



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 322 679**

51 Int. Cl.:
C12M 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98916796 .0**

96 Fecha de presentación : **20.04.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **0976821**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.02.2000**

54 Título: **Equipo, kit y procedimiento de diagnóstico microbiológico.**

30 Prioridad: **18.04.1997 CU 45/97**
29.04.1997 CU 48/97
06.06.1997 CU 65/97

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.06.2009

73 Titular/es: **CENTRO NACIONAL DE
INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**
Avenida 25, nº 15819, Cubanacan, Playa
Ciudad de la Habana 12100, CU

72 Inventor/es: **Contreras Alarcón, Orestes Rolando;**
Roura Carmona, Gloria;
Novo Mesegue, Francisco;
Hernández Ramírez, Silvio;
Ramírez Frometa, Nardo;
Ramírez Molina, Iván Manuel;
Travieso Ruiz, Fernando;
Zayas Tamayo, Ángela Mariana y
Romay Penabad, Cheyla

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Equipo, kit y procedimiento de diagnóstico microbiológico.

5 Campo técnico

La presente invención se refiere al campo de la Microbiología, específicamente a un procedimiento y a un equipo útiles para un diagnóstico microbiológico rápido, teniendo todos ellos aplicaciones en la práctica clínica veterinaria y humana.

10 Técnica anterior

El diagnóstico microbiológico basado en procedimientos físicos, químicos así como biológicos es un aspecto que se ha abordado ampliamente en la técnica anterior.

15 La patente estadounidense 3.506.544 describe un procedimiento electroquímico para detectar bacterias a través de la medición de la disminución del contenido polarográfico del oxígeno que circula a través de una celda electroanalítica que contiene dos electrodos diferentes sumergidos en un medio de cultivo inoculado. Este sistema usa para su análisis grandes cantidades de medio de cultivo (15-18 ml), dificultando así el tratamiento de las muestras a nivel de rutina.

Otro procedimiento que se ha usado para detectar el crecimiento microbiano es el principio de celda voltaica, que se basa en el uso de un recipiente apropiado con electrodos de metales nobles y volúmenes predeterminados, que generan un potencial que desciende en el momento del crecimiento de la bacteria. En la bibliografía especializada, se han descrito otros equipos basados en este principio. Por ejemplo, el equipo descrito por la patente GB 2142433 usa el mismo procedimiento, y usa un procedimiento de detección a través de la variación del potencial entre electrodos que están en contacto con muestras de fluido. Esto conlleva la medición implícita de potenciales inferiores con implementaciones de alta impedancia de la entrada que provocan un cambio en la señal medible debido a ruidos indeseables e inevitables, que en la mayoría de los casos además usa recipientes con metales nobles o recipientes con capa de oro no recuperable.

Un procedimiento sencillo y eficaz para detectar el crecimiento microbiano se basa en la medición de cambios conductimétricos que se producen debido al crecimiento microbiano en un medio de cultivo adecuado. Según la bibliografía relevante, los movimientos iónicos producen una señal que indica el valor conductimétrico en una disolución contenida en una celda de la medición de la conductividad.

Se sabe que las celdas de conductividad no tienen un comportamiento totalmente lineal en su escala de referencia, y la medición depende en gran medida de la temperatura. En la patente estadounidense 4.482.967, se describe un detector y un procedimiento para medir la conductividad que corrige estos defectos. Éste es un equipo de alta exactitud y complejidad y con requisitos especiales para medir valores de conductividad absolutos en una cromatografía de gases, con celdas convencionales y grandes volúmenes.

Se sabe que el crecimiento microbiano puede detectarse en muestras de fluido mediante diferentes procedimientos, por ejemplo usando un procedimiento turbidimétrico en el que el crecimiento bacteriano produce turbidez que el sistema lee y compara con patrones bien conocidos.

Este sistema requiere sensores ópticos convencionales, así como el recipiente receptor de la muestra de calidad óptica, de diseño complejo para trabajar con muestras que incluyen sólidos visibles que pueden observarse fácilmente (por ejemplo, discos de antibióticos). Una gran desventaja de este sistema es el hecho de que no puede funcionar con muestras interferidas, es decir, requiere muestras ópticamente homogéneas, además de la complejidad óptica que soporta. Las patentes estadounidenses 3.852.532; 3.895.661 y 3.889.011 describen procedimientos y aparatos para ese fin basados en estos principios.

Las patentes estadounidenses 4.021.120 y 3.714.445 describen dispositivos basados en el principio turbidimétrico para medir el crecimiento de microorganismos en medios líquidos. La patente estadounidense 4.021.120 describe un dispositivo para controlar el crecimiento de microorganismos en un medio líquido que contiene gas. Se toman muestras del recipiente en el que está el medio, con la ayuda de una bomba que las transporta hasta una cámara de degasificación con el fin de eliminar las burbujas de gas. Tras esto, la muestra se introduce en una cámara de medición en la que un rayo de luz pasa a través de la misma. El rayo de luz incide sobre la celda fotoeléctrica, produciendo una corriente que se aumenta mediante un amplificador. Esto es un indicador del crecimiento de los microorganismos. La magnitud de esta corriente dependerá de la intensidad del rayo de luz y estará influida, al mismo tiempo, por la turbidez del medio. Entonces, se devuelve de nuevo la muestra al recipiente cuando se analiza, con la ayuda de otra bomba. Este procedimiento de medición, así como el descrito en la patente estadounidense 3.714.445, es muy complejo tanto óptica como mecánicamente, mientras que, además de la cámara de medición, también las bombas y los conductos del transporte de las muestras deben esterilizarse frecuentemente, dificultando esta complejidad su uso en procedimientos de diagnóstico de rutina.

La patente británica 2 221 986 y las patentes estadounidenses 3.819.278 y 4.725.148 se refieren a turbidímetros para medir directamente el crecimiento microbiano usando el mismo principio de procedimientos anteriores. Presentan sistemas ópticos y mecánicos complejos y requieren la esterilización de sus partes entre cada lote de microorganismos.

Por otra parte, la patente estadounidense 3.832.532 también usa un dispositivo óptico convencional que incluye una cubeta de calidad espectrofotométrica, que con el fin de realizar mediciones usando discos de antibióticos, incluye en su diseño una cámara interconectada bilobulada, de manera que una vez que finaliza la incubación, el líquido debe pasar a la otra cámara con el fin de realizar la medición, y evitar de ese modo la presencia del disco de antibiótico durante la operación de lectura. La solución propuesta de esta invención presenta una gran complejidad no sólo operativa sino también técnica y tiene implicaciones económicas.

Las presentes tendencias de la Microbiología se dirigen hacia la búsqueda de procedimientos que permitan una rápida identificación de los microorganismos (entre 2-4 horas) en muestras biológicas. Para lograr esto, se han usado diferentes estrategias, entre ellas el uso de marcadores enzimáticos específicos.

Según el estado de la técnica, la mayoría de las muestras biológicas no pueden usarse directamente, necesitando el aislamiento y crecimiento previos del microorganismo que va a identificarse. Esto lleva mucho tiempo, y es imposible obtener resultados antes de 24-48 horas tras recibir las muestras en el laboratorio.

Las infecciones del tracto urinario se consideran unas de las más frecuentes entre las enfermedades infecciosas.

Las técnicas clásicas para detectar infecciones bacterianas en la orina requieren un cultivo en placas, lo que requiere al menos 24 horas para eliminar todas las muestras negativas y seleccionar las positivas.

Se sabe que solamente el 20% de las muestras de orina que llegan al laboratorio son positivas y de éstas, el 70% corresponden a infecciones por *E. coli*. Es por esto que la identificación de *E. coli* permite un considerable ahorro de tiempo y recursos, debido a que solamente el 30% de las muestras positivas se aislarían para su identificación posterior.

Según el estado de la técnica, la identificación de *E. coli* se lleva a cabo principalmente mediante dos marcadores enzimáticos específicos de esta bacteria, las enzimas β -D-glucuronidasa y triptofanasa, a través de la formación de indol (Kovacks, N. Eine vereinfachte Methode zum der Nachweis der Indolbildung durch Bakterien. Z. Immunitätsforsch., 55; 311-315, 1928). El 94% de todas las células de *E. coli*, algunas de *Salmonella* y *Shigella* muestran una reacción positiva hacia la β -D-glucuronidasa. La formación de indol es positiva para el 99% de todas las células de *E. coli*. Por tanto, la combinación de ambas pruebas permite una identificación inequívoca de este microorganismo.

En la actualidad, están comercializándose diferentes pruebas, como BACTIDENT-*E. coli* y diferentes medios de cultivo como FLUOROCULT-MUG, (ambos de MERCK DIAGNOSTICA). Se basan en el principio anterior. Sin embargo, para su utilización, es necesario un aislamiento previo del microorganismo para obtener una colonia aislada, para llevar a cabo la identificación por BACTIDENT, o la muestra se inocular en el medio de cultivo y se necesitan 24 horas para obtener las colonias aisladas y para poder detectar los cambios asociados con la transformación de los sustratos específicos (FLUOROCULT-MUG).

En la solicitud de patente número WO 95/03424, se notifica un medio de cultivo sólido para la detección simultánea de bacterias coliformes y/o *E. coli* en muestras de agua y en alimentos. Para esto, se requieren 24 horas de incubación tras inocular la placa con la muestra que va a evaluarse. Se siguen procedimientos similares en el kit de diagnóstico URILINE ID y el medio de cultivo CPS ID, ambos de BIOMÉRIEUX, Francia. En ambos casos es necesaria la incubación de las muestras en medio sólido durante 24 horas antes de identificar el microorganismo.

La solicitud de patente número WO 80/02433 se refiere a un procedimiento para identificar bacterias a través de la combinación de diferentes pruebas para determinar 26 enzimas bacterianas; entre ellas β -D-glucuronidasa y triptofanasa son útiles para identificar *E. coli*.

En esta invención, las bacterias deben aislarse de las muestras clínicas antes de su identificación.

Divulgación de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar un sistema que permite detectar el crecimiento microbiano de manera temprana, en muestras de orina obtenidas directamente de animales en los que se requiere la detección del crecimiento de microorganismos a través del uso de micromuestras. Este sistema se basa en la detección de cambios turbidimétricos en un medio de cultivo, producidos por el microorganismo en crecimiento. Este sistema incluye un procedimiento y equipo diseñados para este fin.

El procedimiento para el diagnóstico microbiano en orina según la presente invención comprende las siguientes etapas:

- a) se inocular una alícuota de una muestra de orina obtenida directamente de su fuente en un vial de vidrio que contiene medio de cultivo, un polímero y sustratos MU- β -D-glucurónido y L-triptófano, ambos solubilizados en fosfato de potasio 50 mM, pH de 7 a 7,5,

ES 2 322 679 T3

- b) se determina la turbidez de dicho vial a tiempo = 0;
- c) se incuba el vial entre 2 y 6 horas a una temperatura entre 35°C y 37°C;
- 5 d) se determina el índice de crecimiento entre tiempo 0 y el tiempo de incubación seleccionado y se discriminan las muestras positivas de las negativas dependiendo del aumento de la turbidez, siendo positivas aquellas muestras con aumentos superiores a 0,08 unidades McFarland, de las que se toman alícuotas para etapas adicionales;
- 10 e) se toma una alícuota de una muestra positiva de la etapa d) y se transfiere a un nuevo vial de vidrio que contiene medio de cultivo recién preparado, que se dispensa en un volumen de 200 µl en cada micropocillo de una tira no transparente que contiene dos posiciones libres para controles negativo y positivo, que se llenan con medio de cultivo solo y medio de cultivo inoculado respectivamente, y de 10 a 22 posiciones en las que se organizan discos de antibióticos, y se incuba entre 3 y 4 horas a una temperatura entre 35°C y 15 37°C;
- f) se lee la tira colocando un lector turbidimétrico de microflujo, que se alimenta mediante una bomba peristáltica, en cada micropocillo siguiendo las instrucciones emitidas por un paquete de programas informáticos para la adquisición y el procesamiento de datos y la creación de bases de datos diseñadas para ese fin, en el 20 que el lector turbidimétrico de microflujo comprende un fotoemisor, un fotodetector y una cámara de medición, en el que dicha cámara de medición está compuesta por un tubo de plástico introducido en un capilar de vidrio, estando iluminada la cámara de medición mediante una luz emitida desde dicho fotoemisor y que pasa a través de dicha cámara de medición;
- 25 g) a partir de los valores de densidad obtenidos, se calcula el índice de crecimiento en los controles, y se calculan los porcentajes de inhibición para cada muestra para cada antibiótico;
- h) según el nivel de inhibición mostrado por las muestras, se adjudican los criterios de sensible, resistente o intermedio, entre valores de inhibición en un intervalo del 60% al 100%, en el que las muestras con un 30 porcentaje de inhibición inferior al 60% pueden considerarse resistentes, las que muestran valores entre el 60% y el 80% pueden considerarse sensibles en un nivel intermedio y las que se inhiben entre el 80% y el 100% se consideran sensibles al antibiótico sometido a prueba;
- i) se somete una alícuota tomada de la etapa d) a una fuente de luz U.V., con el fin de detectar la fluorescencia generada debido a la liberación de 4-metilumbeliferona, y el desarrollo de la formación de indol usando un reactivo de Kovacs modificado, constituido por 2 g de paradimetilaminobenzaldehído diluido en etanol y 20 ml de ácido clorhídrico concentrado, para la detección de la actividad enzimática MU-beta-D-glucuronidasa y triptofanasa producida por *E. coli*;
- 35 j) para aquellas muestras en las que no se identificó *E. coli* en la etapa i), se somete la alícuota anteriormente obtenida en la etapa d) al procedimiento de aislamiento e identificación tradicional.
- 40

El equipo de la presente invención adecuado para llevar a cabo la determinación del antibiograma en las etapas f) a h) del procedimiento según la presente invención comprende:

- 45 (1) un lector turbidimétrico de microflujo (1) que comprende un fotoemisor (12), un fotodetector (13) y una cámara (9 y 10) de medición, en el que dicha cámara de medición está compuesta por un tubo (9) de plástico introducido en un capilar (10) de vidrio, estando iluminada la cámara de medición mediante una luz emitida desde dicho fotoemisor y que pasa a través de dicha cámara de medición;
- 50 (2) una tira no transparente que contiene micropocillos;
- (3) una bomba (2) peristáltica para hacer circular una muestra a través de la cámara de medición del lector turbidimétrico de microflujo; y
- 55 (4) un ordenador (5) que tiene un paquete de programas para la adquisición y el procesamiento de datos y la creación de bases de datos:
- en el que
- 60 el lector turbidimétrico de microflujo está conectado al ordenador mediante una tarjeta de interfaz y
- y dicho lector turbidimétrico de microflujo incluye una parte (8) de boca adecuada para la introducción en una muestra en un micropocillo de la tira no transparente que va a someterse a prueba haciendo circular una muestra a través de dicha cámara de medición mediante la acción de dicha bomba peristáltica.
- 65

La novedad de la presente solución técnica es que permite detectar muestras infectadas, obtenidas directamente de la especie que las produce.

ES 2 322 679 T3

Adicionalmente, entre otras aplicaciones, la presente invención permite obtener el esquema de sensibilidad a los diferentes antibióticos de microorganismos usando colonias previamente aisladas de muestras positivas de urocultivos, en este caso ahorrando el tiempo requerido para los procedimientos de aislamiento y purificación.

5 En el caso particular de infecciones del tracto urinario, la presente invención permite discriminar las muestras positivas de las negativas usando muestras de orina directas, contaminadas o no con otros gérmenes. También puede incluir la identificación simultánea de las muestras infectadas, específicamente con la bacteria *E. coli*.

10 Con el sistema de la invención, los resultados basados en más de 1000 muestras sometidas a prueba han mostrado un 95% de concordancia con el recuento total de células viables en el medio de cultivo CLED. Este procedimiento se usa convencionalmente para detectar infección en el tracto urinario.

15 En la determinación del antibiograma, la correspondencia con el procedimiento de Bauer-Kirby se ha establecido como del 92,4%, los errores graves del 1,3%, y los errores muy graves del 0,4%.

La presente invención proporciona información útil relacionada con el diagnóstico microbiológico clínico en un corto periodo de tiempo. Esta información es muy importante para prevenir el uso inadecuado de antibióticos, el desarrollo de resistencia microbiana, largas hospitalizaciones y muerte en el caso de infecciones graves.

20 El sistema se caracteriza por su rapidez. En un periodo de cuatro horas, puede determinarse la infección de la orina y en muestras positivas podrían obtenerse resultados de antibiograma fiables.

Al mismo tiempo, este sistema es sumamente preciso de manera distinguida. Los resultados obtenidos pueden comprobarse tan a menudo como sea necesario.

25 Desde un punto de vista social, el sistema tiene gran importancia debido a la posibilidad de proporcionar antibióticos de un modo conveniente y racional, evitando largas hospitalizaciones. Desde un punto de vista ecológico, la invención restringe de manera similar el desarrollo de resistencia bacteriana.

30 Es un sistema sumamente flexible que permite adaptar la información del programa que usa a las necesidades o los requisitos de los usuarios. El sistema ofrece la posibilidad de cambiar el conjunto de antibióticos usados según las necesidades particulares.

35 El sistema de la presente invención está constituido por un equipo y un procedimiento diseñados para un diagnóstico microbiológico rápido, que puede aplicarse en la práctica clínica veterinaria y humana.

El equipo se ha diseñado para trabajar con una gran cantidad de muestras y usa un programa operativo, y una interfaz hombre-máquina que es muy funcional. También proporciona una alarma audiovisual para ordenar la lectura y evitar errores operacionales. El módulo de medición de este equipo puede insertarse en la ranura libre de un ordenador.

40 El equipo de la presente invención puede comprender los siguientes dispositivos:

- Un módulo de control que se incorpora en un ordenador personal.
- Una tarjeta de interfaz.
- Una bomba peristáltica.
- Un sensor.
- Un calibrador.
- Una impresora.
- Una lámpara UV, opcionalmente.

55 El ordenador personal debe tener las siguientes propiedades:

- Compatible con IBM, 386/486, 25-66 MHz.
- 60 - Memoria RAM de 1 Megabyte mínimo.
- Disco duro: 40 Megabytes mínimo.
- Torre de disco flexible 3 1/2", opcional.
- 65 - Monitor SVGA en color.
- Teclado, ratón e impresora.

ES 2 322 679 T3

La bomba peristáltica se ha diseñado para producir la circulación de las muestras a través del sensor. Tiene un casete ajustable manualmente que permite un flujo regulado e ininterrumpido, que puede usarse independientemente o incorporarse en el sistema. La bomba usa un flujo de 2,0 - 2,6 ml/minuto y se alimenta opcionalmente mediante 220 V de CA o 12 V de CC. Su consumo de potencia es de 0,5 vatios.

El sensor está compuesto por un lector de microflujo continuo que se usa para detectar cambios en la turbidez, debidos al crecimiento microbiano en muestras previamente preparadas procedentes de diferentes fuentes, en volúmenes muy pequeños (de hasta 200 microlitros), en movimiento, es decir, líquido en movimiento, en el que las muestras pueden estar o no interferidas. Usando la presente invención, no es necesario "limpiar" el lector de flujo durante las mediciones. Por tanto, pueden medirse muestras diferenciadas o de un modo continuo. Esta medición no está interferida por variaciones turbidimétricas del medio de cultivo como consecuencia de los cambios de las muestras. Sin embargo, permite detectar pequeñas variaciones de la turbidez del medio debidas al crecimiento microbiano. No se requiere el control de la temperatura para las mediciones, y es posible realizar un número indeterminado de mediciones, de diferentes muestras, de concentración de células microbianas y fuentes diferentes.

Además, este sensor se distingue por su calibración que es automática y a un flujo continuo de 2 - 2,6 ml/minuto. El intervalo óptico de medición es de 0,00 - 2,00 unidades McFarland.

En la presente invención, se usa un calibrador que se basa en técnicas nefelométricas y que sigue la escala de McFarland. Está compuesto por una fuente de luz directa y un fotosensor y se ajusta a través de un programa. La función del calibrador es medir la turbidez en medio líquido Mueller-Hinton hasta 2,0 unidades McFarland. El requisito de energía es de 5 V de CC y su consumo es de 50 mA.

La lámpara UV que está acoplada opcionalmente al equipo permite la identificación de la bacteria *E. coli* en muestras sometidas a prueba. El programa ofrece una interfaz hombre-máquina fácil de usar, es fácil de manejar y permite la selección de diferentes opciones mediante la barra de menús o el teclado de funciones, combinado con el uso de iconos, así como el almacenamiento automático de los datos.

Usa un lenguaje de consulta estructurado (SQL) para obtener información y unas utilidades externas "BACKUP" que realizan copias de seguridad.

El programa tiene un sistema de alarma que va a usarse en el caso de infracción de la condición de entrada, una alarma audiovisual para controlar el tiempo de lectura de cada muestra, así como otras utilidades para el mantenimiento técnico.

Las características esenciales distintivas del equipo de esta invención son el minilector estático turbidimétrico, el sensor de microflujo que se alimenta mediante la bomba peristáltica y su conexión a un microordenador con un paquete de programas para la adquisición, el procesamiento y la creación de bases de datos, que van a usarse en la generación de los informes necesarios.

La figura 1 muestra el esquema integral del equipo de la presente invención, en una visión general. Tal como se muestra, este equipo se basa en un lector turbidimétrico de microflujo (1), que se alimenta mediante una bomba (2) peristáltica y se ajusta a un equipo (3) electrónico de alta sensibilidad que detecta cambios turbidimétricos de (1) a través de un procedimiento de medición que permite usar un grupo de algoritmos para detectar pequeñas variaciones turbidimétricas y procesar de manera apropiada los datos obtenidos. Está formado por un circuito (4) de medición turbidimétrico conectado a través de una tarjeta de interfaz a una unidad (5) de procesamiento central. Esta unidad recibe todos los comandos (6) de teclado y proporciona los resultados en un monitor (7). Puede detectar pequeñas variaciones en la turbidez que se producen en el medio de cultivo inoculado en la muestra que va a someterse a prueba.

En la figura 2 se muestra un esquema detallado de la estructura interna del lector (1) turbidimétrico en el que se detectan las variaciones en la turbidez. El procedimiento para medir es muy sencillo: la pequeña boca (8) del lector se introduce en la muestra que va a someterse a prueba que entonces se hace circular a través del mismo con ayuda de la bomba (2) peristáltica de la figura 1. Esta bomba peristáltica funciona todo el tiempo requerido para llevar a cabo las mediciones. En primer lugar, se detecta la presencia de la muestra obteniendo un valor de voltaje que supera un umbral predesignado y tras un periodo de tiempo determinado, se realiza la medición y así sucesivamente. Cuando la bomba (2) peristáltica de la figura 1 se mantiene funcionando, hay un periodo de tiempo entre cada medición durante el que circula aire a través del lector (1) turbidimétrico. Este periodo de tiempo se considera como el momento en el que se limpia el lector (1) turbidimétrico, y significa que no es necesario el proceso de lavado adicional con el fin de esterilizar todas las partes del lector.

La cámara de medición está compuesta por un tubo (9) de plástico introducido en un capilar (10) de vidrio. El paso (11) de luz es el diámetro del orificio a través del que la luz procedente del fotoemisor (12) debe cruzar para llegar a la cámara (9 y 10) de medición. La intensidad de la radiación luminosa, transmitida a través de la cámara (9 y 10) de medición, dependerá del nivel de turbidez de la muestra y se mide mediante un fotodetector (13). La radiación producida por el fotoemisor (12) se estabiliza por medio de un bucle electrónico de control automático convencional.

La figura 3 muestra el funcionamiento del lector turbidimétrico a través de un diagrama de flujo. En primer lugar, se verifica la presencia del lector turbidimétrico por medio de la subrutina de detección y si está presente, se comprueba

entonces la existencia de la bomba peristáltica que es necesaria para el funcionamiento del lector turbidimétrico y para la subrutina de ejecución de la limpieza, estableciendo además el flujo de funcionamiento requerido. La subrutina de limpieza es de importancia significativa debido a que los parámetros del lector dependen de la limpieza de la cámara de medición. Este aspecto influye en su vida útil.

Una vez se han regulado todos los parámetros de funcionamiento, el lector turbidimétrico estará listo. Cualquier subrutina que se infrinja inhabilitará el funcionamiento del lector. La aplicación principal de este dispositivo está orientada hacia la determinación del antibiograma de la muestra (la sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos), que se consigue en un periodo de tiempo entre 2 y 6 horas, ayudado por un kit de diagnóstico diseñado para estos fines.

El otro dispositivo que se incorpora en el equipo de la presente invención es el minilector turbidimétrico estático mencionado anteriormente. Detecta cambios de turbidez debidos al crecimiento microbiano de la muestra que se usó en un vial de vidrio que contiene medio de cultivo líquido, que es uno de los componentes del kit de diagnóstico de esta invención. Este vial está adaptado exactamente al árbol de lectura del equipo. El dispositivo está ajustado para usar los viales mencionados para la lectura directa de la muestra, lo que significa que no son necesarias cubetas especiales para ejecutar la lectura, lo que posibilita su uso en medios de diagnóstico de rutina. El dispositivo mencionado se usa para calibrar el inóculo que se usa en el kit de diagnóstico para detectar el antibiograma. Notifica la turbidez en unidades McFarland, según los modelos de látex de patrones de NCCLS en un intervalo de medición establecido (0 - 4,0 unidades McFarland).

El kit de diagnóstico descrito en el presente documento está compuesto por un vial nefelométrico de 8 ml de volumen que contiene 4,5 ml de medio de cultivo, que puede ser un vial de vidrio de borosilicato que puede tratarse en autoclave con una cubierta de plástico.

La figura 4 muestra los componentes del kit de diagnóstico, constituido por un vial que contiene medio de cultivo y el polímero, el soporte de la tira y la tira usada para la determinación del antibiograma de la muestra que va a someterse a prueba.

Se usa caldo Mueller-Hinton OXOID modificado estéril, pH de $7,4 \pm 0,2$ como medio de cultivo con el fin de seguir el crecimiento microbiano, que incluye adicionalmente un polímero.

El kit de diagnóstico usado para detectar un antibiograma en una muestra se caracteriza por el uso de discos de antibióticos comercialmente disponibles. Pueden usarse según esquemas que pueden cambiar según cualquier requisito. Los discos de antibióticos se organizan en tiras no transparentes que contienen dos posiciones libres para controles negativo y positivo, que se llenan con medio de cultivo solo y medio de cultivo inoculado respectivamente. Se usan para calcular el índice de crecimiento en las muestras que van a someterse a prueba. Además, hay otras de 10 a 22 posiciones en las que podrían colocarse discos de antibióticos.

El programa creado para estos fines permite la introducción de estos cambios en los procedimientos de adquisición y edición. Significa que el kit tiene una alta flexibilidad y permite adaptaciones según diferentes necesidades.

Un polímero; que podría ser cualquier polisacárido lineal de fórmula estructural $\text{CH}_3\text{-CH}_3\text{-CH}_3\text{-N}$ o similar a ésta, con peso molecular entre 50.000 y 150.000, se añade al vial de vidrio mencionado anteriormente que contiene medio de cultivo para la dilución, que forma parte del kit de diagnóstico de la presente invención. La incorporación de este polímero al medio de cultivo a la concentración en el intervalo entre el 0,05% y el 1%, permite eliminar el efecto inhibidor de productos catabólicos que acompañan al inóculo de la muestra que va a someterse a prueba, obteniéndose por tanto mayores índices de crecimiento de las bacterias implicadas en la infección en un periodo de tiempo menor, en comparación con el tiempo requerido cuando se usa el mismo medio de cultivo sin dicho polímero. Este nuevo elemento en el kit de diagnóstico reduce los resultados sensibles falsos obtenidos en estudios de sensibilidad, y al mismo tiempo mejora la correspondencia con el procedimiento de referencia de Kirby-Bauer (Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C. y Turck, M. An. J. Clin. Pathol. 1966, 45, páginas 493-496).

Considerando que este polímero sólo puede metabolizarse por un número limitado de microorganismos que no se encuentran generalmente en los análisis en los que se aplica el presente sistema, se deduce que el efecto de promoción del crecimiento bacteriano está ocasionado por una inhibición de los agentes inhibidores que están presentes en el medio de cultivo. Por este motivo, dicho polímero debe actuar absorbiendo los catabolitos que se incorporan involuntariamente junto con el inóculo que se analiza. Además, se ha observado que una vez se neutralizan estos catabolitos mediante el polímero mencionado durante procedimiento de medición del crecimiento del microorganismo, la actividad bactericida de los antibióticos sometidos a prueba es más específica.

Una de las ventajas de la presente invención es el hecho de que el sistema permite el diagnóstico no sólo de cepas previamente aisladas sino también muestras de orina directas.

En primer lugar, se coloca la muestra referida en el vial de vidrio que contiene el polímero y el medio de cultivo, inmediatamente después de eso se determina la turbidez (t_0) y este valor, así como el tiempo de lectura según el número adjudicado de cada muestra, se almacena mediante el programa empleado. Después de eso, se incuba el vial mencionado entre 2 y 5 horas a una temperatura entre 35°C y 37°C. Al final de la incubación, el sistema emite, según

la rutina estructurada, un sonido de alarma de pitido y un aviso de pantalla que indica que la muestra debe leerse de nuevo. Las muestras que muestran aumentos superiores a 0,08 unidades McFarland se consideran como muestras positivas.

5 El sistema de la presente invención permite, en muestras positivas una vez se detectan, la determinación de su antibiograma de un modo muy rápido. Para ese fin, se toma una alícuota de la muestra y se transfiere a un nuevo vial de dilución que contiene medio de cultivo recién preparado, que se distribuye en la tira en la que se encuentran dos controles (positivo y negativo) y desde 10 hasta 22 discos de antibióticos. Tras un periodo de incubación de 4 horas a una temperatura de 37°C, se lee la tira, poniendo el sensor de microflujo en cada micropocillo, siguiendo las instrucciones facilitadas por el programa, que selecciona el momento en el que se lleva a cabo cada medición en serie. Por tanto, se elimina la interferencia de la lectura previa. A partir de los valores de densidad obtenidos, se calculan los índices de crecimiento (en los controles), así como el porcentaje de inhibición para cada muestra por cada antibiótico. Según el nivel de inhibición mostrado por las muestras, se adjudican los criterios de sensible, resistente o intermedio, entre valores de inhibición en un intervalo del 60% al 100%. Esto significa que las muestras con un porcentaje de inhibición inferior al 60% pueden considerarse resistentes, las que muestran valores entre el 60% y el 80% pueden considerarse sensibles en un nivel intermedio y las que se inhiben entre el 80% y el 100% se consideran sensibles al antibiótico sometido a prueba.

20 Cada resultado se comprueba con el fin de evaluar si está entre un crecimiento admisible mínimo o máximo (antibiograma satisfactorio). Los resultados obtenidos y los datos de edición de cada muestra pasan automáticamente a crear las bases de datos correspondientes.

25 Tal como se explicó anteriormente, la invención permite trabajar con muestras directas en medio líquido, leer en viales comerciales y después de eso ejecutar un antibiograma en las muestras positivas. Este procedimiento completo se lleva a cabo en un periodo de tiempo de menos de 9 horas, evitando de ese modo etapas previas de aislamiento y purificación de las muestras y obteniendo niveles de sensibilidad superiores al 90%. y obteniendo niveles de sensibilidad superiores al 90%.

30 El sistema propuesto también permite hacer frente a las interferencias generadas debido a muestras contaminadas así como infecciones provocadas por más de un germen. La interferencia de la contaminación se ha vencido ajustando la fuerza de la señal y el tiempo para detectar niveles de infección que son aceptados internacionalmente (>100.000 ufc/ml), de este modo, no se incluyen muestras contaminadas no infectadas para el procesamiento adicional, que generalmente tienen un bajo nivel bacteriano (< 1000 ufc/ml), lo que facilita la oportunidad de detectar muestras contaminadas sólo cuando están infectadas. En este caso particular, teniendo en cuenta el hecho de que las especies contaminantes son generalmente saprofitos, que según la reacción de gram son sensibles a todos los antibióticos, es evidente que no pueden interferir en la detección del esquema de resistencia de cepas infectadas. Éstas constituyen características distintivas de esta invención.

40 En relación con infecciones producidas por más de un germen, podrían presentarse dos situaciones: en el primer caso, uno de los gérmenes infectantes podría predominar debido a una mayor tasa de crecimiento específico, tras el tiempo mínimo de incubación, en este caso se aceptará el antibiograma. En el segundo caso, en el que ambos gérmenes crecen a la misma tasa, el antibiograma podría mostrar un antibiótico eficaz para ambos, o podría presentarse un esquema de resistencia absoluta. En este último caso, podría someterse a prueba un nuevo antibiótico o la muestra debe hacerse pasar a través de procedimientos de aislamiento y purificación.

45 Este conjunto de análisis y soluciones rápidas para cada situación particular es posible gracias a la aplicación del concepto de lectura en muestras directas con un alto nivel de interferencia, en un tiempo corto y fijo, aspectos que caracterizan y distinguen el sistema de la presente invención.

50 Además del informe de detección de infección en el tracto urinario y el modelo de sensibilidad a bacterias infectantes, debe incorporarse la identificación bacteriana, con el fin de producir un informe completo. Proponiéndose conseguir este fin, al vial mencionado con medio de cultivo y polímero, usado para la detección de la infección urinaria, podrían añadirse dos sustratos que permiten una identificación rápida de bacterias *E. coli* en la orina, tal como se ha declarado anteriormente, en el mismo vial de detección.

55 En la presente invención, un medio de cultivo diseñado que podría usarse en el sistema propuesto permite la detección de *E. coli* en un tiempo de incubación de 4-6 horas, a partir de muestras de orina infectadas sometidas a prueba.

60 El medio de cultivo propuesto usado en la presente invención incluye por litro, además de las bases nutritivas convencionales incluidas en el medio de cultivo Mueller Hinton de Oxoid: (infusión de carne, 300 mg; hidrolizado de caseína, 17 g y almidón, 1,5 g), los sustratos MU-β-glucuronido (0,1 g), L-triptófano (1 g) y el polímero usado como agente de desrepresión (1 g). Todos los componentes se disuelven en tampón fosfato de potasio 50 mM, y se ajusta el pH del medio entre 7-7,5. Tras eso se distribuye el medio en viales de 4,5 ml de volumen, que finalmente se esterilizan mediante autoclave durante 20 minutos a 121°C.

65 Los sustratos mencionados son útiles para la detección de la actividad enzimática MU-β-D-glucuronidasa y triptofanasa, producida por *E. coli*. Para la última enzima, se necesita la detección de indol, de modo que tras obtener el

ES 2 322 679 T3

crecimiento bacteriano en el medio, se añade un reactivo auxiliar para desarrollar la actividad (reactivo químico de Kovacks modificado); cuya fórmula es: paradimetilaminobenzaldehído (2 g), etanol y ácido clorhídrico concentrado (20 ml).

Se detecta el producto de la interacción enzimas-sustrato, como primera etapa exponiendo los viales con un aumento de turbidez (positivos) a una fuente de luz UV (artículo que podría incluirse opcionalmente en el equipo de la presente invención), para la detección de la fluorescencia que se genera a partir de la 4-metilumbeliferona liberada. Como segunda etapa, se somete a prueba la producción de indol en el mismo vial, mediante la adición de reactivo de Kovacks modificado.

Ejemplos

Ejemplo 1

Encender el equipo

Se enciende el equipo justo 15 minutos antes de comenzar las lecturas.

Una vez está activado el ordenador, el programa de autoejecución dirige directamente al programa diseñado para la ejecución de todo el proceso, de este modo, inicialmente, someterá a prueba la existencia y la integridad de la base de datos y; comprobará la capacidad de funcionamiento de cada uno de los componentes del módulo de medición: sensor, calibrador de inóculos y bomba peristáltica. También, comprobará la existencia de clave electrónica, que está acoplada a un puerto paralelo del ordenador. El programa informará sobre cualquier error detectado en cualquiera de los elementos del sistema e inhabilitará las opciones relacionadas. Si no se había creado una base de datos, se creará si el usuario toma esta decisión. Si no hay ninguna base de datos, se creará si el usuario lo decide.

Ejemplo 2

Preparación de muestras para pruebas de urocultivo

El urocultivo es una prueba bien conocida usada para detectar infección en muestras de orina. El procedimiento comienza midiendo la densidad óptica inmediatamente tras haberse inoculado los viales (T0h), seguido de una segunda medición 4 horas tras la incubación (T4h).

La medición se realiza fotométricamente mediante la utilización de un calibrador de inóculos. Las siguientes etapas muestran el procedimiento completo:

1. Se inocula un vial con medio de cultivo estéril de 4,5 ml con 500 μ l de orina.
2. Se mide la turbidez inicial en unidades McFarland usando un calibrador de inóculos (T0h).
3. Se incuba la muestra a 37°C durante 4 horas, una vez terminado, el equipo emite una alarma acústica para cada muestra.
4. Se realiza una medición de la turbidez del vial inoculado tras 4 horas de incubación (T4h) y, según el nivel de aumento detectado, se clasifican las muestras como positivas, negativas o dudosas. En el último caso, la muestra debe comprobarse tras una hora más de incubación para detectar un probable positivo. También en pacientes con antecedentes de enfermedad renal, se recomienda el mismo procedimiento que anteriormente (T5h).

Según las necesidades, cuando se hayan realizado todas las mediciones, podría tener lugar la edición de cada caso, y se almacenan en la base de datos del sistema. Si está activada la opción de imprimir automáticamente y la impresora está lista, los casos se imprimirán automáticamente. Las muestras clasificadas como positivas están listas para la detección mediante antibiograma (directamente).

Ejemplo 3

Procedimiento para antibiograma

Para el antibiograma se usan tiras de 12 a 24 micropocillos. Los dos primeros son para los controles positivo (C+) y negativo (C-), respectivamente; se colocan discos de antibióticos en los otros micropocillos.

La inoculación de las tiras se realiza mediante distribución de la muestra en el primer micropocillo y en aquéllos con discos de antibióticos. El segundo micropocillo se llena con medio de cultivo estéril.

ES 2 322 679 T3

Ejemplo 4

Preparación del inóculo

- A partir de una cepa pura.

Si se prepara el inóculo a partir de una cepa pura, deben ejecutarse las siguientes etapas:

1. Se toman tres o cuatro colonias de un medio de cultivo recién preparado (18-24 h) y se añaden a 4,5 ml estériles de caldo Mueller Hinton reforzado con un polímero lineal, peso molecular de 50.000, hasta que se obtienen 0,5 unidades de la escala McFarland, mediante pruebas de mininefelómetro. Opción que aparece en el menú principal (McFarland).
2. De esta concentración celular se añaden 150 μ l a 4,5 ml de medio de cultivo estéril colocado en otro vial, y se homogeneiza mediante agitación.
3. De la última dilución se distribuyen 200 μ l en la tira para el antibiograma, en los micropocillos usados para el control positivo (C+) y en aquéllos con discos de antibióticos.
4. En el segundo micropocillo, usado para el control negativo (C-), se distribuyen 200 μ l de medio de cultivo estéril.
5. Una vez se ha acabado se sella la tira y se incuba a 37°C durante 4 horas.
6. Se toma la tira del incubador y tras 10 minutos a temperatura ambiente, comienzan las lecturas. Se recomienda homogeneizar la tira mediante agitación manual o mecánica.
7. Se abre la tira y empieza la lectura.

Para leer el antibiograma es un requisito que la diferencia entre (C +) y (C -) alcance un valor dado definido por el crecimiento mínimo admisible. Si en presencia de los valores próximos a los diferenciales establecidos por este parámetro se detectan, en cada uno de los antibióticos probados, niveles de inhibición homogéneamente bajos (antibiograma no fiable), debe repetirse el antibiograma. En estos casos se recomienda reducir hasta alcanzar el 30% del volumen del inóculo usado anteriormente.

- Si se prepara el inóculo a partir de un urocultivo positivo, para llevar a cabo su antibiograma, es preciso realizar una dilución previa de la muestra hasta alcanzar 0,5 de la escala McFarland y una vez alcanzada la turbidez deseada se continua el procedimiento desde el punto 2 descrito anteriormente para la obtención del inóculo a partir de una cepa pura. En los casos en los que el urocultivo se detectará como positivo en 4 horas y tiene valores inferiores a 0,5 de la escala McFarland, éste debe incubarse hasta conseguir dicho valor o puede propagarse en un medio de cultivo a elección, para trabajar en el mismo día:

1. Baja carga de microorganismo no infectante.
2. Paciente bajo la acción de tratamiento antimicrobiano.

- Cuando se prepara el inóculo a partir de hemocultivos positivos (de 18 a 24 horas de incubación) deben llevarse a cabo las siguientes etapas previas:

- Extracción de 200 μ l de la fase superior del hemocultivo (sobrenadante) y añadirlos en 4,5 ml de medio de cultivo Mueller-Hinton + Pol-10.
- Leer la turbidez en el mininefelómetro en la opción McFarland del menú principal, y controlar hasta conseguir valores de 0,5-0,7 de tal escala.
- Se continúa el procedimiento del punto 2 descrito anteriormente del mismo modo que para la obtención del inóculo de una cepa pura.

Ejemplo 5

Aplicaciones del programa

La presente descripción proporciona un conjunto de programas completamente interactivos para llevar a cabo las pruebas de urocultivo y antibiograma. Los datos obtenidos en cada prueba pueden almacenarse en la base de datos para un procesamiento adicional. Se guía al usuario dentro de un entorno fácil de manejar que no requiere experiencia previa en el manejo de ordenadores.

ES 2 322 679 T3

Cada prueba se trata en menús independientes que constituyen un menú principal.

Para acceder a cualquiera de las opciones del sistema:

- 5 1. Pulsar la tecla que corresponde a la letra subrayada en el icono deseado.
- Colocar el puntero del ratón sobre el icono seleccionado y pulsar su botón izquierdo.

10 Para cancelar la opción seleccionada, pulsar la tecla “ESC” o usar el ratón para seleccionar “Volver” o “Cancelar” para volver a la opción anterior o cancelar la operación.

Menú principal

15 Una vez ha finalizado la inicialización del sistema, el programa mostrará el menú principal, que es el punto de partida para todas las operaciones que pueden realizarse. La ventana principal del menú está compuesta por tres paneles básicos:

- 20 • Panel central que muestra los iconos que activan las opciones principales del programa
- Panel superior que muestra la información relacionada con la versión del sistema, fecha y hora, menú actual y una breve explicación de cómo proceder para elegir una nueva opción. El panel superior proporciona dos opciones especiales que se encuentran en su esquina superior derecha:

25 *Salir*: Se usa para detener la ejecución del programa en cualquier momento, siempre que no esté ejecutándose un procedimiento de medición ni una operación crítica. Se recomienda usar siempre esta opción. **NO APAGAR EL ORDENADOR** mientras que está ejecutándose el programa para evitar posibles conflictos informáticos.

30 *SCR. S.*: Permite al usuario activar, a su elección, el salvapantallas, cuando va a dejarse el instrumento en estado de espera para evitar daños en la pantalla que pueden producirse cuando se deja una imagen fija constantemente durante largos periodos de tiempo.

35 Nota: Esta opción se activará automáticamente si el sistema se deja inactivo durante un cierto tiempo. Para volver a la pantalla normal, mover el ratón o pulsar cualquier tecla.

- Panel inferior: Muestra información sobre la prueba de urocultivo. En el caso de que algunas de éstas estén en espera para leerse, la cantidad y el tiempo en los que la que encabeza la lista, clasificada por la opción “lectura siguiente”, debe leerse. El panel inferior muestra también si la alarma del sistema para la lectura de urocultivo está activada o no.

Opciones del menú principal

45 El menú principal está integrado por un conjunto de iconos que contienen dibujos relacionados con la operación que se realiza cuando éstos se activan. Un triángulo negro que apunta hacia la derecha en las opciones “URO y ATB” es un indicador que notifica que tras activar uno de ellos se mostrará un submenú con opciones adicionales.

50 Nueve iconos definen las opciones disponibles dentro del menú principal, desde los que se controlan todas las acciones del sistema. Éstos son:

URO: Activa el menú de iconos de urocultivo.

55 ATB: Activa el menú de iconos del antibiograma.

McFarland: Permite medir el contenido del vial en la unidad de calibración (escala McFarland).

Base de datos: Permite acceder a la base de datos de antibiogramas o urocultivos.

60 Opciones: Cambiar la configuración del sistema.

Información: Muestra información administrativa del sistema.

DIRAMIC: Ofrece la dirección de la producción del sistema.

65 Ayuda: Facilita información sobre la opción actual.

Salir: Abandonar el sistema.

Menú de Urocultivos

Uro: Menú de Urocultivos.

Tras seleccionar el icono **URO** del menú principal, se proporcionará un submenú con un nuevo conjunto de opciones para las mediciones de urocultivos. Dentro de este menú se proporcionan las siguientes acciones.

Descripción de las opciones del menú de urocultivos

Leer uros

Procedimiento para la lectura de los urocultivos. Tras activar esta opción, se visualiza una lista de los casos de urocultivo que están en espera para leerse, en la que se muestran el número de casos consecutivos, el tiempo que debe transcurrir entre lecturas y la fecha y la hora de la próxima lectura. Si la lista está vacía, no hay ningún caso pendiente.

Para seleccionar un caso específico de la lista, pulsar el botón izquierdo del ratón dos veces a una velocidad relativamente alta (o pulsar la barra espaciadora del teclado) mientras que se apunta al caso. Las selecciones aparecerán entonces con una marca a su lado y la mayoría de las operaciones se efectuarán solamente sobre los mismos.

La selección “LEER URO” proporcionará las siguientes opciones:

- *Nuevos uros*: Permite leer el T0h (primera lectura) de los casos de urocultivo. Si el calibrador McFarland no se ha compensado anteriormente, el programa pedirá al operador que coloque un frasco con medio de cultivo estéril en el pocillo del calibrador con el fin de fijar la referencia cero antes de añadir nuevos casos. Una vez se ha realizado la compensación del calibrador McFarland, una ventana de mensajes informará al operador sobre su resultado. Un “factor de compensación” evaluará el rendimiento del calibrador. Se aceptará cualquier valor por debajo de 2,5. Sin embargo, valores por encima de 2,0 podrían ser un indicador de suciedad en el pocillo de medición. En tales casos, debe intentarse limpiar el pocillo con un trozo pequeño de tejido de algodón humedecido con alcohol etílico. Posteriormente, se mostrará una ventana para seleccionar entre leer, editar o cambiar el tiempo que debe transcurrir entre lecturas (T0-TFh). Esta última opción debe fijarse antes de que se realice la segunda lectura.
- *Volver a leer*: Permite repetir la lectura del tiempo T0h de una muestra. Esta opción es útil para rectificar un error en la lectura de uno de los casos. Cuando se activa esta opción, se mostrará una ventana con las mismas posibilidades que la opción “nuevos uros” más una nueva elección para saltar al caso “siguiente” sin modificar el actual.
- *Editar*: Por medio de esta opción, puede rellenarse un formulario con los datos generales del paciente. Otro grupo de campos recoge información de interés para el laboratorio. Con el fin de guardar los datos que se han tecleado, pulsar el botón izquierdo del ratón sobre la opción deseada. Como alternativa, usar la tecla “VOLVER” para aceptar o la tecla “ESC” para abortar el procedimiento de edición.

Mientras que se editan varios casos, la opción “Siguiente” se hará disponible. Con esta opción se abandona la edición del caso actual y la acción salta al siguiente caso. Si se selecciona la opción “OK”, se almacenarán los datos fijados y se presentará automáticamente el siguiente caso para su edición.

Un campo marcado por un triángulo negro apuntando hacia abajo indica que cuando se seleccione este campo, aparecerá una lista editada previamente con el fin de seleccionar el texto deseado. Es posible una búsqueda inteligente tecleando las primeras letras de la palabra buscada. Este estilo de edición se usa para estandarizar el texto correspondiente a campos importantes evitando errores de ortografía que podrían confundir a un procedimiento de “Buscar”. En esta lista pueden borrarse, modificarse o añadirse palabras, pero si se modifica un elemento de texto de la lista, se modificará en consecuencia la base de datos completa.

Para saltar de un campo a otro dentro del procedimiento de edición, pulsar la tecla TAB o simplemente pulsar el botón izquierdo del ratón sobre el campo deseado.

Si se seleccionan simultáneamente varios casos para su edición, se hará disponible una opción “Siguiente”. Esta opción ignora los cambios realizados en el caso actual y salta al siguiente. Por el contrario, si se selecciona la opción “OK”, se guardarán los datos actuales en la base de datos antes de presentarse el siguiente caso para su edición.

- *T0-TFh*: Permite al usuario fijar el tiempo que transcurrirá entre la primera lectura y la posterior. Esta opción se ejecutará para todos los casos seleccionados siempre que sea posible.

ES 2 322 679 T3

Nota: Si el tiempo que se ha fijado es más corto que el tiempo que ya ha transcurrido, el sistema enviará un mensaje de error.

- *Cancelar*: Permite al usuario borrar los casos pendientes no deseados. Esta opción se ejecutará para todos los casos seleccionados.
 - *Leer TFh*: Permite ejecutar la lectura final de un urocultivo con el fin de obtener el resultado de la prueba. Tras la activación de esta opción, aparecerá una ventana que presenta los datos generales del caso y su clasificación como “positivos, negativos o dudosos”. Para aceptar esta lectura seleccionar “Leer”. Si se selecciona la opción “Siguiente” en lugar de “Leer”, los resultados del caso actual no se considerarán como final y la acción saltará al siguiente caso seleccionado. Esta opción se usa cuando el operador decide aumentar el tiempo entre lecturas con el fin de estudiar la evolución de una muestra específica.
 - *Seleccionar*: Permite seleccionar todos los casos en la lista.
 - *Clasificar*: Ordena la lista por el número consecutivo o por el tiempo de la siguiente lectura. Esta opción es útil cuando se desea clasificar los casos según el tiempo en el que han de leerse, que no siempre coincide con el orden consecutivo.
 - *Imprimir*: Proporciona un diálogo al usuario con el fin de configurar la salida de datos a una impresora adecuada. Pueden seleccionarse las siguientes opciones:
 - *Impresora*: Permite la configuración de un tipo específico de impresora:
 - Epson: Para impresoras de matriz de puntos convencionales.
 - HP Laserjet: Para impresoras láser.
 - Adobe Script: Para impresoras Postscript.
 - ASCII: Para escribir datos en un archivo ASCII. En el caso de que se seleccione esta opción, pueden especificarse el nombre y la ruta del archivo de texto en el que se almacenan los datos.
 - Cancelar: Vuelve a la opción anterior.
 - *Copias*: Número de copias que se imprimirán.
 - *Líneas/Página*: Número de líneas de texto en cada página.
 - *Imprimir en*: Permite seleccionar el puerto de salida del ordenador en el que está instalada la impresora, habitualmente LPT1, LPT2, LPT3 o LPT4.
 - *Volver*: Vuelve a la opción anterior.
- Los comandos disponibles dentro de esta opción son:
- *OK*: Comienza la impresión. Tras activar esta opción se visualizará un mensaje de información sobre las elecciones de impresión. Se incluye la posibilidad de cancelar la impresión.
 - *Cancelar*: Cancela la operación.
 - *Volver*: Transfiere el control al MENÚ DE UROCULTIVOS.

Informe

Genera un informe con los resultados de la prueba de urocultivo. Este informe puede imprimirse.

McFarland

Permite la medición del crecimiento microbiano en unidades McFarland según las normas de NCCLS, tomando como referencia de crecimiento cero un medio de cultivo estéril no inoculado. La lectura de salida se muestra en una escala gráfica y un modo digital. La segunda cifra de los valores digitales debe considerarse y entenderse solamente como una referencia de la tendencia de la muestra. Adicionalmente, se proporciona también un recuento de células aproximado, obtenido mediante cálculos matemáticos según las normas de NCCLS.

ES 2 322 679 T3

Para realizar las mediciones, la superficie exterior de los frascos usados en el calibrador debe estar limpia y libre de rayones.

Con el fin de aumentar la precisión, los frascos que se miden en el calibrador McFarland deben marcarse de un modo tal que pueda repetirse fácilmente su posición cada vez que se lea el frasco. La marca debe estar siempre visible para el operador.

Dentro de esta ventana se encuentran disponibles dos comandos:

- *Compensar*: Esta acción fija, a elección del usuario, la referencia 0 de McFarland para las lecturas del crecimiento microbiano de los frascos con muestra. Puede ser útil si va a usarse un lote diferente de medio de cultivo tras compensar el calibrador. El procedimiento se consigue colocando un frasco con un medio de cultivo no inoculado en el pocillo de medición del calibrador McFarland.
- *Volver*: Vuelve a la opción anterior.

Base de datos

Usando esta opción, es posible un estudio y una impresión de los casos de urocultivo almacenados. Los datos almacenados pueden modificarse también a elección del usuario. La base de datos puede consultarse especificando el contenido de uno o varios campos en una búsqueda.

En la parte superior de la ventana, se muestra el número de caso de los datos actuales. También se notifican el número total de casos en la base de datos (ejemplo: caso 1 de 100) y el modo de visualización.

El modo de visualización se refiere al modo en que se extraen los datos de la base de datos: si se usó la opción “Examinar” se notificarán “Todos los casos”, pero si se ejecutó un procedimiento de búsqueda, se notificará “Buscar” y solamente estarán disponibles los casos que coincidan con las condiciones de búsqueda. El término “Ver” informa de si los datos presentados corresponden a los “Datos generales” o a los “Resultados” finales de la prueba.

Una vez se ha seleccionado “Base de datos”, estarán disponibles las siguientes opciones dentro de la ventana:

- *Primero*: Presenta el primer caso de la base de datos.
- *Anterior*: Presenta el caso que es anterior al actual.
- *Siguiente*: Va al caso que sigue al actual.
- *Último*: Salta al último caso de la base de datos.
- *Ir a caso*: Salta a un número de caso seleccionado.
- *Datos/Resultados*: Cambia los datos mostrados de “Datos generales” a “Resultados” de prueba.
- *Editar*: Editar los datos generales de la prueba.
- *Buscar/Todos los casos*: Esta opción cambia el modo de visualización de los resultados de un procedimiento de “Buscar” a “Todos los casos” disponibles en la base de datos. Tras seleccionar el modo de búsqueda, se abrirá una ventana en la que el operador puede restringir 14 campos de la base de datos con el fin de satisfacer los requisitos especificados de la consulta. Cada opción proporcionará un menú en el que puede elegirse el criterio de búsqueda para el campo seleccionado. Pueden usarse tres comandos dentro de esta ventana:
 - *Buscar*: Permite comenzar una búsqueda o consulta según un conjunto predefinido de restricciones de campo.
 - *Nuevo*: Formula una nueva búsqueda o consulta con restricciones diferentes.
 - *Volver*: Vuelve a la ventana anterior.

Ahora se explican algunos de los criterios de “Buscar” disponibles:

- *Contiene*: Permite buscar sin tener en cuenta si el campo se tecleó en mayúsculas o minúsculas. Permite también buscar palabras o sílabas contenidas en una palabra o frase, por ejemplo: “infectar” en infección grave.

ES 2 322 679 T3

- *No contiene*: Funciona de un modo similar que la opción “contiene” con la diferencia de que excluirá los casos que satisfagan la opción especificada.
- *Incluido en la lista*: Permite crear una lista con los requisitos deseados. Se usa el criterio mientras que se buscan varios gérmenes. Tras la activación de esta opción, se visualizará una lista en la que pueden añadirse o borrarse elementos.
- *No incluido en la lista*: Similar a la opción “incluido en la lista” pero excluyendo los casos que satisfacen la condición deseada.
- *Ignorar*: Ignora el campo seleccionado durante el procedimiento de búsqueda.
- *Exactamente y diferente de*: Compara palabras exactas, considerando si se teclearon en mayúsculas o minúsculas. Esto significa que dos palabras idénticas, una tecleada en mayúsculas y la otra en minúsculas, le parecerán diferentes a esta opción de búsqueda. Para realizar una búsqueda que no considerará esta condición, usar la opción “contiene” o “no contiene” según sea conveniente.
- *Imprimir*: Produce una salida de impresión a una impresora especificada o a un archivo ASCII.
- *Volver*: Vuelve al MENÚ DE UROCULTIVOS.

Opciones

Permite configurar las siguientes posibilidades:

- Salida de impresión automática tras la medición del antibiograma.
- Habilitar o inhabilitar la señal acústica de interrupción del urocultivo.
- El uso de colores en el informe de pantalla.
- El tiempo que transcurrirá entre las lecturas de urocultivo primera y siguiente. (4:00 horas por defecto en el programa).

Compensar

Elección del usuario de fijar la referencia 0 de McFarland para mediciones del crecimiento microbiano. El procedimiento se lleva a cabo usando un vial que contiene medio de cultivo no inoculado.

Consecutivo

Permite configurar el número consecutivo para los nuevos casos de urocultivo siempre que la configuración no interfiera con un urocultivo existente no leído.

Esta opción se hace útil cuando se requiere comenzar el recuento del urocultivo en un número diferente de 1, por ejemplo, para comenzar desde 50, 100, etc.

Nota: El programa trata el número consecutivo como el “consecutivo del día”. Cuando se detecta un cambio de fecha, el sistema, por defecto, fijará el número consecutivo a 1.

Ayuda

Muestra al usuario información sobre el sistema y cada una de sus opciones y operaciones.

Volver

Vuelve al MENÚ PRINCIPAL.

ES 2 322 679 T3

Menú de antibiograma

ATB: Menú de antibiograma

- 5 Tras seleccionar el icono ATB en el menú principal, se proporcionará un submenú adicional con 12 operaciones básicas requeridas para esta prueba.

Descripción de opciones

10

Leer ATB

15

Permite la lectura de un antibiograma que determinará el esquema de sensibilidad a antibióticos de un germen dado.

20

Como primera etapa, el sistema comprobará automáticamente si el sensor se ha aclarado y compensado y si la bomba peristáltica está funcionando de manera apropiada. Este procedimiento es transparente para el usuario si no se encuentran problemas. Cualquier malfuncionamiento detectado se comunicará al usuario.

25

Cuando va a ejecutarse el primer ATB de un día, el sistema avanzará con el fin de compensar el punto de operación electrónica del sensor de microflujo. Para cumplir este requisito, un procedimiento paso a paso totalmente interactivo guiará al operario a través del procedimiento.

Una vez se finaliza el ajuste, el sistema enviará un informe con la “constante de compensación” que es un valor numérico que se encontrará normalmente por debajo de 2,00. Sin embargo, se aceptarán valores por encima de 2,00 pero menores de 2,50 y se avisará al usuario sobre la conveniencia de instalar un nuevo sensor.

30

En caso de cumplirse todos los requisitos técnicos, se presentará un formulario de edición, en el que pueden teclearse los datos generales del caso.

Se harán disponibles los siguientes campos:

35

- Historia del caso

- Nombres

- Apellidos

40

- Edad

- Sexo

45

- Fecha de la prueba

- Muestra *

- Descripción

50

- Microorganismo *

- Área *

55

- Doctor

- Hospitalizado

- Fallecido

60

Ahora se encuentran disponibles dos comandos:

- *Cancelar*: Vuelve al menú de ATB.

65

- *OK*: Seleccionar esta opción llevará al usuario al entorno de medición en el que su número de caso identifica cada antibiograma. Una señal de tono de baja frecuencia, junto con un mensaje de “Insertar sensor” en la barra de título de la ventana, indicarán insertar el sensor en el primer pocillo. Un tono de mayor frecuencia

y un mensaje de “Retirar sensor” indicarán que se ha realizado la medición correspondiente y que debe retirarse el sensor del pocillo actual e insertarse en el siguiente. Este procedimiento se repetirá para cada pocillo en la tira. El conjunto de antibióticos en uso y el número de caso se visualizarán en esta ventana. Durante las mediciones, el sistema controla constantemente cualquier error de operación posible, proporcionando instrucciones para solucionar cualquier conflicto que pueda surgir.

El ciclo de lectura se ilustra en el siguiente diagrama:

Ciclo de lectura

Mensaje: *Insertar sensor* + tono bajo => sensor dentro del pocillo + leer el resultado.

Mensaje: *Retirar sensor* + tono alto => retirar sensor del pocillo actual y saltar al siguiente pocillo.

Durante las mediciones, se encuentran disponibles las siguientes acciones:

- *Anterior*: Esta opción permite realizar una nueva lectura del pocillo que es anterior al actual. Se usa con el fin de corregir errores de lectura.
- *Siguiente*: Salta al siguiente pocillo. Se ignorará la lectura actual.
- *Abortar*: Cancela la medición del antibiograma actual.

Cuando se ha leído el conjunto completo, se mostrará una nueva ventana con los resultados del antibiograma, en la que se clasifica la tolerancia del germen a cada antibiótico como *SENSIBLE*, *INTERMEDIA* o *RESISTENTE*. Para cada antibiótico sometido a prueba, se muestra en unidades el porcentaje de inhibición. El algoritmo de normalización fijará en 1000 unidades el valor patrón del pocillo control negativo.

Se tendrán en cuenta tres parámetros adicionales, el crecimiento mínimo permitido, el índice de crecimiento y el factor de inhibición con el fin de clasificar los resultados de los antibiogramas según tres posibilidades:

- *Antibiograma satisfactorio*: Los datos medidos y los resultados finales son fiables.
- *Antibiograma no fiable*: No se ha alcanzado el crecimiento mínimo permitido.
- *Antibiograma inservible*: Un análisis matemático del factor de inhibición muestra un conjunto de datos anómalo.

URO-ATB

Vincula un urocultivo a un antibiograma. Esta opción se usa cuando se realiza un antibiograma de una muestra de orina positiva con el fin de recibir los datos del paciente. Para seleccionar el caso al que se le va a realizar la prueba, solamente se requieren el número consecutivo y la fecha de la prueba. Estos casos se identifican entonces mediante la designación URO-ATB y el correspondiente número consecutivo en la base de datos de urocultivos.

McFarland

Activa el calibrador McFarland para el control del crecimiento microbiano.

Base de datos

Permite presentar y procesar los datos almacenados de los casos de antibiograma. El procedimiento es similar al descrito en el “MENÚ DE UROCULTIVOS” (base de datos).

Opciones

Las mismas que en el menú URO. Permite configurar las siguientes posibilidades:

- Salida de impresión automática tras la medición de antibiogramas.
- Habilitar o inhabilitar la señal acústica de interrupción de urocultivos.

ES 2 322 679 T3

- El uso de colores en el informe de pantalla.
- El tiempo que transcurrirá entre las lecturas de urocultivo primera y siguiente. (4:00 horas por defecto en el programa)

Antibióticos

Permite al operador borrar, modificar o usar un conjunto ya existente de antibióticos o crear uno nuevo. El esquema de antibióticos definido por el cliente debe coincidir exactamente con los discos de antibióticos existentes en la placa o tira. Seleccionar la opción “Antibióticos”, traerá las siguientes posibilidades:

- *Nuevo*: Permite crear un esquema para un nuevo conjunto de antibióticos. Tras la selección, se le pedirá al usuario el número de tiras y el número de pocillos por tira con el fin de constituir el esquema correspondiente (normalmente 2 x 8). A continuación se visualizará una ventana con el fin de rellenar el nombre del conjunto y seleccionar, a partir de una lista proporcionada, cada uno de los antibióticos que se usarán.
- *Ver*: Permite visualizar o imprimir un conjunto específico de antibióticos.
- *Modificar*: Cambia la distribución o borra antibióticos de un conjunto específico.
- *Borrar*: Borra un conjunto completo de antibióticos.
- *Hacer actual*: Esta opción predetermina el conjunto de antibióticos que se usará para los siguientes antibiogramas. Para cambiar la configuración actual, debe seleccionarse el conjunto deseado y activarse la opción “Hacer actual” tras realizarse la selección.
- *Seleccionar todo*: Selecciona cada conjunto de antibióticos existente.
- *Deseleccionar*: Deselecciona cada conjunto de antibióticos seleccionado anteriormente.
- *Volver*: Vuelve a la opción anterior.

Estabilidad

Se usa este procedimiento para someter a prueba el rendimiento del sensor. Se calculan parámetros estadísticos tales como el valor medio, la desviación estándar y el coeficiente de varianza de un conjunto de 16 muestras idénticas. Se almacenan los resultados en una base de datos específica de la que pueden recuperarse para visualización o impresión a elección del usuario.

Para realizar esta prueba, se usa agua destilada para cada una de las 16 mediciones.

Los valores esperados para estos parámetros estadísticos son:

2000 < Valor medio: < 3000

Desviación estándar < 20

Coeficiente de varianza < 2,00

Limpiar el sensor

Además de los procedimientos de limpieza sistemáticos diarios indicados automáticamente por el programa del sistema, puede llevarse a cabo un procedimiento de limpieza del sensor a elección del usuario en el que la duración de cada etapa puede programarse manualmente. El ciclo de limpieza completo está compuesto por tres etapas básicas.

- 1) Se suministra una dilución de detergente biológico al sensor de flujo usando la bomba peristáltica.
- 2) Agua destilada sustituye al detergente biológico para aclarar el sensor.
- 3) Se deja pasar un periodo de tiempo con el fin de lavar el sistema completo.

Calibrar

Ejecuta el procedimiento de calibración para el sensor de microflujo. Con el fin de actualizar el rendimiento del sistema, debe realizarse una calibración cada vez que se instale un nuevo sensor o con la periodicidad indicada por el programa.

La calibración es un procedimiento por medio del que se establece el nivel de respuesta de cada sensor a un crecimiento bacteriano predeterminado (0,5 de McFarland). No es una rutina diaria y se recomienda realizar la calibración cada una y todas las veces que el programa recomiende esta acción con el fin de mantener una sensibilidad y respuesta estandarizadas.

Para realizar la calibración, inocular un frasco con *Staphylococcus aureus* con un índice de crecimiento de 0,5 de McFarland (C+) según el calibrador McFarland del sistema. Usar un segundo frasco con medio de cultivo estéril con el fin de obtener un índice 0 de McFarland (C-).

Seleccionar “calibrar” del menú ATB y seguir el procedimiento interactivo con el fin de realizar tres lecturas alternas de un (C+) seguido de un (C-).

El sistema calculará un valor medio para las tres mediciones y se almacenará el resultado final tras seleccionar “OK”.

Comprobar el flujo

Este procedimiento auxiliar ayuda al operador mientras que comprueba la cantidad y estabilidad del flujo proporcionado por la bomba peristáltica, puesto que una falta de continuidad o un flujo incorrecto puede provocar errores durante las mediciones.

Se comprueba el flujo usando una probeta graduada de 10 mililitros y un recipiente con agua destilada.

Para realizar la comprobación, insertar ambos extremos del tubo flexible en un recipiente lleno de agua destilada. Seleccionar el comando “Avanzar”, disponible dentro de la opción “Comprobar el flujo” del menú ATB. El procedimiento interactivo le guiará a través de todo el procedimiento. Una vez finalizado, verificar que el flujo obtenido es aproximadamente de 2,4 ml/min.

Si no se alcanza el volumen esperado, comprobar el tensor del casete y la tensión del tubo flexible de silicona dentro del casete. Comprobar también las condiciones técnicas del tubo flexible de silicona, especialmente de la sección dentro del casete que está en contacto mecánico con los rodillos de la bomba. Si el tubo flexible está extremadamente dañado o atascado, instalar uno nuevo.

Ayuda

Muestra información sobre el sistema y cada opción.

Volver

Vuelve al menú principal.

*Ejemplo 6**Resultados de los ensayos clínicos llevados a cabo en Cuba*

Se analizó un total de 567 muestras de orina para determinar la presencia de un número significativo de uropatógenos, usando el sistema de la presente invención, y apareando los resultados con los obtenidos mediante el procedimiento de referencia CLED (procedimiento de placa de cultivo semicuantitativo de Claridge). Según el análisis, 126 eran positivas mediante CLED, mientras que 108 eran positivas usando el presente sistema en sólo 4 horas, mientras que los resultados del procedimiento CLED estuvieron listos tras 24-48 horas tras la inoculación del medio de cultivo. El presente sistema era eficaz en un 86,1% para la detección de muestras positivas en sólo 4 horas tras la inoculación de las muestras.

De 441 muestras que se encontró que eran negativas mediante el procedimiento CLED, el presente sistema pudo detectar 440 negativos en un periodo de 4 horas, para una eficacia del 99,8%. La correlación general entre el presente sistema y el procedimiento CLED tradicional era del 89,1%.

Ejemplo 7

Resultados de ensayos clínicos llevados a cabo en Canadá

En total, se han investigado 1.016 muestras de orina de una manera prospectiva. Se compararon los resultados obtenidos con el sistema con el procedimiento de placa de cultivo semicuantitativo de Claridge, usado como procedimiento de referencia para la detección de bacteriuria. Para el cultivo de rutina, se suministraron 0,0001 ml de orina a una placa de agar CLED usando un asa de siembra desechable calibrada. Este procedimiento detecta ≥ 1000 unidades formadoras de colonias/ml (ufc/ml).

Se realizaron lecturas de turbidez a las 2, 3, 4 y 5 horas tras la inoculación. En total, hubo 184 muestras positivas ($\geq 0,4$ unidades McFarland). La distribución del tiempo y la correlación con el cultivo de rutina de estas muestras se muestra en la tabla 1.

TABLA 1

Tiempo (horas)	Número detectado	Correlación con el cultivo de rutina, %
2	32	97
3	80	88
4	52	87
5	20	65
Total	184	86,4

Por tanto, la sensibilidad global del presente sistema era del 86,4%, y la especificidad (es decir, la capacidad de detectar muestras realmente negativas tal como se define mediante el cultivo de rutina) era del 98,5%.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el esquema integral del equipo de la presente invención, en una visión general. Tal como se muestra, este equipo se basa en un lector turbidimétrico de microflujo (1), que se alimenta mediante una bomba (2) peristáltica y se ajusta a un equipo (3) electrónico de alta sensibilidad que detecta cambios turbidimétricos de (1) a través de un procedimiento de medición que permite usar un grupo de algoritmos para detectar pequeñas variaciones turbidimétricas y procesar de manera apropiada los datos obtenidos. Está formado por un circuito (4) de medición turbidimétrico conectado a través de una tarjeta de interfaz a una unidad (5) de procesamiento central. Esta unidad recibe todos los comandos (6) de teclado y proporciona los resultados en un monitor (7). Puede detectar las variaciones más pequeñas de turbidez que se producen en el medio de cultivo inoculado en la muestra que se someterá a prueba.

La figura 2 representa un esquema detallado de la estructura interna que pertenece al lector (1) turbidimétrico de la figura 1. La pequeña boca (8) del lector se introduce en la muestra que va a someterse a prueba que entonces se hace circular a través del mismo con ayuda de la bomba (2) peristáltica de la figura 1. La cámara de medición está compuesta por un tubo (9) de plástico introducido en un capilar (10) de vidrio. El paso (11) de luz es el diámetro del orificio a través del que la luz procedente del fotoemisor (12) debe cruzar para llegar a la cámara (9 y 10) de medición. La intensidad de la radiación luminosa, transmitida a través de la cámara (9 y 10) de medición, dependerá del grado de turbidez de la muestra y se mide mediante un fotodetector (13). La radiación producida por el fotoemisor (12) se estabiliza por medio de un bucle electrónico de control automático convencional.

La figura 3 muestra el funcionamiento del lector turbidimétrico a través de un diagrama de flujo. En primer lugar, se verifica la presencia del lector turbidimétrico por medio de la subrutina de detección y si está presente, se comprueba entonces la existencia de la bomba peristáltica que es necesaria para el funcionamiento del lector turbidimétrico y para la subrutina de ejecución de la limpieza, estableciendo además el flujo de funcionamiento requerido. Una vez se han regulado todos los parámetros de funcionamiento, el lector turbidimétrico estará listo. Cualquier subrutina que se infrinja impedirá que el lector funcione.

La figura 4 muestra los componentes del kit de diagnóstico, constituido por un vial que contiene medio de cultivo y el polímero, el soporte de la tira y la tira usados para la determinación del antibiograma de la muestra que va a someterse a prueba.

ES 2 322 679 T3

La figura 5 muestra dos pantallas relacionadas con el programa que sigue los procedimientos principales para la ejecución del procedimiento objeto de la presente invención.

Pantalla de menú principal (5A): Constituye el punto de partida para todas las operaciones que se realizan cuando éstas se activan.

Nueve iconos definen las opciones disponibles dentro del menú principal, desde los que se controlan todas las acciones del sistema. Éstos son:

URO: Activa el menú de iconos de urocultivos.

ATB: Activa el menú de iconos del antibiograma.

McFarland: Permite medir el contenido del vial en la unidad de calibración (escala de McFarland).

Base de datos: Permite acceder a la base de datos de antibiogramas o urocultivos.

Opciones: Cambiar la configuración del sistema.

Información: Muestra información administrativa del sistema.

DIRAMIC: Ofrece la dirección de la producción del sistema.

Ayuda: Facilita información de la opción actual.

Salir: Abandonar el sistema.

Pantalla de menú de urocultivos (5B): Representa un menú específico para el tratamiento particular de los urocultivos, que contiene las operaciones que van a realizarse durante estas pruebas, como representación de las opciones principales facilitadas por el menú principal.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el diagnóstico microbiano en orina, que comprende las siguientes etapas:

- a) se inocula una alícuota de una muestra de orina obtenida directamente de su fuente en un vial de vidrio que contiene medio de cultivo, un polímero y sustratos MU- β -D-glucurónido y L-triptófano, ambos solubilizados en fosfato de potasio 50 mM, pH de 7 a 7,5,
- b) se determina la turbidez de dicho vial a tiempo = 0;
- c) se incuba el vial entre 2 y 6 horas a una temperatura entre 35°C y 37°C;
- d) se determina el índice de crecimiento entre tiempo 0 y el tiempo de incubación seleccionado y se discriminan las muestras positivas de las negativas dependiendo del aumento de la turbidez, siendo positivas aquellas muestras con aumentos superiores a 0,08 unidades McFarland, de las que se toman alícuotas para etapas adicionales;
- e) se toma una alícuota de una muestra positiva de la etapa d) y se transfiere a un nuevo vial de vidrio que contiene medio de cultivo recién preparado, que se dispensa en un volumen de 200 μ l en cada micropocillo de una tira no transparente que contiene dos posiciones libres para controles negativo y positivo, que se llenan con medio de cultivo solo y medio de cultivo inoculado respectivamente, y de 10 a 22 posiciones en las que se organizan discos de antibióticos, y se incuba entre 3 y 4 horas a una temperatura entre 35°C y 37°C;
- f) se lee la tira colocando un lector turbidimétrico de microflujo, que se alimenta mediante una bomba peristáltica, en cada micropocillo siguiendo las instrucciones emitidas por un paquete de programas informáticos para la adquisición y el procesamiento de datos y la creación de bases de datos diseñadas para ese fin, en el que el lector turbidimétrico de microflujo comprende un fotoemisor, un fotodetector y una cámara de medición, en el que dicha cámara de medición está compuesta por un tubo de plástico introducido en un capilar de vidrio, estando iluminada la cámara de medición mediante una luz emitida desde dicho fotoemisor y que pasa a través de dicha cámara de medición;
- g) a partir de los valores de densidad obtenidos, se calcula el índice de crecimiento en los controles, y se calculan los porcentajes de inhibición para cada muestra para cada antibiótico;
- h) según el nivel de inhibición mostrado por las muestras, se adjudican los criterios de sensible, resistente o intermedio, entre valores de inhibición en un intervalo del 60% al 100%, en el que las muestras con un porcentaje de inhibición inferior al 60% pueden considerarse resistentes, las que muestran valores entre el 60% y el 80% pueden considerarse sensibles en un nivel intermedio y las que se inhiben entre el 80% y el 100% se consideran sensibles al antibiótico sometido a prueba;
- i) se somete una alícuota tomada de la etapa d) a una fuente de luz U.V., con el fin de detectar la fluorescencia generada debido a la liberación de 4-metilumbeliferona, y el desarrollo de la formación de indol usando un reactivo de Kovacs modificado, constituido por 2 g de paradimetilaminobenzaldehído diluido en etanol y 20 ml de ácido clorhídrico concentrado, para la detección de la actividad enzimática MU-beta-D-glucuronidasa y triptofanasa producida por *E. coli*;
- j) para aquellas muestras en las que no se identificó *E. coli* en la etapa i), se somete la alícuota anteriormente obtenida en la etapa d) al procedimiento de aislamiento e identificación tradicional.

2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo es caldo Mueller-Hinton OXOID modificado.

3. Equipo adecuado para llevar a cabo la determinación del antibiograma en las etapas f) a h) del procedimiento según la reivindicación 1 ó 2 que comprende:

- (1) un lector turbidimétrico de microflujo (1) que comprende un fotoemisor (12), un fotodetector (13) y una cámara (9 y 10) de medición, en el que dicha cámara de medición está compuesta por un tubo (9) de plástico introducido en un capilar (10) de vidrio, estando iluminada la cámara de medición mediante una luz emitida desde dicho fotoemisor y que pasa a través de dicha cámara de medición;
- (2) una tira no transparente que contiene micropocillos;
- (3) una bomba (2) peristáltica para hacer circular una muestra a través de la cámara de medición del lector turbidimétrico de microflujo; y un ordenador (5) que tiene un paquete de programas para la adquisición y el procesamiento de datos y la creación de bases de datos;

ES 2 322 679 T3

en el que

el lector turbidimétrico de microflujo está conectado al ordenador mediante una tarjeta de interfaz y

5 dicho lector turbidimétrico de microflujo incluye una parte (8) de boca adecuada para la introducción en una muestra en un micropocillo de la tira no transparente que va a someterse a prueba haciendo circular una muestra a través de dicha cámara de medición mediante la acción de dicha bomba peristáltica.

10 4. El equipo según la reivindicación 3, en el que las tiras no transparentes incluyen dos posiciones libres para controles positivo y negativo, y también otras de 10 a 22 posiciones en las que pueden colocarse discos de antibióticos según la opción del usuario.

5. El equipo según la reivindicación 4, en el que las tiras no transparentes incluyen discos de antibióticos.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

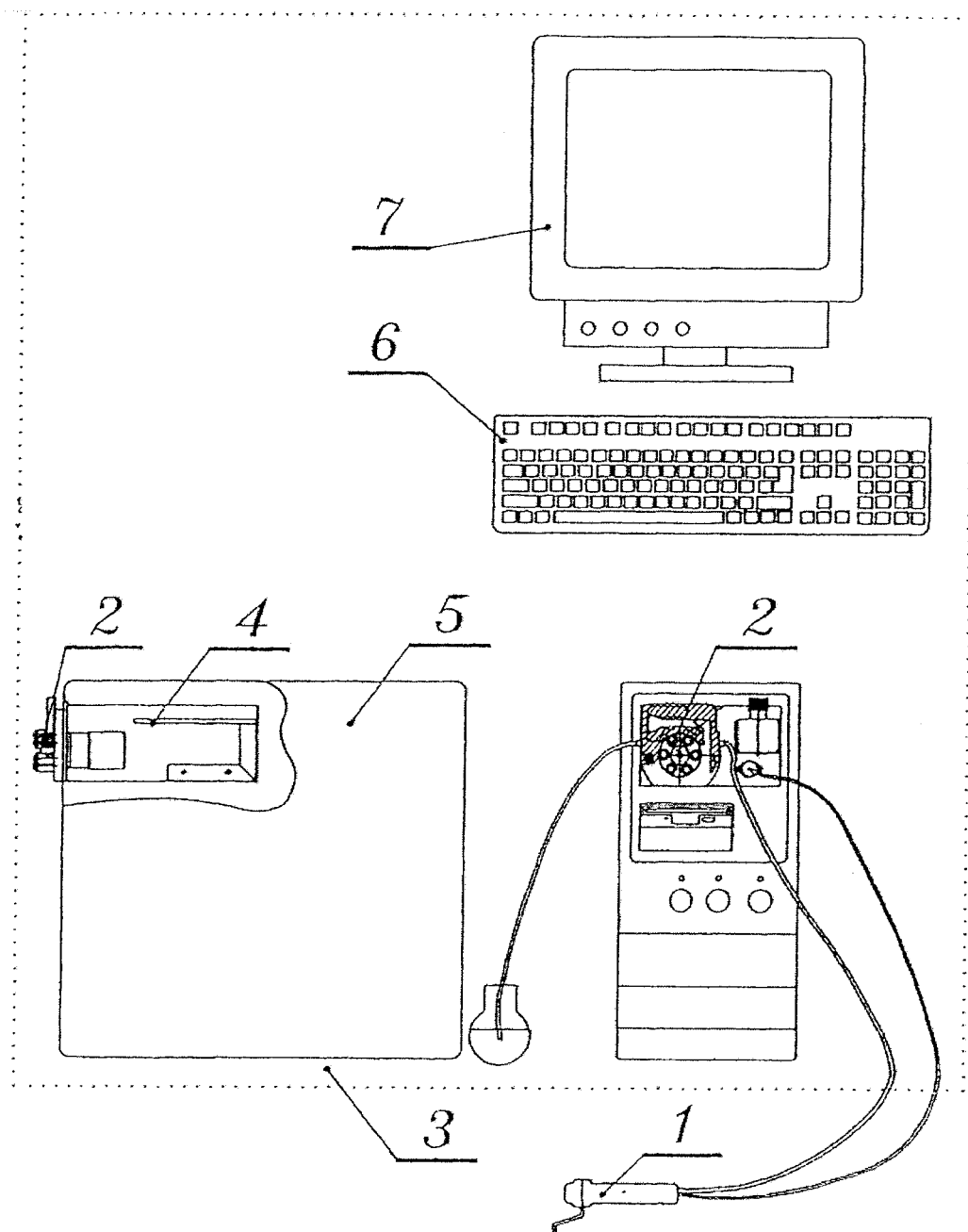


Figura 1

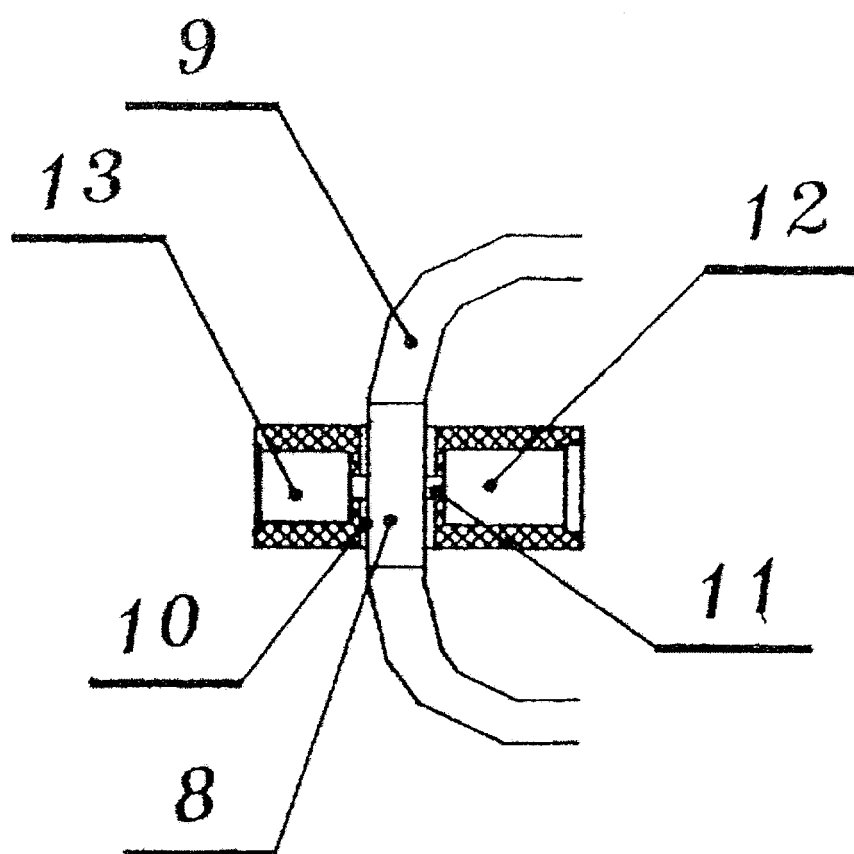


Figura 2.

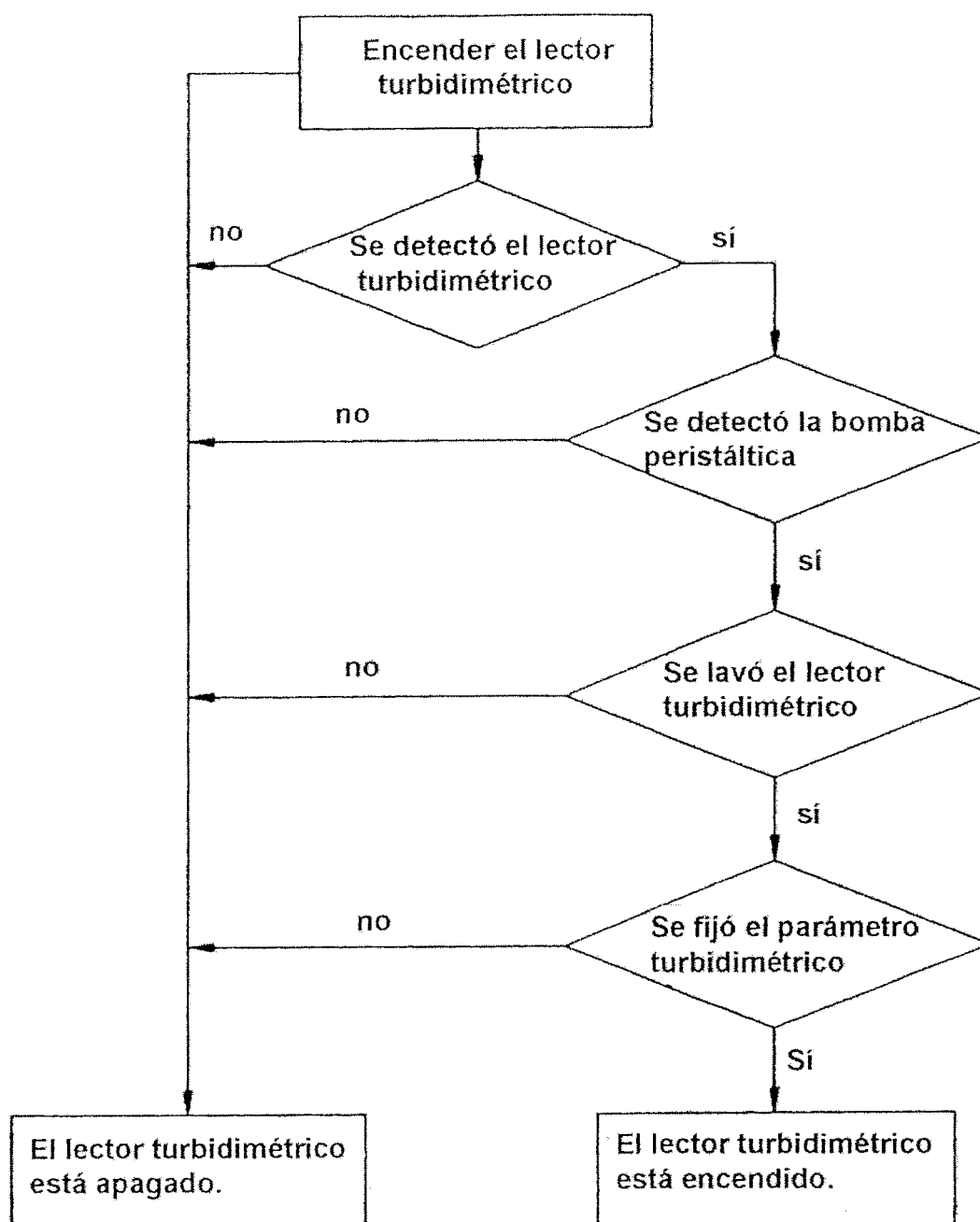


Figura 3.

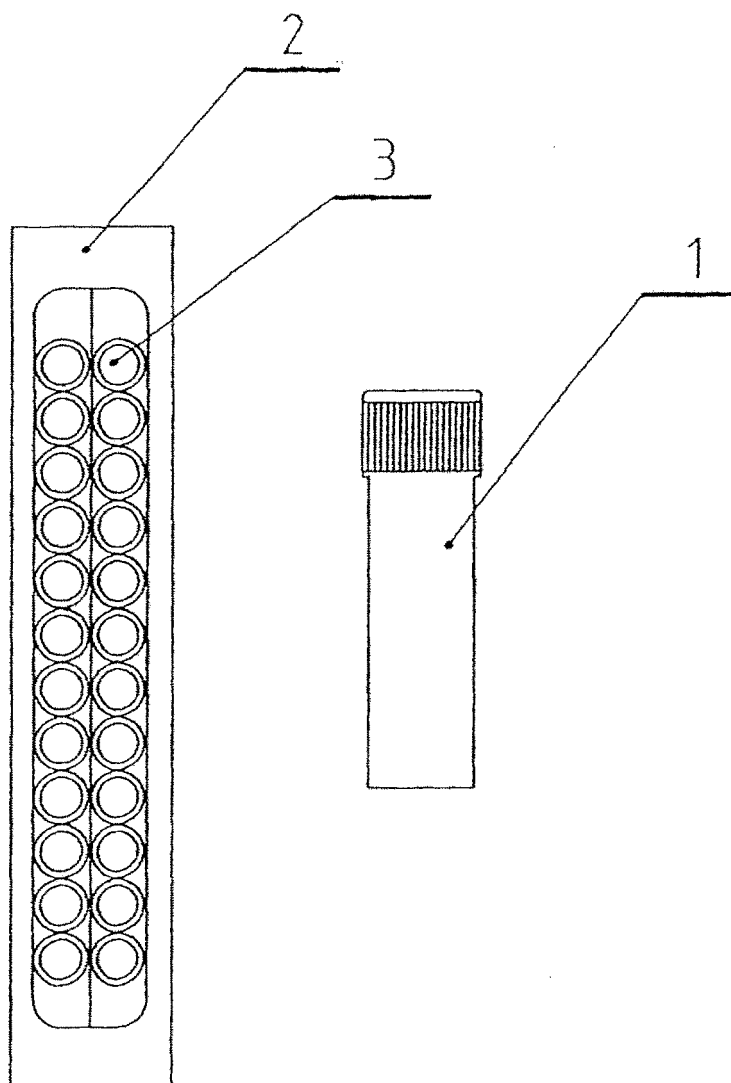
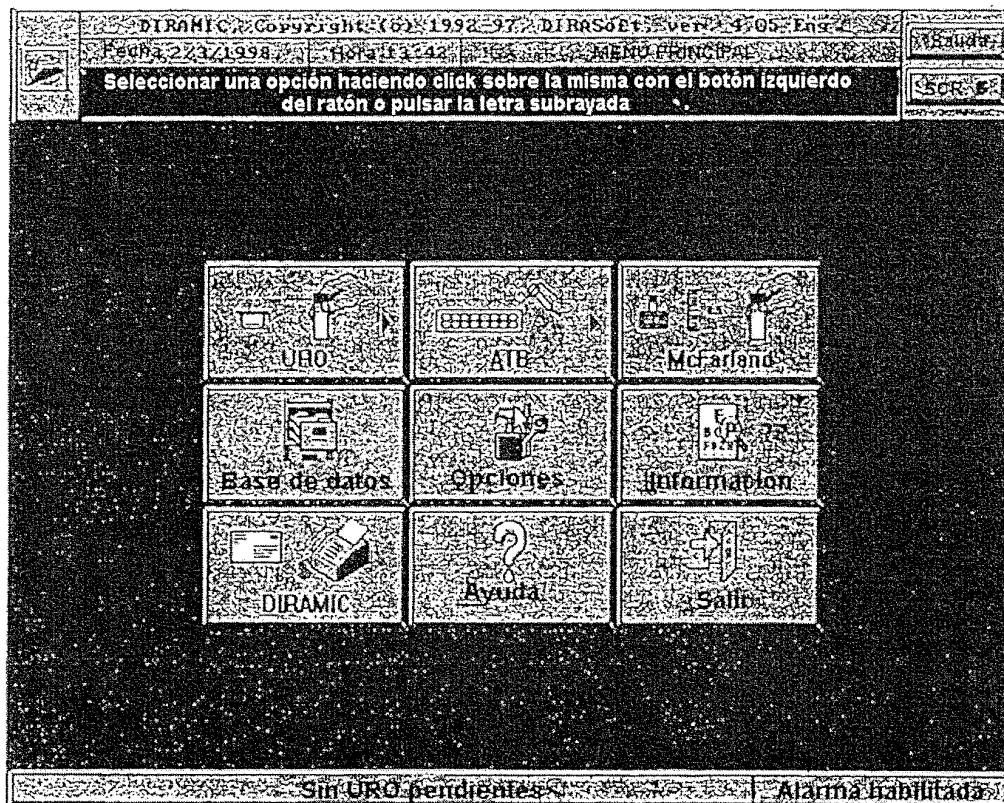


Figura 4.

1. Vial con medio de cultivo; 2. Soporte de la tira; 3. Tira.

Figura 5

(5A) Pantalla de menú principal:



(5B) Pantalla de menú de urocultivos:

