamiento primaria. En un tubo de suero salino tamponado con fosfato se inocula una colonia. En seguida, este tubo salino se introduce en el fotómetro dispersor de la luz, el cual, también en este caso, forma parte del componente básico central del sistema, con el fin de normalizar los inóculos, y la

aguja medidora de la normalización se observa para ver si se ha desviado. Cuando la aguja coincide con la porción central de la medida marcada, es que ha ocurrido la normalización. En seguida, dos ml. del inóculo de la normalización se introducen con pipeta dentro de un tubo que contiene un caldo Eugónico. Mientras la cubeta se mantiene verticalmente, el tubo del caldo Eugónico se atornilla en la cubeta. La cubeta se invierte luego sobre una superficie de nivel, de manera que todo el caldo contenido en el tubo se distribuya a una cámara de retención que está en un extremo de la cubeta. Al efectuarse este procedimiento, la cubeta se sostiene verticalmente sobre el extremo. Se hacen otras dos manipulaciones de la cubeta: 1) para distribuir el caldo uniformemente a lo largo de la cubeta y 2) para suministrar partes alícuotas iguales, de 1-1/2 ml, del caldo al interior de las cámaras individuales de la cubeta, que han sido provistas previamente de los discos antimicrobianos.

En seguida, la cubeta se coloca en la incubadora-sacudidora, y gira a razón de 220 revoluciones por minuto, en un medio ambiente de 36 °, durante tres horas, aproximadamente. Al concluir el período de incubación, la cubeta se pone en una barra o carro de retención del componente fotodispersor de la luz del sistema. La tapa del fotómetro se cierra, se introduce una tarjeta con el

fin de registrar los resultados, y la máquina inicia entonces su computación. En la cámara de control debe obtenerse un crecimiento suficiente, o el fotómetro rechazará automáticamente la prueba. Si ocurre un rechazo, la cubeta regresa al incubador y se incuba por un lapso adicional. Si hay un crecimiento suficiente en la cámara de control, se calcula un índice de dispersión de la luz por medio de una minicomputadora situada dentro de la cubierta del fotómetro. Este índice de dispersión de la luz es un valor numérico comprendido entre 0 y 1 y, basándose en este valor numérico, se hace un cálculo por cada agente antimicrobiano, y se da la interpretación de susceptible, intermedio o resistente.

Como se menciona con anterioridad, los resultados de la prueba de susceptibilidad logrados con este sistema han demostrado que se comparan favorablemente con los del método normalizado de difusión por discos de Kirby-Bauer (Bauer, A. W., W. M. Kirby, J. C. Sherris y M. Turck, 1966; Am. J. Clin. Path. 45:493-496; y National Committee For Clinical Laboratory Standards Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 1974; En A. Balows (ed.), Current Techniques for Antibiotic Susceptibility Testing, Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, p. 138-155, y con la técnica normalizada de dilución de agar, que aparece en el

International Collaborative Study (Ericsson, H., y J.C. Sherris, 1971; Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Suppl. 217).

Sin embargo, este procedimiento no se limita al uso del sistema antes citado, sino que funciona igualmente bien con otros sistemas medidores del crecimiento, siempre que dichos sistemas puedan llegar a cabo una medida antimicrobiana cuantitativa adecuada.

El método de identificación utiliza los resultados de cada agente antimicrobiano experimentado. El índice de dispersión de la luz, que se extiende de -0.5 a 1.5 en incrementos de .01, se utiliza en un procedimiento de análisis multivariado que se denomina Función Discriminante Cuadrática (FDQ). Esta constituye la modalidad preferida, aunque no la única posible, del invento. La FDQ se basa en la suposición de que los miembros de cada uno de los grupos de bacterias tienden a seguir una distribución característica normal con cada uno de los compuestos antimicrobianos experimentados y utilizados en el sistema de análisis (Sielaff, B. H., Johnson, E. A. y Matsen, J. M., 1976; J. Clin. Microbiol. (3: 05-109)). Si sucede que dos grupos de bacterias tienen curvas superpuestas de distribución, se crea entonces, en la región de la superposición, un punto de probabilidad igual. Dicho punto de igual probabilidad puede

utilizarse como una frontera para la clasificación. Si hay una superposición considerable, hasta una técnica computadora complicada no puede separar los grupos de bacterias con una variable. A medida que se agregan variables, aumenta la probabilidad de que los grupos se separen. Si los grupos que van a separarse tienen valores muy diferentes con cada uno de los diversos agentes antimicrobianos, se reducen al mínimo los errores en la clasificación y la identificación es más bien correcta y se logra con facilidad.

Por lo tanto, el objetivo estriba en hallar compuestos que posean la capacidad de discriminar ampliamente, basándose en los valores del índice de dispersión de la luz que se obtienen con cada uno de los agentes antimicrobianos utilizados; o contar cuando menos con un producto antimicrobiano ante el cual ocurra una discriminación precisa. Los esfuerzos iniciales se orientaron sólo al uso de agentes utilizados terapéuticamente en los seres humanos contra los organismos bacterianos. La labor se inició con los organismos gram-negativos, a causa de la mayor dificultad prevista para separar estos organismos en las diversas especies de importancia clínica. Este grupo de organismos incluye géneros difíciles de separarse, v.gr.: Citrobacter, Enterobacter, Escherichia y Klebsiella, así como las cuatro especies

del género Proteus. Los compuestos antimicrobianos empleados en el perfil fueron los siguientes: ampicilina, bacitracina, dos concentraciones de carbenicilina, cefalotina, sulfato de colistina en dos concentraciones, eritromicina, furazolidona, kanamicina, mandelato de metenamina, ácido nalidíxico, neomicina, nitrofurantofna, novobiocina, polimixina B, streptomycina y tetraciclina. Las matrices o datos básicos, que se utilizaron en el programa computador de la función discriminante cuadrática para analizar los resultados de la prueba, se generaron introduciendo en la computadora los valores del índice de dispersión de la luz de organismos conocidos dentro de estos grupos de bacterias.

Utilizando este perfil de 18 agentes, con las pruebas de 481 organismos, se alcanzó una precisión del 97.3% en este perfil.

No obstante, se presentan problemas con respecto al tamaño de este perfil, con relación al número limitado de las especies involucradas en el procedimiento de identificación, y por lo que se refiere al hecho de que siempre hay la preocupación de que pueda ocurrir una resistencia espontánea, en el medio ambiente de un hospital, a los agentes que se emplean terapéuticamente contra los organismos bacterianos que se encuentran en el vecindario de los pacientes humanos, o dentro del

medio ambiente en conjunto como, por ejemplo, en alimentos para animales, en medicina veterinaria, etc.

Así pues, la etapa siguiente del estudio consistió en tratar de disminuir el perfil antimicrobiano, con el fin de reducir el número de variables a un mínimo sin sacrificar el porcentaje de la concordancia. En este esfuerzo particular, se utilizaron varios subgrupos de diferentes tamaños de los 18 agentes antimicrobianos originales. Un grupo particular de 14 agentes antimicrobianos empleó los 481 organismos previamente mencionados. Una pérdida menor del 2% en el porcentaje de la concordancia. Al disminuir el número de las variables a menos de 14, el porcentaje de la concordancia empezó a decaer rápidamente. En cuanto a todos los intentos y propósitos y utilizando este método particular, el subgrupo de 14 agentes antimicrobianos pareció representar al grupo más pequeño que, no obstante, deparó un nivel aceptable de concordancia. Una vez más, en este subgrupo sólo se encuentran agentes que se utilizaron terapéuticamente.

El intento siguiente fue el de formar un repertorio de agentes de acción antimicrobiana, pero que no encajan dentro de la categoría clásica de compuestos antimicrobianos antibióticos o terapéuticos. En esta parte de la investigación, se examinaron mucho más de 600 compuestos, en cuanto a su acción antibacteriana potencial.

En la lista de compuestos que se consideraron se incluyeron varias sustancias químicas de todos los tipos, de las cuales no se ha reportado que presenten ninguna clase de espectro antibacteriano. De los compuestos examinados, alrededor del 15% se seleccionaron para determinar su selectividad diferencial por lo que atañe al espectro antibacteriano; en realidad se seleccionaron 104 compuestos contra 20 especies diferentes, incluyendo a la mayor parte de las Enterobacteriaceae, así como los miembros comúnmente aislados de los grupos gram-negativos no fermentadores. Estos compuestos se experimentaron mediante estudios de la concentración inhibitoria mínima, con el fin de determinar los niveles a los cuales ocurrió la acción antibacteriana en los diversos miembros de cada grupo incluido en la selección. Se llevaron a cabo más de 10,000 grupos de estudios de la concentración inhibitoria mínima. Los compuestos que mostraron capacidad para diferenciar grupos de bacterias se tuvieron en cuenta entonces para practicar un análisis ulterior dentro del sistema computador real.

La etapa inicial emprendida en este sentido consistió en utilizar un número pequeño de estos compuestos, junto con un perfil de los agentes previamente investigados, para probar la capacidad discriminatoria. Se utilizaron doce compuestos en esta porción particular

de la investigación; estos compuestos incluyeron a cuatro compuestos que se emplearon en substitución de agentes antibióticos clásicos. Los cuatro compuestos substituidos fueron los siguientes: verde brillante, corhexidina, cicloserina y trihidroxiacetofenona. Así también se incluyó el madelato de metenamina, que es un agente que no se incluye en los perfiles rutinarios de la susceptibilidad antimicrobiana, pero que en nuestro sistema ha demostrado ser muy valioso en los perfiles de diferenciación. Catorce de los veinte grupos bacterianos originales, con 24 ó 25 ejemplares por grupo, se utilizaron entonces para probar la capacidad para separar estos grupos comúnmente aislados y algo difíciles de separarse. Intencionalmente se incluyeron organismos que plantean problemas en la separación, por ejemplo, los géneros Escherichia, Citrobacter, Enterobacter y Proteus.

Al utilizar el grupo antes expuesto de agentes antimicrobianos contra estos organismos, se obtuvo una precisión de 97.1% por el programa computador, aplicando las normas calculadas. Los resultados más pobres se lograron con la Escherichia coli, pues sólo 20 de las 24 cepas se identificaron correctamente. Tres organismos Citrobacter freundii se identificaron erróneamente, como una cepa de Enterobacter y como dos cepas de Proteus vulgaris. El problema con la Escherichia coli estriba en

separarla del género Shigella. De los compuestos clasificados por nosotros, hay agentes que separan a estos géneros particulares. Si se tiene en cuenta este factor, la precisión que se alcanza dentro de los planes de identificación de estas 14 especies se aproxima más a la proporción de 98 a 99%.

La característica básica de estos estudios reside en determinar la posibilidad de usar el crecimiento bacteriano descifrable en la máquina, ocurra o no en presencia de diversos compuestos químicos, para establecer una perfil de identificación de bacterias. Este objetivo se ha logrado de un modo satisfactorio. En los últimos dos años se ha dedicado un tiempo considerable a la identificación de compuestos que pueden ser útiles, y a crear un programa computador que empleará satisfactoriamente los valores generados por la máquina. Para evitar que el esfuerzo se diluyera en un estudio de posibilidades, fue necesario limitar el número de los grupos sometidos al estudio. Por varias razones, en nuestras investigaciones formales enfocamos el interés hacia las bacterias gram-negativas. En primer lugar, la cepa gram es un método bastante rápido y fácil de llevarse a cabo para diferenciar este grupo de otros grupos de bacterias. En segundo término, los miembros de este grupo son, por lo general, los más difíciles de identificarse en el

laboratorio de microbiología clínica. Oponen el máximo reto al sistema de identificación propuesto. En tercer lugar, las bacterias gram-negativas incluyen a la mayor parte de los organismos identificados corrientemente en el laboratorio de microbiología clínica.

En síntesis, los estudios han demostrado que puede utilizarse un método instrumental automatizado para probar la susceptibilidad antimicrobiana, con el fin de suministrar una identificación de bacterias en el mismo espacio de 3 a 5 horas que se emplea para probar la susceptibilidad. El sistema de identificación utilizó resultados de susceptibilidad antimicrobiana y modelos de crecimiento procedentes de otras sustancias químicas que incluyen a las que favorecen y a las que no favorecen el crecimiento. Se ha ideado un programa computador que analiza estos resultados mediante la técnica estadística de la Función Discriminante Cuadrática. La precisión en la identificación de varios grupos taxonómicos de bacterias es del 95% o más, en comparación con los métodos bioquímicos normales.

La siguiente es una lista de agentes antimicrobianos efectivos, así como de las concentraciones efectivas que pueden utilizarse eficazmente en el método del presente invento.

<u>Compuesto</u>	<u>Masa del Disco</u>	<u>Escala de Concentraciones Efectivas en Microgramos por ml.</u>
Acriflavina	7.5 mcg.	5.0
Acriflavina	30.0 mcg.	20.0
9-Aminoacridina	10.0 mcg.	6.7
Auramina O	160.0 mcg.	106.7
Verde brillante	1.5 mcg.	1.0
Verde brillante	3.0 mcg.	2.0
Verde brillante	5.0 mcg.	3.3
Cetrimida	120.0 mcg.	80.0
Cloruro de cobalto	375.0 mcg.	250.0
Cloruro cúprico	375.0 mcg.	250.0
Cicloserina	120.0 mcg.	80.0
Cicloserina	240.0 mcg.	160.0
Acido 3,5-Bibromo-salicílico	750.0 mcg.	500.0
HCl de dodecilamina	18.75 mcg.	12.5
HCl de dodecilamina	75.0 mcg.	50.0
5-Fluorouracil	8.0 mcg.	5.3
Floxuridina	9.0 mcg.	6.0
Floxuridina	36.0 mcg.	24.0
Verde Malaquita	3.0 mcg.	2.0
Azul de metileno	255.0 mcg.	170.0
Bisulfuro de omadina	5.5 mcg.	3.7
Omadina sódica	7.5 mcg.	5.0

<u>Compuesto</u>	<u>Masa del Disco</u>	<u>Escala de Concentraciones Efectivas en Microgramos por ml.</u>
Azida sódica	75.0 mcg.	50.0
Acetato talioso	150.0 mcg.	100.0
2',3',4'-Trihidroxi-acetofenona	375.0 mcg.	250
Bacitracina	18.0 unidades	12.0 unidad/ml
Carbenicilina	50.0 mcg.	33.3
Cefalotina	15.0 mcg.	10.0
Colistina	13.0 mcg.	8.7
Kanamicina	5.0 mcg.	3.3
Mandelato de metenamina	1.0 mg.	667.0
Acido malidíxico	5.0 mcg.	3.3
Nitrofurantofna	15.0 mcg.	10.0
Novobiocina	30.0 mcg.	20.0
Polimixina B	50.0 unidades	33.3 unidades/ml
Tetraciclina	0.5 mcg.	0.3

Técnica Estadística Utilizada para la Identificación

La identificación se logra, de preferencia, mediante una técnica estadística multivariada que se conoce como función discriminante cuadrática. La función discriminante cuadrática se basa en el modelo multivariado normal. Dos distribuciones normales multivariadas, adyacentes y que se intersectan, tienen un punto de

igual probabilidad en la región de la superposición. Este punto de igual probabilidad puede usarse como una frontera para la clasificación. Para clasificar a una entidad, basta con determinar en cuál lado de la frontera se ubica la entidad. Esta frontera de equi-probabilidad reduce al mínimo los errores en la clasificación, suponiendo que el tamaño de ambas poblaciones sea aproximadamente igual. Si las dos poblaciones son de un tamaño sumamente diferente, la proporción de cada población clasificada erróneamente se reduce al mínimo, pero esto no ocurre con el número total de clasificaciones equivocadas. Al efecto, tendrá que hacerse un ajuste en cuanto a la diferencia en el tamaño de las poblaciones.

El procedimiento se inicia computando las matrices covariantes de los diferentes grupos. La fórmula para calcular los elementos de la matriz covariante es la fórmula normal de covarianza, como sigue:

$$S_{x_i x_j} = \frac{\sum_{k=1}^n x_{ik} x_{jk} - \sum_{k=1}^n x_{ik} \sum_{k=1}^n x_{jk}}{n^2 - n} \quad (1)$$

en la cual: $S_{x_i x_j}$ es la covarianza que hay entre las variables x_i y x_j (cuando $i = j$, la fórmula se reduce a la de la varianza de las variable x_i), y n es el número de

observaciones practicadas en las variables x_1 y x_j (este número es igual tanto para x_1 como para x_j ; representa el número de entidades que aparece en el grupo de datos). Estas matrices contienen las varianzas y las covarianzas correspondientes a las diferentes variables que hay en cada grupo.

También se calculan los vectores medios para cada grupo. Contienen el valor o, mejor dicho, los valores medios para las diferentes variables de cada grupo. Si el grupo de variables utilizado para la clasificación cambia, debe construirse entonces un nuevo juego de matrices. Estas matrices se construyen utilizando sólo los valores del índice de dispersión de la luz que corresponden a las variables del nuevo grupo.

Para clasificar una entidad en uno de los grupos NG, se calcula para cada grupo la siguiente función:

$$f(x)_i = p_i (2\pi)^{-\frac{NV}{2}} |S_i|^{-1/2} e^{-\frac{q_i}{2}} \quad (2)$$

en la cual: p_i puede ser la proporción de la muestra en el grupo i , o la probabilidad anterior del grupo i ; NV es el número de variables; $|S_i|$ es la determinante de la matriz de covarianza para el grupo i ; $q_i = (X - x_1)' S_i^{-1} (X - x_1)$, en donde: X es el vector de los valores

del índice de dispersión de la luz para el organismo que va a clasificarse; X_i es el vector medio para el grupo i^{th} ; ' significa la transposición de la matriz, y S_i^{-1} es la inversa de la matriz de covarianza para el grupo i^{th} . Puede observarse que la ecuación 2 sin la P_i es precisamente la función de la densidad de probabilidades para el modelo normal multivariado.

Cuando lo anterior se ha computado para todos los grupos, el grupo que presenta el máximo valor de $f(X)$ se selecciona como grupo de identificación del organismo desconocido. En la práctica real, en virtud de que la magnitud relativa, que se emplea para hacer comparaciones entre los grupos, es más importante que el valor real, el factor constante que incluye π se elimina de los cálculos.

En el verdadero medio ambiente universal, no son normales la mayor parte de las distribuciones multivariadas. Por fortuna, es muy sólido el procedimiento referente a la función discriminante cuadrática. Normas de clasificación muy buenas pueden producirse para poblaciones que están muy fuera de lo normal. En cuanto a una descripción más amplia de la normalidad multivariada y de las funciones discriminantes cuadráticas, véase Anderson (Anderson, T. W., 1958; John Wiley and Sons, Inc., Nueva York); Grams y colaboradores (Grams, R. R.,

E. A. Johnson y E. S. Benson, 1972, Am. J. Clin. Pathol. 58:188-200; y Grams, R. R., E. A. Johnson y E. S. Benson, 1972, Am. J. Clin. Pathol. 58:201-207) y Michaelis (Michaelis, J., 1973, Academic Press, Inc., Nueva York).

Resultados

Se investigó un total de 31 agentes antimicrobianos. Como se usaron múltiples concentraciones de ciertos agentes, se examinó un total de 48 variables posibles (Tabla I) en el curso de estos estudios. Muchas de estas variables se eliminaron pues no aportaron ningún informe útil para la diferenciación. La mayor parte de las cepas de todos los grupos fueron totalmente susceptibles o totalmente resistentes al agente antimicrobiano, a dicha concentración. Otras variables depararon una información redundante (la misma información que otra variable) y, por lo tanto, pudieron ser eliminadas. La Tabla 2 muestra el subgrupo del grupo total de variables que demostró ser el más prometedor.

Los agentes antimicrobianos se experimentaron contra una muestra de 481 ejemplares bacterianos. La composición de esta muestra aparece en la Tabla 3. Estos resultados se utilizaron para construir las matrices que se usaron para la clasificación. Cuando los 481 ejemplares que se listan en la Tabla 3 se clasificaron de

acuerdo con los 18 agentes antimicrobianos que aparecen en la Tabla 2, hubo una concordancia mayor del 97% con la identificación a la cual se llegó por el laboratorio clínico mediante procedimientos comunes de identificación. En la Tabla 4 pueden verse estos resultados. Casi el 80% de los desacuerdos radicó en organismos que se identificaron como Citrobacter o Enterobacter por el laboratorio clínico, y en algo más por el perfil de la susceptibilidad. De manera consistente se encontró que estos dos géneros eran los más difíciles de identificarse.

TABLA 1 - Antibióticos Investigados

Agente	Masa del Disco (µg)	Agente	Masa del Disco (µg)
Ampicilina	3.6	Eritromicina	2.5
Bacitracina	18.0*	Eritromicina	15.0
Carbenicilina	50.0	Furizolidona	100.0
Carbenicilina	120.0	Gentamicina	9.0
Cefalotina	15.0	Kanamicina	5.0
Cloramfenicol	5.0	Kanamicina	18.0
Clindamicina	2.0	Lincomicina	2.0
Cloxacilina	1.0	Mandelato de metenamina	1.0 ^o
Colistina	2.0	Metaciclina	30.0
Colistina	13.0	Meticilina	5.0
Doxiciclina	0.5	Nafcilina	1.0
Doxiciclina	1.6	Acido nalidixico	5.0

TABLA 1 (Cont.)

Agente	Masa del Disco (µg)	Agente	Masa del Disco (µg)
Acido nalidixico	15.0	Polimixina B	50.0*
Neomicina	5.0	Polimixina B	300.0*
Neomicina	20.0	Estreptomicina	2.0
Nitrofurantoina	15.0	Estreptomicina	10.0
Novobiocina	5.0	Estreptomicina	20.0
Novobiocina	30.0	Tetraciclina	0.5
Oleandomicina	6.0	Tetraciclina	1.5
Oleandomicina	15.0	Trimetoprim/sulfametoxazol	1.25 23.75
Penicilina G	0.2*	Vancomicina	10.0
Penicilina G	2.0	Vancomicina	30.0
Penicilina G	10.0*	Viomicina	2.0
Polimixina B	12.5*	Viomicina	10.0

* Masa medida en unidades.

⊙ Masa medida en miligramos.

TABLA 2 - SUBGRUPO DE ANTIBIOTICOS

Agente	Masa del Disco (µg)	Agente	Masa del Disco (µg)
Ampicilina	3.6	Kanamicina	5.0
Bacitracina	18.0*	Mandelato de metenamina	1.0 ^o
Carbenicilina	50.0	Acido nalidixico	5.0
Carbenicilina	120.0	Neomicina	5.0
Cefalotina	15.0	Nitrofurantofina	15.0
Colistina	2.0	Novobiocina	30.0
Colistina	13.0	Polimixina B	50.0*
Eritromicina	15.0	Estreptomicina	10.0
Furizolidona	100.0	Tetraciclina	0.5

* Masa medida en unidades.

^o Masa medida en miligramos.

TABLA 3 - Composición de la Muestra

Organismo	No. de Organismos
Citrob ^o	50
Enterob	48
Ecoli	75
Herel	35
Kleb	59
Protmir	49

TABLA 3 (Cont.)

Organismo	No. de Organismos
Prototh	51
<i>P. morganii</i>	(19) ^o
<i>P. rettgeri</i>	(17)
<i>P. vulgaris</i>	(15)
Pseudo	62
<i>P. aeruginosa</i>	(35)
<i>P. fluorescens</i>	(15)
<i>P. maltophilia</i>	(12)
Serrat	52

^o Citrob, Citrobacter; Enterob, Enterobacter; Ecoli, Escherichia coli; Herel, Herellon; Kleb, Klebsiella; Protmir, Proteus mirabilis; Prototh, Proteus positivo al indol; Pseudo, Pseudomonas; Serrat, Serratia.

^o Los números que están entre paréntesis no se incluyen en los totales de los organismos experimentados.

TABLA 4 - Afiliación del Grupo por el perfil de la susceptibilidad y por procedimientos convencionales - 18 variables*

Afiliación del Grupo por el Perfil de la Susceptibilidad

Afiliación del Grupo por Procedimientos Convencionales	Citrob	Enterob	Ecol	Herel	Kleb	Protmir	Prototh	Pseudo	Serrat
Citrob	45	2	2	0	1	0	0	0	0
Enterob	4	43	1	0	0	0	0	0	0
Ecol	0	1	73	0	0	0	0	0	1
Herel	0	0	0	35	0	0	0	0	0
Kleb	0	0	0	0	59	0	0	0	0
Protmir	0	0	0	0	0	51	0	0	0
Prototh	0	0	0	0	0	1	48	0	0
Pseudo	0	0	0	0	0	0	0	62	0
Serrat	0	0	0	0	0	0	0	0	52

* Véase la Tabla 2 - El porcentaje de la concordancia entre el perfil de la susceptibilidad y los procedimientos convencionales fue de 97.3%.

° Para abreviaturas, véase la Tabla 3.

TABLA 5 - Afiliación del Grupo por el Perfil de la Susceptibilidad y por Procedimientos Convencionales - 14 Variables*

Afiliación del Grupo por el Perfil de la Susceptibilidad

Afiliación del Grupo por Procedimientos Convencionales	Citrob	Enterob	Ecoli	Herei	Kleb	Protmer	Prototh	Pseudo	Serrat
Citrob	42	4	2	0	1	0	1	0	0
Enterob	2	44	2	0	0	0	0	0	0
Ecoli	1	1	72	0	0	0	0	0	0
Herei	0	0	0	35	0	0	0	0	0
Kleb	0	1	1	0	57	0	0	0	0
Protmer	0	0	0	0	0	51	0	0	0
Prototh	0	0	0	0	0	1	45	0	0
Pseudo	0	0	0	0	1	0	0	61	0
Serrat	0	1	0	0	0	0	1	0	50

* Variables incluidas: ampicilina, bacitracina, carbenicilina 50 y 120, cefafotina, colistina 2 y 13, eritromicina 15, kanamicina 5, mandelato de metenamina, neomicina 5, nitrofurantofna, novobiocina 30 y tetraciclina 0.5. El porcentaje de concordancia con los procedimientos convencionales fue de 95.6%.

© En cuanto a las abreviaturas, véase la Tabla 3.

Sumario

Este estudio se emprendió para determinar la posibilidad de utilizar los perfiles de susceptibilidad para identificar bacterias. Dentro del alcance del estudio, este objetivo se alcanzó de modo satisfactorio; se demostró la posibilidad de este método. Para evitar que el esfuerzo se diluyera en un estudio de posibilidades, fue necesario limitar el número de los grupos estudiados. Por varias razones, el interés se enfocó hacia las bacterias gram-negativas. En primer lugar, en virtud de que la cepa Gram funciona con bastante rapidez y facilidad, la diferenciación de este grupo puede lograrse con relativa comodidad. En segundo término, como los miembros de este grupo son generalmente los más difíciles de identificarse, deparar la prueba máxima para el sistema de identificación propuesto. Por último, las bacterias gram-negativas abarcan la enorme mayoría de los organismos que ordinariamente se identifican en el laboratorio clínico de microbiología.

Como sucede con la mayoría de los estudios basados en posibilidades, en el curso del estudio surgieron cuestiones, la principal referente a la alteración del perfil de la susceptibilidad debida a una resistencia adquirida. Este problema no se encontró durante el estudio; no obstante, subsiste el espectro de las iden-

tificaciones erróneas debidas a esta causa. La resistencia adquirida ocurre porque se seleccionan mutantes resistentes mediante el uso extendido de un agente antimicrobiano. Esta resistencia puede transferirse después a través de r factores.

El alcance del presente sistema de identificación puede ensancharse incorporando más grupos de bacterias. Por ejemplo, pueden agregarse géneros gram-negativos adicionales, así como géneros gram positivos. También sería valioso si pudiera lograrse dentro de los géneros una mayor catalogación de especies; estas son áreas que requieren de una investigación adicional. La investigación sigue avanzando en nuestros laboratorios para orientarse hacia los puntos antes mencionados. Un gran número de compuestos químicos no antibióticos se examinan ahora en cuanto a su capacidad para diferenciar grupos de bacterias mediante una inhibición diferencial del crecimiento. Una de las normas para establecer la selección estriba en que el compuesto no se emplee comúnmente en la determinación clínica, para reducir al mínimo la posibilidad de que se presente una resistencia adquirida. Si las bacterias no encuentran normalmente a un agente en su medio ambiente, la resistencia adquirida no representará un problema. Asimismo, hemos superado el doble del número de grupos bacterianos en estudio, tanto

1 por la adición de géneros como por el aumento en la cata-
logación de especies.

 En suma, este estudio ha demostrado que la iden-
tificación de bacterias, usando su susceptibilidad respec-
5 tiva a varios agentes antimicrobianos, es un método prac-
ticable.

 La consola de instrumento 10 se ha modelado para
facilitar el contacto superficial con la computadora. Dis-
ponible como una opción que se instala en una fábrica o en
10 el campo, se encuentra un equipo de contacto superficial
con la computadora que permite que el instrumento se co-
necte a un sistema computador, el cual contiene la serie
de datos de identificación de las bacterias y otros datos
útiles, y realiza la identificación mediante los análisis
15 estadísticos antes mencionados de los datos de entrada
medidos por el fotómetro.

 La operación de la superficie de contacto super-
ficial es automática. El operador inicia simplemente un
ensayo del modo normal y la información sobre los resul-
20 tados de ensayo se imprime simultáneamente sobre la car-
tulina y es entrada en la computadora del usuario. La su-
perficie de contacto de la computadora también da al usua-
rio la flexibilidad de eliminar los resultados impresos
sobre la cartulina y mantener el instrumento en una cáma-
ra de ensayo específica hasta que la computadora exterior
25 complete el manejo de los datos.

1

REIVINDICACIONES

5

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

10

15

20

25

1. Un método para identificar cepas de microorganismos en una muestra líquida, caracterizado por las etapas que consisten en: dividir la muestra en sub-muestras; inocular simultáneamente cada una de las sub-muestras con un agente diferente y especial inhibidor del crecimiento, cuya reacción con las sub-muestras tiene características capaces de identificar la cepa de los microorganismos contenidos en las sub-muestras; la mayor parte de los agentes especiales inhibidores del crecimiento no se utilizan comúnmente con fines terapéuticos relativos a los microorganismos; incubar las sub-muestras por un lapso breve para producir diferencias potencialmente importantes en el crecimiento de los microorganismos contenidos en cada una de ellas; descifrar fotométricamente, o descifrar de otro modo, el crecimiento de los microorganismos que se encuentran en cada una de las sub-muestras; completar las lecturas de todas las sub-muestras en un breve intervalo de tiempo, por lo cual, se anulan materialmente las diferencias de crecimiento en cada una de

las sub-muestras con relación a las diferencias de tiempo; y comparar las lecturas del crecimiento con una serie de datos identificadores de organismos que se refieren a los agentes especiales inhibidores del crecimiento, mediante lo cual se identifican las cepas de los microorganismos contenidos en las sub-muestras.

2. Un método como el que se describe en la cláusula 1, caracterizado por el hecho de que las sub-muestras inoculadas se agitan para obtener una suspensión uniforme de los microorganismos desarrollados en ellas.

3. Un método como el que se describe en las cláusulas 1 ó 2, caracterizado por el hecho de que las lecturas se obtienen fotométricamente.

4. Un método como el que se describe en cualquiera de las cláusulas 1 a 3, caracterizado por el hecho de que aproximadamente se utilizan 12 sub-muestras y agentes especiales inhibidores del crecimiento.

5. Un método como el que se describe en cualquiera de las cláusulas 1 a 4, caracterizado por el hecho de que la comparación se logra por medio de un método estadístico.

6. Un método como el que se describe en cualquiera de las cláusulas 1 a 5, caracterizado por el hecho de que la comparación se obtiene utilizando una

computadora.

7. Un método como el que se describe en la cláusula 5, caracterizado por el hecho de que la computadora efectúa la comparación aplicando una técnica estadística de la función discriminante cuadrática.

8. Un método como el que se describe en cualquiera de las cláusulas 1 a 7, caracterizado porque, además de las sub-muestras inoculadas, se prepara una sub-muestra de control desprovista de agente inhibidor del crecimiento; se lee y se incuba la sub-muestra de control con las sub-muestras inoculadas; se computa la relación que hay entre las lecturas de las sub-muestras inoculadas con la sub-muestra de control, para determinar las diferencias relativas entre la acción de cada uno de los agentes inhibidores del crecimiento sobre el crecimiento que se registrada en cada una de las sub-muestras, y se comparan los índices de crecimiento computados con la serie de datos identificadores de microorganismos, para identificar las cepas de los microorganismos que se encuentran en las sub-muestras.

9. Un método como el que se describe en cualquiera de las cláusulas 1 a 8, caracterizado por el hecho de que los agentes especiales inhibidores del crecimiento se seleccionan de entre los siguientes: Acriflavina, 9-Aminoacridina, Auramina O, Verde Brillante,

Cetrimida, Cloruro de Cobalto, Cloruro Cúprico, Ciclose-
rina, Acido 3,5-Dibromosalicílico, HCl de Dodecilamina,
5-Fluorouracil, Floxuridina, Verde Malaquita, Azul de
Metileno, Bisulfuro de Omadina, Omadina Sódica, Agida
Sódica, Acetato Talioso, 2',3',4'-Trihidroxiacetofenona,
Bacitracina, Carbenicilina, Cefalotina, Colistina, Kana-
micina, Mandelato de Metanamina, Acido Nalidíxico, Nitro-
furantofna, Novobiocina, Polimixina B, Tetraciclina.

10. Un método como el que se describe en la
cláusula 9, caracterizado por el hecho de que las canti-
dades que se utilizan preferentemente de cada uno de los
agentes inhibidores del crecimiento son las siguientes:
Acriflavina, 7.5 mcg/disco; 5.0 mcg/ml; Acriflavina, 30.0
mcg/disco, 20.0 mcg/ml; 9-Aminoacridina, 10.0 mcg/disco,
6.7 mcg/ml; Auramina O, 160.0 mcg/disco, 106.7 mcg/ml;
Verde Brillante, 1.5 mcg/disco, 10.mcg/ml; Verde Brillan-
te, 3.0 mcg/disco, 2.0 mcg/ml; Verde Brillante, 5.0
mcg/disco, 3.3 mcg/ml; Cetrimida, 120.0 mcg/disco, 80.0
mcg/ml; Cloruro de Cobalto, 375.0 mcg/disco, 250.0
mcg/ml; Cloruro Cúprico, 375.0 mcg/disco, 250.0 mcg/ml;
Cicloserina, 120.0 mcg/disco, 80.0 mcg/ml; Cicloserina,
240.0 mcg/disco, 160.0 mcg/ml; Acido 3,5-Dibromosalicí-
lico, 750.0 mcg/disco, 500 mcg/ml; Dodecilamina HCl,
18.75 mcg/disco, 12.5 mcg/ml; Dodecilamina HCl, 75.0 mcg/

disco, 50.0 mcg/ml; 5-Fluorouracil, 8.0 mcg/disco, 5.3 mcg/ml; Floxuridina, 9.0 mcg/disco, 6.0 mcg/ml; Floxuridina, 36.0 mcg/disco, 24.0 mcg/ml; Verde Malaquita, 3.0 mcg/disco, 2.0 mcg/ml; Azul de Metileno, 255.0 mcg/disco, 170.0 mcg/ml; Bisulfuro de Omadina, 5.5 mcg/disco, 3.7 mcg/ml; Omadina Sódica, 7.5 mcg/disco, 5.0 mcg/ml; Azida Sódica, 75.0 mcg/disco, 50.0 mcg/ml; Acetato Tallioso, 150.0 mcg/disco, 100.0 mcg/ml; 2',3',4'-Trihidroxil-acetofenona, 375.0 mcg/disco, 250.0 mcg/ml; Bacitracina, 18.0 unidades/disco, 12.0 unidades/ml; Carbenicilina, 50.0 mcg/disco, 33.3 mcg/ml; Cefalotina, 15.0 mcg/disco, 10.0 mcg/ml; Colistina, 13.0 mcg/disco, 8.7 mcg/ml; Kanamicina, 5.0 mcg/disco, 3.3 mcg/ml; Mandelato de Metenamina, 1.0 mg/disco, 667.0 mcg/ml; Acido Nalidixico, 6.0 mcg/disco, 4.0 mcg/ml; Nitrofurantoina, 15.0 mcg/disco, 10.0 mcg/ml; Novobiocina, 30.0 mcg/disco, 20.0 mcg/ml; Olimixina B, 50.0 unidades/disco, 33.3 unidades/ml; Tetraciclina, 0.5 mcg/disco, 0.3 mcg/ml.

11. Un método como el que se describe en la cláusula 9, caracterizado por el hecho de que los agentes inhibidores del crecimiento son los siguientes: Acriflavina, Auramina O, Verde Brillante, Carbenicilina, Cefalotina, Cloruro de Cobalto, Cicloserina, Acido 3,5-Dibromosalicílico, Clorhidrato de Dodecilamina, 5-Fluorouracil, Verde Malaquita, Azul de Metileno, Azida Sódica,

Acetato Talioso.

12. Un método como el que se describe en la cláusula 11, caracterizado por el hecho de que las cantidades de los agentes inhibidores del crecimiento son, aproximadamente, las siguientes: Acriflavina (30 mcg/disco, 20.0 mcg/ml); Auramina O (160 mcg/disco, 106.7 mcg/ml), Verde Brillante (3.0 mcg/disco, 2.0 mcg/ml), Carbenicilina (50 mcg/disco, 3.3 mcg/ml), Cefalotina (15 mcg/disco, 10.0 mcg/ml), Cloruro de Cobalto (375 mcg/disco, 250.0 mcg/ml), Cicloserina (120 mcg/disco, 80.0 mcg/ml), Acido 3,5-Dibromosalicílico (750 mcg/disco, 500.0 mcg/ml), Clorhidrato de Dodecilamina (18.75 mcg/disco, 12.5 mcg/ml), 5-Fluorouracil (8 mcg/disco, 5.3 mcg/ml), Verde Malaquita (3 mcg/disco, 2.0 mcg/ml), Azul de Metileno (255 mcg/disco, 170.0 mcg/ml), Azida Sódica (75 mcg/disco, 50.0 mcg/ml), Acetato Talioso (150 mcg/disco, 100 mcg/ml).

13. Un aparato fotométrico para llevar a cabo el método que se describe en la cláusula 1; dicho aparato comprende: una fuente de luz; un carro adyacente a la fuente de luz; un recipiente desmontable, transparente y dividido en compartimientos, que tiene una diversidad de cámaras para contener a cada una de las soluciones de muestra; el carro se construye y dispone de manera de sostener y mover el recipiente dividido en compartimientos

alrededor de la fuente de luz siguiendo un trayecto de recorrido; cada una de las cámaras tiene una pared que es ópticamente transparente en un ángulo agudo predeterminado, a la fuente de luz y a la dispersión de la luz hacia adelante producida en la solución que está en la cámara por la fuente luminosa; un dispositivo marcador rápido, situado en el carro, para colocar sucesivamente cada cámara en una posición predeterminada por un lapso breve, quedando cada pared de la cámara en el ángulo agudo predeterminado en frente de la fuente de luz, por lo cual se obtienen lecturas de la dispersión de la luz en el ángulo agudo predeterminado, y por lo cual se anulan las diferencias en las lecturas con respecto al tiempo; y un medidor de la luz dispuesto en sentido opuesto a la fuente luminosa, a partir de la posición predeterminada, y separado de ella en el lado opuesto al trayecto de recorrido del recipiente dividido en compartimientos; el medidor de la luz se coloca en el ángulo agudo predeterminado con respecto al haz de la fuente luminosa que atraviesa las cámaras, por lo cual descifra la cantidad de luz dispersada por cada una de las muestras situadas en el ángulo agudo predeterminado durante el lapso breve; dicho aparato se caracteriza por el hecho de que el medidor de la luz se conecta con un dispositivo calculador, el cual calcula las respectivas características dispersoras de la luz de

las soluciones contenidas en cada cámara durante el lapso breve, estableciéndose así las características inhibitorias de los agentes especiales inhibidores del crecimiento; el dispositivo calculador se conecta, mediante un dispositivo de contacto superficial con una computadora, a una computadora que tiene una serie de datos para identificar las cepas de microorganismos mediante una determinación del efecto inhibitorio de los agentes especiales inhibidores del crecimiento sobre el crecimiento de los microorganismos contenidos en las sub-muestras.

14. Un aparato como el que se describe en la cláusula 13, caracterizado por el hecho de que el medidor de la luz y el dispositivo computador son adaptables para descifrar alternativamente una comparación de las características inhibitorias de los agentes inhibidores del crecimiento, con el fin de determinar lo que sea mejor para tratar el microorganismo, y la identificar la cepa del microorganismo que está en las muestras.

15. Un aparato como el que se describe en las cláusulas 13 ó 14, caracterizado por el hecho de que los agentes especiales inhibidores del crecimiento se depositan previamente en las cámaras del recipiente dividido en compartimientos.

16.- Un método y un aparato fotométrico para identifi
car cepas de microorganismos en una muestra líquida.

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

Esta Memoria consta de cuarenta y siete hojas escri-
tas a máquina por una sola cara.

Madrid, 11.OCT.1978

P.A.

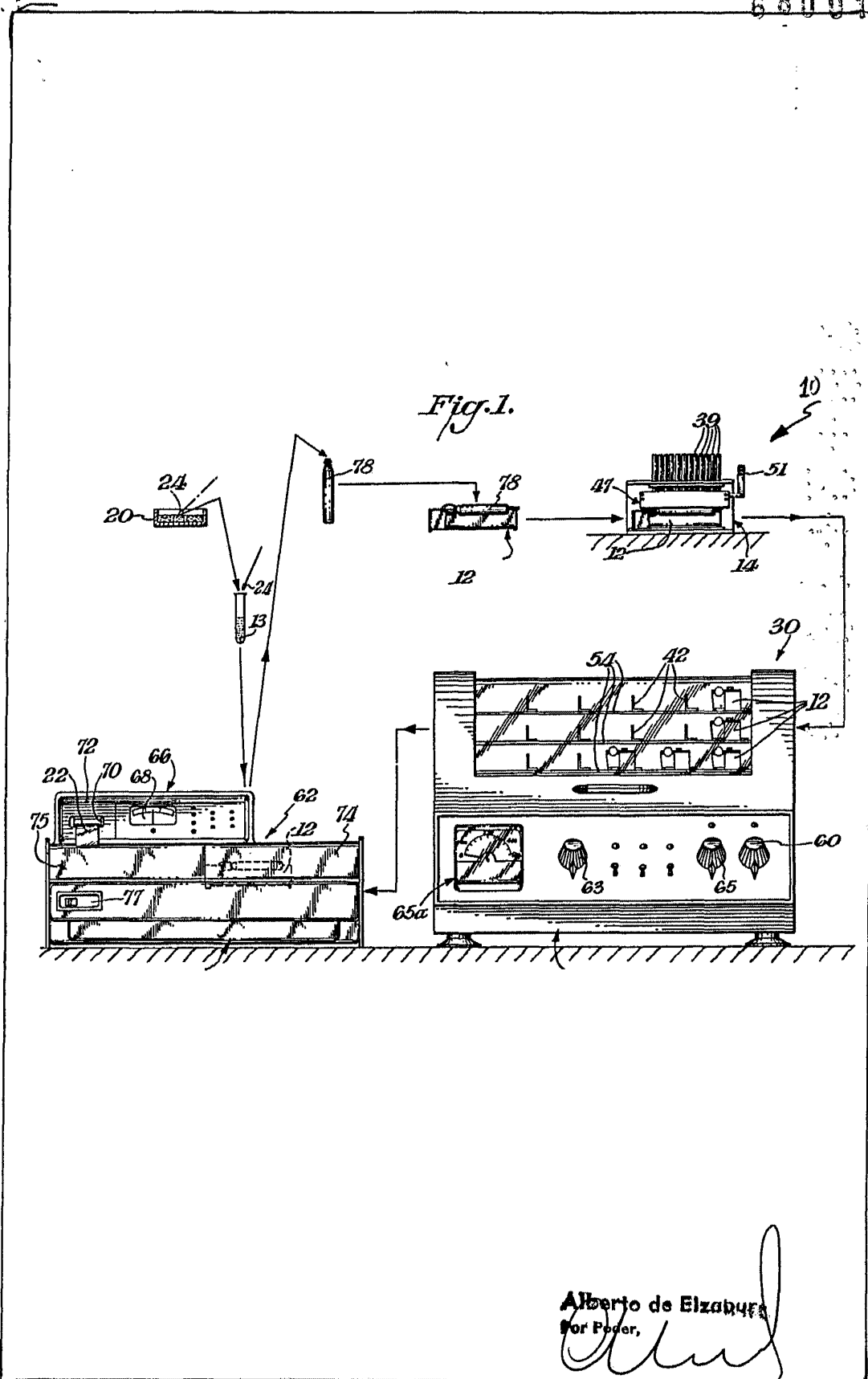
Alberto de Elizaburu
Por Poder.



SPAIN

PFIZER INC.

I/II 68091



Alberto de Elzabur
for Pfizer,

SPAIN

PFIZER INC

II/II

68001

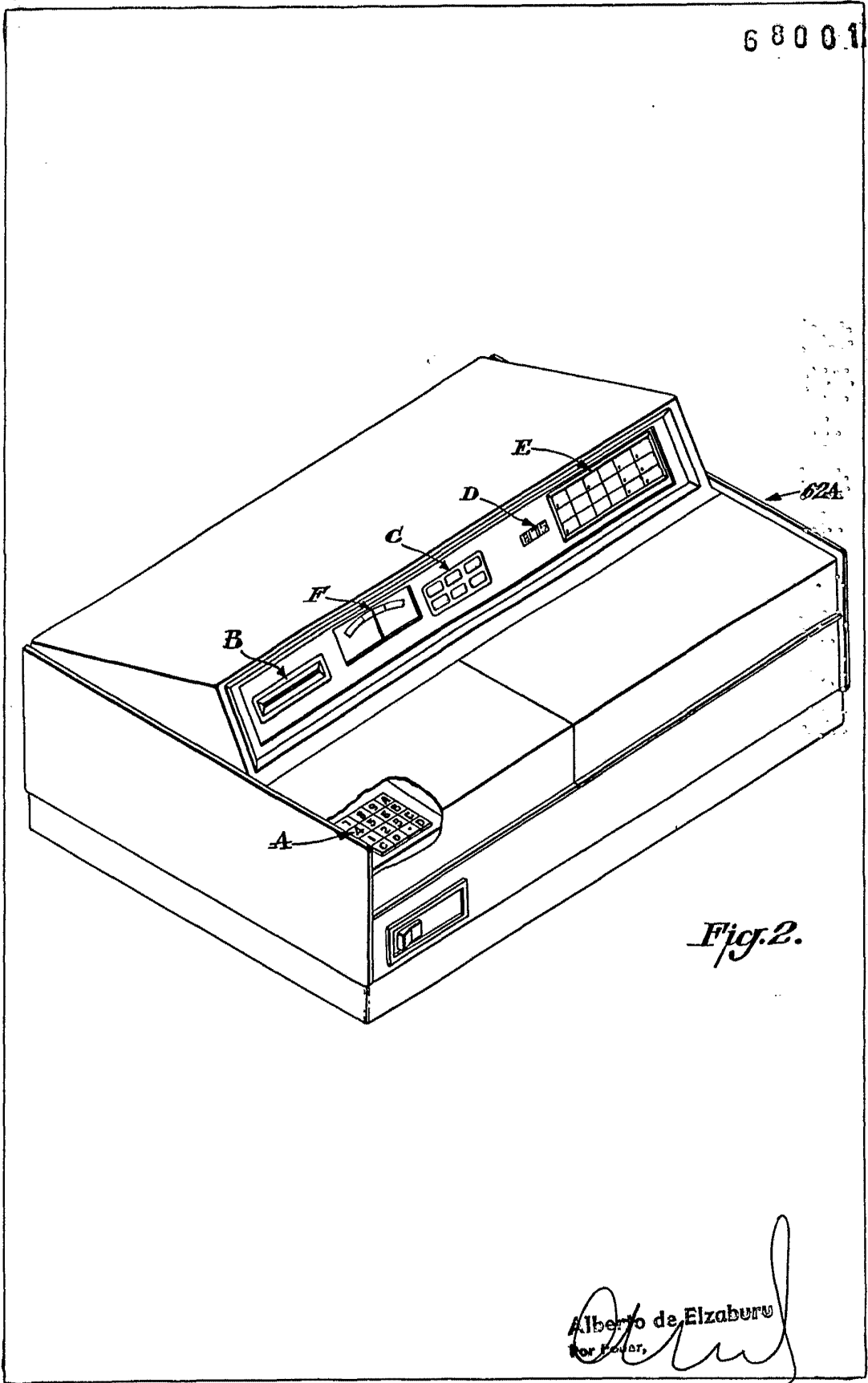


Fig. 2.

Alberto de Elizaburu
for Pfizer,