

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 227**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/18 (2006.01)

C12M 1/16 (2006.01)

C12M 1/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2013 PCT/EP2013/001667**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013 WO13185896**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2013 E 13728964 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2859116**

54 Título: **Dispositivo para la normalización del ensayo de sinergia in-vitro de dos antibióticos a través del procedimiento de cruzado de tiras de gradiente**

30 Prioridad:

11.06.2012 IT AN20120069

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.01.2017

73 Titular/es:

**LIOFILCHEM S.R.L. (100.0%)
Via Scozia- Zona Industriale
64026 Roseto Degli Abruzzi (TE), IT**

72 Inventor/es:

BROCCO, SILVIO

74 Agente/Representante:

ARPE FERNÁNDEZ, Manuel

ES 2 597 227 T3

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

Dispositivo para la normalización del ensayo de sinergia *in-vitro* de dos antibióticos a través del procedimiento de cruzado de tiras de gradiente.

Antecedentes de la invención

[0001] En medicina, a fin de combatir un germen resistente, a menudo es necesario administrar a un paciente uno o dos antibióticos al mismo tiempo, por lo que en primer lugar es esencial para llevar a cabo una prueba de sinergia con el fin de verificar su compatibilidad y su efecto asociado.

[0002] La prueba de la sinergia de dos antibióticos realizada en un medio de cultivo bacteriano es, de hecho, esencial para el propósito de verificar:

- Un efecto antagonista de los dos antibióticos a administrar al paciente, en el sentido de que las dos moléculas antibióticas combinadas conjuntamente producen un efecto menor del que producirían si se consideran individualmente;

- Un efecto sinérgico de los dos antibióticos a administrar al paciente, en el sentido de que las dos moléculas de antibióticos combinadas conjuntamente producen un efecto mayor que la suma de los efectos individuales de las dos moléculas;

- Un efecto aditivo de los dos antibióticos a administrar al paciente, en el sentido de que las dos moléculas de antibióticos combinadas conjuntamente producen un efecto que es igual a la suma de los efectos individuales de las dos moléculas;

- Un efecto indiferente de los dos antibióticos a administrar al paciente que se produce cuando las dos moléculas antibióticas, aun cuando se combinen conjuntamente, no producen un efecto mejorado en comparación con el que se habría producido si se consideran individualmente.

[0003] En el estado actual de la técnica, hay diferentes procedimientos para las pruebas de sinergia entre las moléculas antibióticas: letalidad para macrodilución en caldo¹, placa reticulada para microdilución en caldo², sustitución de tiras de gradiente antimicrobiano sobre cultivo microbiano a través de difusión en agar³, cruzado de tiras de gradiente antimicrobiano en cultivo microbiano a través de difusión en agar⁴. ^{1, 2, 4} *Comparación de tres diferentes métodos in vitro de detección de sinergia: letalidad, placa reticulada, y E-test.*

[0004] R L White, D S Burgess, M Manduru and J A Bosso *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996, 40(8):1914.

R L White, D S Burgess, H y J Manduru Un Bosso *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996, 40 (8): 1914.

[0005] ^{1, 2, 3} *Comparación de estudios de E-test, dilución en placas de retícula y letalidad para la detección de sinergia o antagonismo entre agentes antifúngicos ensayados contra especies de *Candida*.*

[0006] Lewis, R., Diekema, D., Messer, S., Pfaller, M. y Klepser, M. (2002). *JAC.* 49: 345- 351.

[0007] La determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de un agente antimicrobiano frente a un microorganismo mediante la utilización de tiras graduadas impregnadas con gradiente antimicrobiano, consiste en depositar una tira, hecha de un material poroso o no poroso sobre una población microbiana en un medio de cultivo de agar. La tira de antibiótico libera el antibiótico de acuerdo con el gradiente predefinido, y después de un período de incubación de 18 o más horas, puede observarse una zona de inhibición elíptica, simétrica y centrada a lo largo de la tira.

[0008] El valor de la CIM, expresada en µg/ml, es leída en el punto de intersección entre el borde inferior de la elipse de inhibición y la tira.

[0009] La prueba de sinergia de dos agentes antimicrobianos a través de la utilización de la tira de gradiente con el procedimiento de cruzado de tiras en un medio de cultivo microbiano implica, en primer lugar la determinación de la MIC para cada antibiótico; entonces, las tiras de los dos antibióticos se colocan perpendicularmente sobre el cultivo bacteriano. Las dos tiras deben cruzar en el punto correspondiente a los valores de CIM de los dos agentes antimicrobianos individuales previamente determinados. Después de la incubación, el nuevo CIM de cada antibiótico se evalúa y se calcula el efecto combinado de los mismos utilizando el siguiente algoritmo ^{5, 6}:

Definiciones:

CIM_A = CIM del antibiótico A

CIM_B = CIM del antibiótico B

CIM_{AB} = CIM del antibiótico A en presencia del antibiótico B;

CIM_{BA} = CIM del antibiótico B en presencia del antibiótico A.

[0010] El índice CIF (índice de concentración inhibitoria fraccionada) se calcula como:

Índice CIF = CIM_{AB}/CIM_A + CIM_{BA}/ CIM_B

Sinergia CIF ≤ 0.5

Efecto aditivo CIF > 0,5 y ≤ 1.0

Indiferencia CIF > 1 y ≤ 4

Antagonismo CIF > 4

⁵ Comparación de las técnicas de medición de sinergismo antibiótico in vitro. Norden, C. W., Wentzel, H., Keleti, E. J. Infect. Dis. 140: 629-633, 1979.

⁶ Correlaciones entre métodos para medición de sinergia. Berenbaum, M. C. 1980. J. Infect. Dis. 142: 476-480.

[0011] La precisión de este procedimiento de ensayo de sinergia depende del cruzado correcto de las dos tiras de gradiente antimicrobiano que deben estar perfectamente perpendiculares. El comportamiento de este ensayo es propenso a errores por parte del operario, que accidentalmente podría fallar en colocar las tiras en un ángulo de 90° o dejar de señalar el punto de cruzado correcto al depositar manualmente la segunda tira en la parte superior de la primera, lo que daría como resultado una ensayo a repetir o a obtención de resultados poco fiables.

[0012] La intersección de las tiras a 90°, es la condición requerida para la evaluación correcta de los anillos de inhibición y la lectura del valor de la CIM en la tira graduada y el consiguiente cálculo del algoritmo descrito anteriormente.

[0013] El depositar la segunda tira en el punto de cruzado deseado es difícil y propenso a errores porque es práctica común en los laboratorios realizar esta operación de forma manual mediante pinzas de laboratorio, en un intento de lograr una colocación milimétrica en el punto exacto de la tira graduada que corresponde al punto de CIM, expone al operario a imprecisión natural. Una vez que la tira antimicrobiana ha entrado en contacto con el cultivo bacteriano ya no puede quitarse ni tampoco reposicionarse en la medida que el proceso de difusión del antibiótico es inmediato cuando entra en contacto con el agar.

Revelación de la invención

[0014] El objeto de la presente invención es remediar los problemas antes mencionados, ofreciendo un dispositivo para los microbiólogos o técnicos de laboratorio, permitiendo el cruzado de dos tiras de papel graduadas impregnadas con dos antibióticos diferentes exactamente a 90°, lo que facilita la ejecución de las pruebas de sinergia de los antibióticos en un medio de cultivo bacteriano.

[0015] Otro objeto de la presente invención es hacer preciso el ensayo de sinergia, asegurando el cruzado exacto a 90° de dos tiras de papel graduado, impregnadas con dos antibióticos diferentes.

[0016] Otro objeto de la presente invención es la normalización de los procedimientos de ensayo de sinergia con el fin de garantizar la condición de repetible entre laboratorios para dichos ensayos de sinergia y reproducibilidad entre laboratorios.

[0017] Estos y otros objetos se consiguen por la invención que es el objeto de la presente solicitud que se refiere a un dispositivo que hace que sea posible cruzar exactamente bajo un ángulo de 90°, dos tiras de papel graduado cada una de las cuales se impregna con un gradiente de concentración predefinido de un agente antimicrobiano para la determinación del resultado exacto de su efecto sinérgico.

Breve descripción de los dibujos

[0018] Otras características y ventajas de la invención se comprenderán mejor a partir de la descripción de una realización preferida pero no exclusiva de la misma, ilustrada por medio de un ejemplo indicativo pero no limitativo en los dibujos adjuntos en los que:

La figura 1, muestra una vista en planta superior de una base circular (1) con un diámetro de 124 mm que comprende dos ranuras (2a, 2b) que se cruzan exactamente a 90°, escalonadas en altura y teniendo cada una de las cuales una anchura de 6 mm, que corresponde a la anchura de la tira de papel graduado (no mostrada), en las que se hacen deslizar cada una de las antedichas tiras graduadas independientemente entre sí. En el centro de la base circular (1) existe:

- un hueco circular (3) con un diámetro de 20 mm;
- un hueco circular (4) con un diámetro de 4 mm, concéntrico al hueco circular (3);
- cuatro huecos circulares (4a, 4b, 4c, 4d) con un diámetro de 2 mm y una profundidad de 1,5 mm, dispuestos a una distancia de 7,5 mm a partir del centro del hueco circular (4).

La figura 2, es una vista en alzado lateral de la base circular (1) con una anchura de 20 mm, del hueco circular (3) con una profundidad de 0,7 mm y del hueco circular (4) con una profundidad de 5,4 mm.

La figura 3, es una vista axonométrica de la base circular (1), presentando claramente las dos ranuras (2a, 2b) escalonadas en altura, creadas con el fin de permitir que los dos tiras de papel graduado deslicen de forma independiente.

La figura 4 es una vista en planta superior de un colector de pinchado cruciforme desechable (5) en el que se destacan las siguientes características: una aguja/punto central (6) con un diámetro de 8 mm y una altura de 1,4 mm y cuatro agujas/puntos (6a, 6b, 6c, 6d) con un diámetro de 6 mm y una altura de 0,4 mm, situados a una distancia de 7,5 mm desde el centro de la aguja/punto (6).

La figura 5 es una vista en alzado lateral del colector de pinchado cruciforme desechable (5) con un diámetro de 20 mm, equipado con una aguja/punto (6) en el centro, que sirve, una vez insertado en el hueco circular apropiado (3), para pinchar y recoger las tiras de papel graduadas perfectamente cruzadas en un ángulo de 90°, y equipado con

cuatro agujas /puntos adicionales (6a, 6b, 6c, 6d) que sirven para evitar que las tiras giren durante la transferencia desde la base circular (1) hasta el cultivo bacteriano en la placa de Petri.

La figura 6 es una vista axonométrica del colector de pinchado cruciforme desechable (5) mostrando claramente dos bloques cruzados (7a, 7b) capaz de encajar de forma apropiada en las ranuras (2a, 2b) escalonadas en altura en la base circular (1), en el centro del cual hay una aguja/punto (6) y, existiendo cuatro agujas/puntos (6a, 6b, 6c, 6d) a una distancia de 7,5 mm desde el centro de la aguja/punto (6), y un pomo (7) con un diámetro de 12 mm.

Descripción detallada de la invención

[0019] La invención que es el objeto de la presente solicitud se refiere a un dispositivo que consta de una base circular (1) que sirve para el cruzado de dos tiras de papel graduadas y un colector de pinchado cruciforme desechable (5) que sirve para recoger y transferir las dos tiras de papel graduado, cada una de las cuales ha sido impregnada previamente con un gradiente de concentración predefinido de un agente antimicrobiano, desde la base circular (1) 20 mm de altura con el fin de cruzar exactamente bajo un ángulo de 90° en los puntos obtenidos como resultado de las respectivas CIM obtenidas anteriormente, con el fin de determinar una evaluación de sinergia exacta, una vez que se han colocado en un medio de cultivo bacteriano.

[0020] La superficie de esta base circular (1) con un diámetro de 124 mm, presenta dos ranuras (2a, 2b) que se cruzan bajo un ángulo de 90° que tienen una sección rectangular de 6 mm de ancho y están escalonadas en altura.

[0021] La primera ranura (2a) a lo largo de la cual puede hacerse deslizar la primera tira de papel graduada (no mostrada), tiene una profundidad de 3,9 mm, mientras que la segunda ranura (2b) a lo largo de la que puede deslizarse la segunda tira de papel graduada (no mostrada) de forma independiente de la primera, tiene 3,6 mm de profundidad.

[0022] Este efecto de escalonado entre las dos ranuras cruzadas (2a, 2b) se corresponde exactamente con el espesor de una de las dos tiras de papel graduado y es por esta razón que las tiras, una vez colocadas en sus respectivas ranuras cruzadas (2a, 2b), puede deslizarse independientemente entre sí ya que una desliza sobre la parte superior de la otra, de manera que las dos tiras se cruzan mutuamente de manera exacta en los puntos graduados que corresponden a los valores de concentración inhibitoria mínima (CIM), obtenidos anteriormente.

[0023] En la superficie superior de esta base circular (1) existe un hueco circular (3) de 0,7 mm de profundidad que sirve para facilitar el centrado del colector de pinchado cruciforme desechable (5) gracias a que sus dos bloques cruzados (7a, 7b) se ajustan de manera apropiada en las ranuras (2a, 2b) de la base circular (1); este colector de pinchado cruciforme desechable (5) tiene una aguja/punto (6) en el centro con un diámetro de 8 mm y una altura de 1,4 mm, que sirve para pinchar y recoger las dos tiras de papel graduado de la base circular (1) y colocarlas en el medio de cultivo de bacterias en la placa de Petri.

[0024] Con el fin de facilitar la recogida de los dos tiras de papel graduado, se proporciona el montaje de otras cuatro agujas/puntos (6a, 6b, 6c, 6d) con un diámetro de 6 mm y una altura de 0,4 mm para, dichos puntos están posicionados a la misma distancia de 7,5 mm a partir del centro de la aguja/punto (6), con el fin de evitar la posible rotación de las tiras alrededor de la aguja durante la transferencia.

[0025] Concéntrica con el hueco circular (3) de la base circular (1) está el hueco circular (4), que tiene un diámetro de 4 mm y una profundidad de 5,4 mm, el propósito del es el de facilitar la penetración de la aguja del colector de pinchado cruciforme desechable (5) en las dos tiras de papel graduado, para así recogerlas de la base circular (1) y colocarlas en el agar de cultivo bacteriano, exactamente cruzadas en un ángulo de 90°. A la misma distancia de 7,5 mm desde el centro del hueco circular (4) de la base circular (1), existen cuatro huecos circulares (4a, 4b, 4c, 4d), que tienen un diámetro de 2 mm y una profundidad de 1,5 mm, con el fin de, como anterior, facilitar la penetración de las agujas/puntos (6a, 6b, 6c, 6d) del colector de pinchado cruciforme desechable (5) en los dos tiras de papel graduado. La humedad del agar cultivo bacteriano facilitará el desprendimiento de las dos tiras del colector de pinchado cruciforme desechable (5) sin el riesgo de su posición a 90° experimente variaciones.

[0026] Una vez que las tiras mencionadas anteriormente liberan el antibiótico en el agar de cultivo bacteriano, se forma una elipse; después de esto, basándose en los resultados de las CIM obtenidos a partir de la combinación de las dos tiras graduadas, será evaluado el efecto de los dos antibióticos combinados: efecto sinérgico, antagonismo, indiferencia o, efecto aditivo.

[0027] Los materiales y las dimensiones de la invención descrita anteriormente, que se ilustra en los dibujos adjuntos y más tarde afirmó, pueden variarse según las necesidades. Además, todos los detalles pueden ser sustituidos por otros técnicamente equivalentes sin, por esta razón apartarse del alcance de protección de la solicitud de patente de invención presente.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para la normalización del ensayo de sinergia *in-vitro* de dos antibióticos a través de la utilización de tiras de gradiente mediante el procedimiento de cruzado que comprende:

- Una base circular (1) que sirve para el cruzado de dos tiras de papel graduado cada una impregnada con un gradiente de concentración predefinido de un agente antimicrobiano y que tiene sobre su superficie dos ranuras (2a, 2b) que se cruzan bajo un ángulo de 90°;
- un colector de pinchado cruciforme desechable (5) que tiene dos bloques cruzados (7a, 7b) que ajustan apropiadamente en las ranuras (2a, 2b) cruzadas a 90 ° de la base circular (1) y que está equipado en el centro con una aguja/punto (6) y cuatro agujas/puntos (6a, 6b, 6c, 6d) situados a la misma distancia desde el centro de la aguja/punto (6).

2. Dispositivo para la normalización del ensayo de sinergia *in-vitro* de dos antibióticos a través de la utilización de tiras de gradiente mediante el procedimiento de cruzado como se reivindica en la reivindicación 1, caracterizado porque el hecho que las dos ranuras (2a, 2b) cruzadas a 90° de la base circular (1), tienen una sección rectangular de 6mm y están escalonadas en altura, teniendo la primera ranura (2 a) una profundidad de 3,9 mm, mientras que la segunda ranura (2b) tiene una profundidad de 3,6 mm.

3. Dispositivo para la normalización del ensayo de sinergia *in-vitro* de dos antibióticos a través de la utilización de tiras de gradiente mediante el procedimiento de cruzado como se reivindica en la reivindicación 1, caracterizado porque el hecho que sobre la superficie superior de la base circular (1) existe un hueco circular (3) con un diámetro de 20 mm y una profundidad de 0,7 mm para facilitar el centrado del colector de perforación cruciforme desechable (5).

4. Dispositivo para la normalización del ensayo de sinergia *in-vitro* de dos antibióticos a través de la utilización de tiras de gradiente mediante el procedimiento de cruzado como se reivindica en la reivindicación 3, caracterizado porque el hecho que sobre la superficie superior de la base circular (1) existe un hueco circular (4) con un diámetro de 4 mm y una profundidad de 5, 4 mm que es concéntrico al hueco circular (3).

5. Dispositivo para la normalización del ensayo de sinergia *in-vitro* de dos antibióticos a través de la utilización de tiras de gradiente mediante el procedimiento de cruzado como se reivindica en la reivindicación 4, caracterizado porque el hecho que sobre la superficie superior de la base circular (1) equidistantes a 7,75 mm del centro del hueco circular (4), existen cuatro hueco circulares (4 a, 4b, 4c y 4d) con un diámetro de 2 mm y una profundidad de 1,5 mm para facilitar el centrado del colector de perforación cruciforme desechable (5).

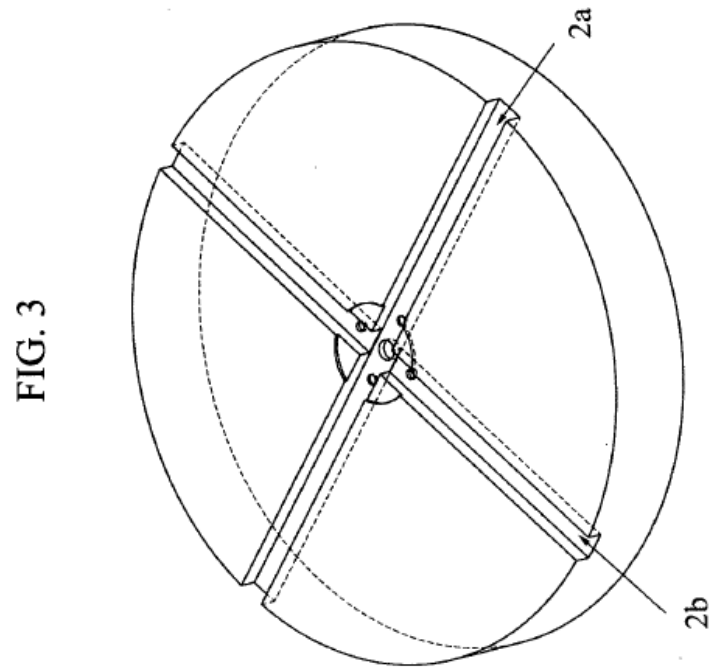


FIG. 3

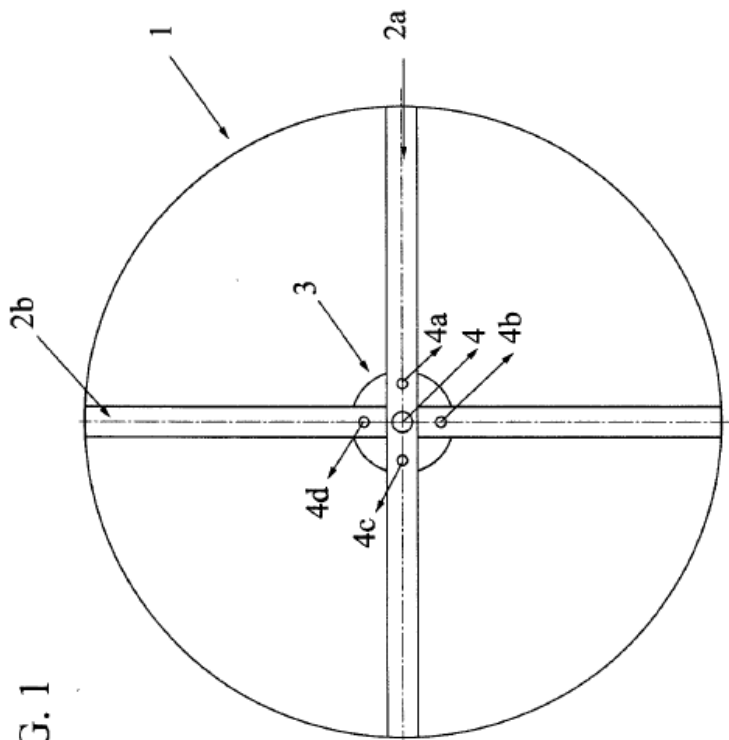


FIG. 1

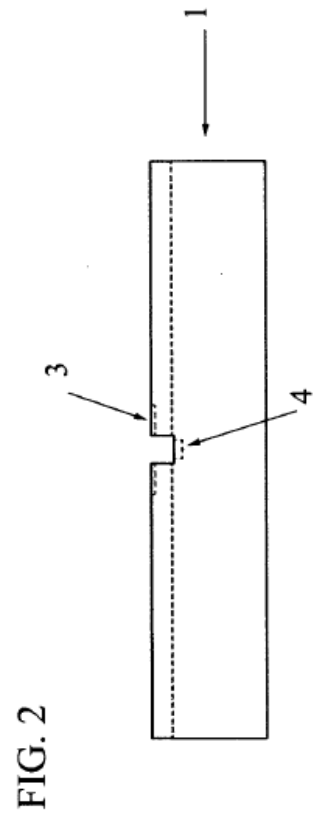


FIG. 2

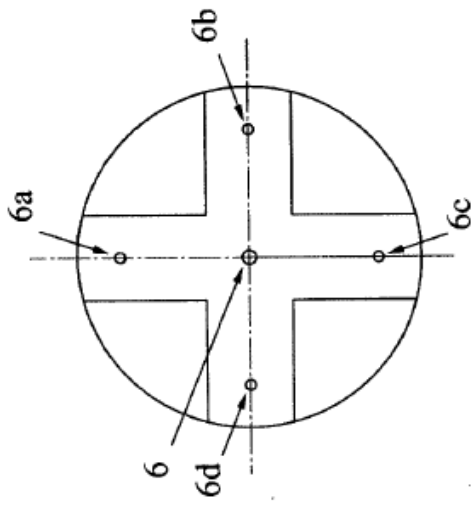


FIG. 4

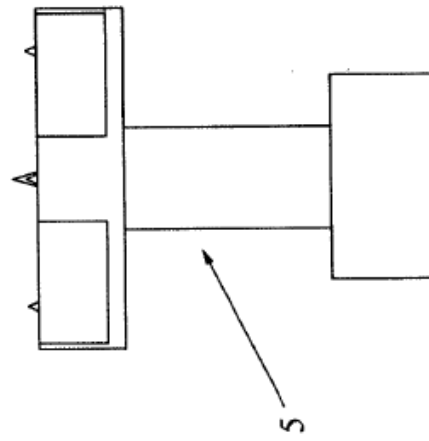


FIG. 5

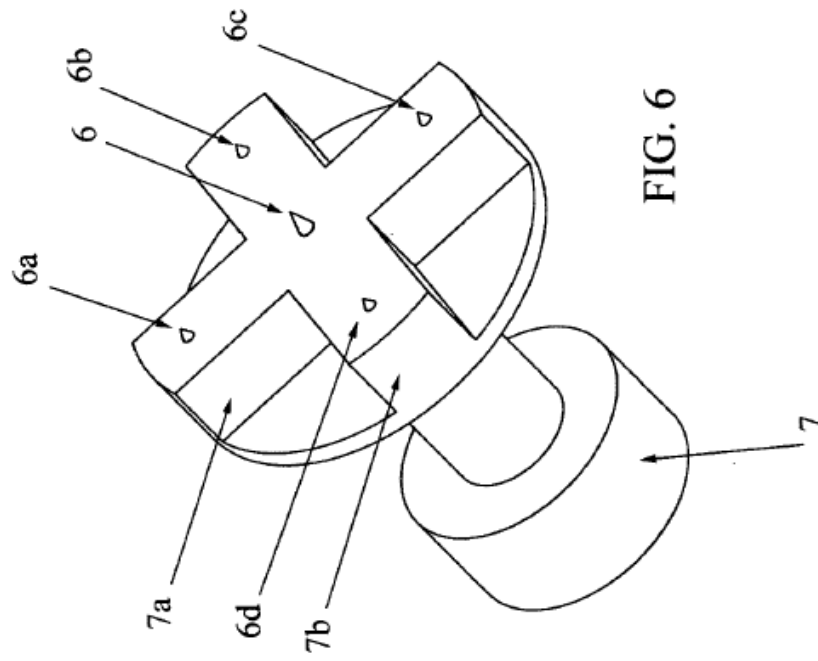


FIG. 6

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citada por el solicitante lo es solamente para utilidad del lector, no formando parte de los documentos de patente europeos. Aún cuando las referencias han sido cuidadosamente recopiladas, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Bibliografía no de patentes citada en la descripción

- **R L WHITE; D S BURGESS ; M MANDURU ; J A BOSSO.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1996, vol. 40 (8), 1914 [0004]
- **LEWIS, R.; DIEKEMA, D. ; MESSER, S. ; PFALLER, M. ; KLEPSE, M.** *JAC.*, 2002, vol. 49, 345-351 [0006]
- **NORDEN, C. W. ; WENTZEL, H. ; KELETI, E.** Comparison of techniques for measurement of in vitro antibiotic synergism. *J. Infect. Dis.*, 1979, vol. 140, 629-633 [0010]
- **BERENBAUM, M. C.** Correlations between methods for measurement of synergy. *J. Infect. Dis.*, 1980, vol. 142, 476-480 [0010]