

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 774**

51 Int. Cl.:

C12M 1/34 (2006.01)

G01N 21/51 (2006.01)

G01N 21/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2010 PCT/IB2010/000373**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.09.2010 WO10097687**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2010 E 10713503 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2401355**

54 Título: **Método para la investigación bacteriológica de una muestra biológica y dispositivo relacionado**

30 Prioridad:

25.02.2009 IT UD20090048

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

19.02.2019

73 Titular/es:

**ALIFAX S.R.L. (100.0%)
Via Petrarca 2/1
35020 Polverara (PD), IT**

72 Inventor/es:

**GALIANO, PAOLO y
MANSUTTI, ALESSANDRO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 700 774 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

Método para la investigación bacteriológica de una muestra biológica y dispositivo relacionado

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método, y al dispositivo relacionado, para la investigación bacteriológica de una muestra biológica destinada a identificar una carga bacteriana en la muestra y a seleccionar el antibiótico más eficaz para el tratamiento terapéutico de la misma. La muestra que debe analizarse puede ser, por ejemplo, orina, aspirado bronquial, sangre, sangre diluida u otra.

Antecedentes de la invención

15 Es conocido que, según las directrices internacionales actuales, un ensayo in vitro de sensibilidad a antibióticos (antibiograma) proporciona la configuración de una suspensión bacteriana estandarizada que debe someterse a ensayo frente a concentraciones optimizadas (puntos de corte) o diluciones escalares de antibióticos (CIM, concentración inhibidora mínima).

20 El número de bacterias analizadas debe estandarizarse con independencia de la sensibilidad del método adoptado para el ensayo.

La preparación de un inóculo es una de las etapas más críticas de todo ensayo de sensibilidad o antibiograma. El inóculo puede influir significativamente sobre las dimensiones de la zona de inhibición.

25 Según el inóculo, pueden obtenerse resultados de falsa sensibilidad en el caso de que se analice un número excesivamente bajo de bacterias, mientras que pueden obtenerse resultados de falsa resistencia en el caso de que se analice un número excesivamente alto de bacterias.

30 Para la mayoría de microorganismos, el inóculo utilizado debería desarrollar, tras la incubación durante la noche, colonias semiconfluentes. Un inóculo incorrecto (colonias con un crecimiento confluyente o separado) puede ser fácilmente reconocido y por lo tanto estos ensayos deben repetirse.

La preparación de un inóculo adecuado no resulta crítica hasta que se obtiene un crecimiento semiconfluyente.

35 Los inóculos se preparan generalmente mediante la adición a un medio de cultivo celular de cuatro a cinco colonias aisladas de una morfología similar, permitiendo a continuación que crezcan en la fase logarítmica.

40 La selección de cuatro a cinco colonias en lugar de una única colonia se lleva a cabo para minimizar la probabilidad de analizar una colonia que podría derivarse de un mutante sensible.

45 Los inóculos también pueden prepararse directamente mediante la suspensión de colonias que han crecido durante la noche sobre una placa de agar, directamente en medio de cultivo o en solución salina. Esta técnica de preparación directa del inóculo con suspensión resulta preferente para bacterias que crecen de un modo impredecible en el medio, por ejemplo, las denominadas bacterias "fastidiosas".

Debido a que el crecimiento en un medio de inóculo no es fiable, resulta necesario utilizar columnas nuevas (entre 16 y 24 horas).

50 La elección del método de inóculo está condicionada principalmente por consideraciones prácticas, aunque los resultados son mejores si se adoptan algunos métodos de estandarización, tales como la comparación de la densidad de la suspensión de los microorganismos a un estándar determinado de turbidez de un látex equivalente, o llevando a cabo mediciones fotométricas.

55 En particular, el método de estandarización más ampliamente utilizado para estandarizar el inóculo proporciona estándares de turbidez de McFarland, utilizados típicamente en microbiología como referencia para regular la turbidez de las suspensiones bacterianas de manera que el número de bacterias esté comprendido dentro de un determinado intervalo.

60 Los estándares de McFarland (0,5, 1, 2, 3, 4) pueden prepararse mediante la adición de volúmenes específicos de ácido sulfúrico o dihidrato de cloruro de bario con el fin de obtener una solución de sulfato de bario con una densidad óptica específica.

65 El estándar más comúnmente utilizado es el estándar de McFarland 0,5, que se prepara a partir de 99,5 ml de ácido sulfúrico al 1% añadido a 0,5 ml de dihidrato de cloruro de bario al 1,175% bajo agitación continua. Esta solución se dispensa en tubos de ensayo similares a los utilizados para la preparación del inóculo, que se cierran con tapones de tipo enroscable y se dejan en la oscuridad a temperatura ambiente.

ES 2 700 774 T3

El estándar de McFarland 0,5 proporciona un estándar que puede compararse visualmente con una suspensión bacteriana, en solución salina estéril o medio de cultivo que contiene aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml.

5 El tubo de ensayo que debe analizarse con el medio inoculado o la suspensión directa con los microorganismos se somete a agitación.

Después, mediante iluminación adecuada, el tubo de ensayo se coloca junto al estándar de McFarland 0,5 con un fondo blanco con líneas negras contrastantes y se compara la turbidez de ambos, observando las líneas negras a través de la suspensión.

10 En el caso de que la suspensión sea excesivamente espesa, resultará más difícil de observar las líneas negras que a través del estándar de McFarland 0,5. En este caso, el inóculo se diluye con medio estéril o solución salina adicional.

15 Por el contrario, en el caso de que la suspensión que debe someterse a ensayo sea excesivamente "ligera", se añaden más microorganismos o la suspensión se incuba nuevamente (siguiendo el protocolo de preparación de inóculo) hasta que la turbidez alcance el estándar de McFarland.

Una vez estandarizada, la suspensión del inóculo debe utilizarse dentro de los 15 minutos de su preparación.

20 Recientemente, se han utilizado suspensiones de partículas de látex como alternativas más simples y más estables al sulfato de bario, con el fin de obtener una turbidez comparable a la del estándar de McFarland.

Alternativamente, se realiza una estandarización con un espectrofotómetro o nefelómetro, que es más rápida y exacta que la regulación visual para la correspondencia con el estándar de McFarland.

25 En este caso, las colonias se suspenden en agua destilada en un tubo de ensayo de vidrio de manera que se prepara una suspensión con una turbidez visible.

30 Se fija el cero del espectrofotómetro a 500 nm con agua estéril o medio (también utilizado para la suspensión).

Después, se mide la absorbancia de la suspensión bacteriana y, a partir de una tabla de referencia, se selecciona el volumen que debe transferirse a 5 ml de agua destilada estéril utilizando una micropipeta adecuada con un volumen fijo.

35 Este método depende del tipo de espectrofotómetro adoptado, que puede variar, ya que también depende de la elección del tipo de tubos de ensayo o de cubetas de diferentes tamaños.

Por lo tanto, para obtener un crecimiento confluyente, resulta necesario adaptar, en cada ocasión, las diluciones a los instrumentos de cada laboratorio.

40 Tal como se ha indicado, también puede utilizarse un nefelómetro, aunque el instrumento debe calibrarse para los diferentes grupos de microorganismos.

45 En consecuencia, las técnicas conocidas de preparación del inóculo y la comparación de las mismas con un estándar de McFarland 0,5 conllevan una cantidad considerable de trabajo que no está exento de imprecisiones y lentitud para obtener los datos finales deseados. A partir de lo anterior resulta claro que, en el caso de un paciente cuyo tratamiento con antibióticos debe iniciarse rápidamente, las soluciones conocidas en el estado de la técnica no resultan eficaces para suministrar un dato preciso con rapidez.

50 Ello conduce a una falta de rapidez con la que, en ocasiones, se inicia una terapia eficaz en un paciente, con el riesgo de peligros incluso más graves para su salud.

55 Por lo tanto, es habitual que el médico administre previamente en el paciente, sin el apoyo de ensayos diagnósticos y exclusivamente de acuerdo con una sospecha clínica, un antibiótico de amplio espectro a fin de permitir que la terapia se inicie inmediatamente. El uso indiscriminado de tales antibióticos induce el fenómeno denominado de resistencia a los fármacos.

60 Es conocida la solicitud de patente nº US-A-2005/254055 (US'055), que describe un método para la monitorización en tiempo real y en línea del crecimiento celular y la concentración bacteriana utilizando una técnica de dispersión de la luz. La solicitud nº US-A-2005/254055 tiene como objetivo controlar el crecimiento de un microorganismo que ya es conocido desde el inicio y no de identificar si la bacteria se encuentra presente o no y posiblemente de qué tipo es. La solicitud nº US-A-2005/254055, aparte de estar destinada específicamente a incubadores o biorreactores de volumen intermedio, que es un campo muy distante del de los análisis bacteriológicos, tal como es el presente caso, también adolece de la desventaja de la presencia de burbujas de aire derivadas de la agitación y mezcla en el recipiente de la muestra que debe analizarse: ello dificulta la lectura de la dispersión de la luz.

65

El objetivo de la presente invención es perfeccionar un método para la investigación bacteriológica y para conseguir un dispositivo relacionado que permita reducir el tiempo necesario para iniciar la operación de antibiograma, de manera que se adelante el inicio de la intervención terapéutica en el paciente sin determinar ningún riesgo de provocar resistencia a fármacos.

El Solicitante ha diseñado, sometido a ensayo y realizado la presente invención con el fin de superar las desventajas del estado de la técnica y obtener estos objetivos y otros objetivos y ventajas.

Descripción resumida de la invención

Se expone la presente invención y se caracteriza en las reivindicaciones independientes, mientras que las reivindicaciones dependientes describen otras características de la invención o variantes de la idea inventiva principal.

De acuerdo con el objetivo anterior, un método para la investigación bacteriológica de una muestra biológica según la presente invención proporciona la realización de una lectura de la dispersión de la luz con el fin de determinar la turbidez según el estándar de McFarland de una suspensión de medio de cultivo líquido, o medio eugónico, en el que se inocula la muestra biológica y donde se mide la turbidez continuamente y directamente con la suspensión de la muestra analizada durante el crecimiento de las bacterias, hasta alcanzar un umbral de turbidez determinado expresado según el estándar de McFarland.

Según la presente invención, se detecta que se ha alcanzado el umbral de turbidez de McFarland mediante cálculo diferencial desde el inicio del crecimiento o incubación de las bacterias. En consecuencia, la presente invención proporciona la detección de que se ha alcanzado el umbral de turbidez de McFarland en correspondencia con una variación de la turbidez, proporcionada sustancialmente por el valor calculado de la diferencia entre el valor final y el valor inicial de turbidez medidos continuamente durante la etapa de replicación. Esto presenta la ventaja, por ejemplo en comparación con el documento n° US-A-2005/254055, de que el alcance del umbral de turbidez de McFarland deseado es independiente de la turbidez absoluta.

Según una forma preferente de realización, el método según la invención comprende una primera etapa en la que se determina el crecimiento bacteriano en la suspensión de la muestra biológica, inoculada en un medio de cultivo líquido, contenido en un elemento de contención por lo menos parcialmente transparente a radiaciones electromagnéticas.

Simultáneamente con el crecimiento bacteriano, se realizó un haz de luz coherente y colimado (láser) para impactar en el elemento de contención y se detecta la cantidad de luz refractada o difundida (dispersión de la luz) durante el tiempo por la suspensión.

La detección se lleva a cabo en correspondencia con una primera y una segunda posición angular, diferentes entre sí, con respecto al elemento de contención, de manera que se determina una primera y una segunda curva, respectivamente asociada a la primera y segunda posición angular, del desarrollo durante el tiempo de la turbidez de la suspensión bacteriana.

El método según la presente invención comprende además una segunda etapa en la que se determinan dos curvas diferenciales, dadas por la diferencia, respectivamente, entre dicha primera curva y el valor instantáneo de turbidez al inicio de la primera etapa detectada en correspondencia con la primera posición angular, y entre dicha segunda curva y el valor instantáneo de turbidez al inicio de la segunda etapa detectada en correspondencia con la segunda posición angular.

El método proporciona entonces una tercera etapa en la que, a partir del desarrollo de las dos curvas diferenciales en comparación con los datos de primera clasificación, se deduce el tipo de bacteria presente en la muestra en la que se produce el crecimiento bacteriano, o su familia o cepa o especie a la que pertenece.

Se proporciona además una cuarta etapa en la que se correlacionan las dos curvas diferenciales con una variación correspondiente en los valores de turbidez referidos al estándar de McFarland que define dicho umbral de turbidez, dependiendo de los segundos datos prememorizados sobre la dependencia entre el desarrollo de las dos curvas diferenciales y la variación correspondiente en los valores de turbidez referidos al estándar de McFarland. Los segundos datos de dependencia se definen y dividen para cada familia o cepa o especie a la que pertenecen las bacterias.

Una forma de realización de la presente invención adopta una unidad de lectura particular basada en la emisión de luz coherente o láser a través de una muestra y la recepción de la luz difundida relativa con el fin de determinar la presencia y clasificación de las bacterias.

Ventajosamente, la unidad de lectura es capaz de señalar, por ejemplo, acústicamente, o gráfica o visualmente, cuándo se ha alcanzado el umbral de turbidez de McFarland.

El método según la presente invención puede aplicarse a la detección de la turbidez de McFarland en cualquier recipiente de vidrio o plástico, tal como tubos de ensayo o micropocillos.

5 La presente invención puede automatizarse con analizadores que utilizan un sistema de lectura de la dispersión de luz láser.

Una característica ventajosa de la presente invención proporciona el control de la medición correcta realizada por la unidad de lectura mediante una determinación automática de que la medición de la turbidez de McFarland ha tenido lugar, utilizando suspensiones de partículas de látex con una concentración conocida.

10 Con la presente invención se reduce el tiempo utilizado para iniciar el antibiograma, acelerando la intervención terapéutica en el paciente sin determinar ningún riesgo de causar resistencia a fármacos.

15 De esta manera, las etapas descritas anteriormente no se requieren con la disponibilidad de muestras positivas con una turbidez adecuada para iniciar el antibiograma clínico, es decir, los ensayos para antibióticos se llevan a cabo directamente a partir del medio de cultivo.

20 Esta ventaja permite proporcionar al médico el resultado funcional del primer antibiótico sometido a ensayo (resistente o sensible) con el fin de tratar al paciente correctamente con el antibiótico administrado en caso de ser sensible, o de cambiar el antibiótico en el caso de que el ensayo proporcione resultados que demuestren resistencia.

25 Por lo tanto, la invención permite llevar a cabo un antibiograma del tipo clínico, es decir, un antibiograma que se lleva a cabo directamente en el medio de cultivo inoculado con la muestra biológica examinada que ha demostrado ser positiva para crecimiento bacteriano.

30 Además, resulta mucho más preciso conseguir el valor de McFarland deseado, por ejemplo, el estándar 0,5, según la invención, que en el método que utiliza la dilución de la muestra concentrada tal como se lleva a cabo en el estado de la técnica. Esto se debe a que resulta más fiable conseguir un valor preciso de turbidez partiendo de valores bajos y operando durante el crecimiento bacteriano.

35 El tiempo de análisis requerido por la presente invención es considerablemente inferior que en los métodos del estado de la técnica. La velocidad de detección resulta posible gracias a la medición basada en la dispersión de la luz, que permite establecer mucho más rápida y sensiblemente la presencia/ausencia de crecimientos bacterianos en la muestra gracias a la detección directa de la turbidez y, por lo tanto, la concentración de los organismos.

40 De esta manera, la presente invención permite proporcionar resultados precisos y fiables con un ahorro considerable de tiempo en comparación con los métodos conocidos y también pueden conseguirse con las máquinas e instrumentos preexistentes.

45 En otras palabras, el método permite identificar todos los positivos en un tiempo significativamente reducido en comparación con los métodos de hemocultivo clásicos.

Esto reduce significativamente el tiempo medio de realización del antibiograma, con evidentes beneficios en la terapia y control del paciente.

50 El método según la invención puede automatizarse, requiere una operatividad manual limitada, gracias a la automatización de las etapas de lectura, procesamiento de los datos, visualización de los resultados u otros.

La presente invención preferiblemente utiliza recipientes para muestras sellados al vacío, que se someten a autoclavado térmico, para evitar el crecimiento de contaminantes, al contrario que la solicitud nº US-A-2005/254055.

55 Además, la presente invención permite una medición dinámica, evitando la etapa de dilución de las colonias bacterias y eliminando la desventaja de las burbujas de aire generadas durante la etapa de mezcla y agitación que siempre afecta a la solicitud nº US-A-2005/254055, y que no proporciona la presente invención.

60 Una variante del método según la presente invención proporciona la extrapolación, para valores del tiempo inferiores a cero, de una curva de crecimiento a partir de los valores de turbidez medidos en continuo, y para detectar que el umbral de turbidez de McFarland se ha alcanzado, mediante cálculo diferencial con respecto al valor mínimo de la curva extrapolada de manera que se considera también la contribución de la turbidez de los microorganismos que se replican antes del inicio del análisis.

Breve descripción de los dibujos

65 Estas características y otras de la presente invención resultarán evidentes a partir de la descripción siguiente de una forma preferente de una realización, proporcionada como un ejemplo no limitativo en referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- la fig. 1 es una representación esquemática de un dispositivo según la presente invención.
- La fig. 2 es un gráfico del desarrollo con el tiempo (t) de la cantidad de luz difundida $V1(t)$, $V2(t)$ que es detectada por dos sensores, S1 y S2.
- La fig. 3 es un gráfico del desarrollo con el tiempo (t) de la variación $\Delta1(t)$, $\Delta2(t)$ de la cantidad de luz difundida $V1(t)$, $V2(t)$ que es detectada por dos sensores, S1 y S2, con respecto a un valor inicial $V1(0)$, $V2(0)$.
- La fig. 4 es una representación esquemática del método para detectar la turbidez de McFarland $\delta(t)$ partiendo de las curvas $\Delta1(t)$ y $\Delta2(t)$ en la fig. 3.

10 Descripción detallada de una forma preferente de realización

Con referencia a los dibujos adjuntos, se utiliza un método según la presente invención para preparar, mediante tecnología de dispersión de la luz láser, una muestra biológica en suspensión en medio de cultivo líquido, o medio eugónico, con una turbidez de McFarland definida, en este caso 0,5.

El método utiliza un dispositivo 10 (fig. 1) que proporciona la utilización de un elemento de contención o tubo de ensayo 16 transparente a las radiaciones electromagnéticas, dentro del cual se proporciona el crecimiento bacteriano de una suspensión de la muestra biológica inoculada en el medio eugónico. El tubo de ensayo 16 se proporciona ventajosamente cerrado, sellado al vacío y se somete a autoclavado térmico.

El dispositivo 10 comprende una unidad de lectura 11 mediante la que se detecta la luz difundida por la suspensión de la muestra contenida en el tubo de ensayo 16 y medios de procesamiento 26, tales como un ordenador, mediante los cuales se procesan las señales recibidas por la unidad de lectura 11 para los fines del análisis.

Con la presente invención, la muestra se somete a un ensayo de cultivo para verificar que es positiva para una cepa bacteriana determinada y, en caso de ser positiva, una vez preparada hasta la turbidez deseada, se utiliza directamente en las etapas posteriores de un ensayo antibiograma clínico para evaluar la sensibilidad in vitro a antibióticos.

La medición de la turbidez de McFarland de la muestra en el tubo de ensayo mediante la unidad de lectura 11 mostrada en la fig. 1 se basa en la emisión de luz láser y la lectura de dispersión lumínica, directamente en la etapa de análisis, es decir, simultáneamente al crecimiento bacteriano durante el ensayo de cultivo para determinar la carga bacteriana en la muestra analizada.

En particular, la unidad de lectura 11 está provista de medios emisores 12 mediante los cuales, en el tubo de ensayo 16, se hace que impacte un haz coherente o polarizado (láser) y colimado 14 de luz.

Además, la unidad de lectura comprende medios sensores, primeros 18 y segundos 20, por medio de los cuales los rayos 22, 24 de luz difundida o refractada por la suspensión se detectan durante el tiempo.

Los primeros 18 y segundos 20 medios sensores son capaces de generar señales correspondientes S1, S2 que son transmitidas a los medios de procesamiento 26.

Los primeros 18 y segundos 20 medios sensores están localizados en correspondencia con una primera P1 y segunda P2 posiciones angulares (fig. 1), diferentes entre sí, con respecto al tubo de ensayo 16, de manera que se determina una primera $V1(t)$ y segunda $V2(t)$ curvas, respectivamente asociadas a la primera P1 y segunda P2 posiciones angulares, de desarrollo durante el tiempo de la turbidez de la suspensión bacteriana.

En este caso, los primeros 18 y segundos 20 medios sensores se posicionan en dos ángulos predeterminados a y b con respecto a la dirección del haz 14, respectivamente a 30° y 90° (fig. 1).

Los medios de procesamiento 26 son capaces de procesar las señales S1, S2 producidas por los primeros 18 y segundos 20 medios sensores de manera que se determinan a partir de las dos curvas, $V1(t)$ y $V2(t)$, dos curvas diferenciales, $\Delta1(t)$ y $\Delta2(t)$ (fig. 3).

Las dos curvas diferenciales, $\Delta1(t)$ y $\Delta2(t)$, se proporcionan como la diferencia, respectivamente, entre la primera curva $V1(t)$ y un primer valor instantáneo $V1(0)$ de turbidez al inicio de la detección, detectado en correspondencia con la primera posición P1 y entre la segunda curva $V2(t)$ y un segundo valor instantáneo $V2(0)$ de turbidez al inicio de la detección, detectado en correspondencia con la segunda posición P2. Los medios de procesamiento 26 comprenden medios de memorización 28 con una base de datos en la que se memorizan los primeros datos de clasificación D1, mediante los cuales, a partir del desarrollo de las dos curvas diferenciales, $\Delta1(t)$ y $\Delta2(t)$, se deduce el tipo de bacteria o la familia a la que pertenece, presentes en la muestra en la que tiene lugar el crecimiento bacteriano.

Las muestras biológicas, con bacterias en duplicación presentes, emiten señales de luz difundida que la unidad de

ES 2 700 774 T3

lectura 11 detecta y los medios de procesamiento 26 procesan, proporcionando curvas específicas que expresan el desarrollo del crecimiento bacteriano durante el tiempo.

5 La primera curva derivada de la señal obtenida del primer sensor 18 con un ángulo de 30° se refiere a la presencia de bacterias y la consiguiente medición de la carga bacteriana durante el tiempo.

10 La segunda curva derivada de la señal obtenida del segundo sensor 20 con un ángulo de 90°, por el contrario, se caracteriza más por la morfología de las bacterias. A partir de las curvas de crecimiento, $V1(t)$ y $V2(t)$, de la posible bacteria obtenidas de las señales S1 y S2 proporcionadas por los sensores 18 y 20, se calculan las dos curvas diferenciales $\Delta1(t)$ y $\Delta2(t)$, que proporciona, respectivamente, la diferencia entre la primera curva, $V1(t)$ y un primer valor instantáneo $V1(0)$ de turbidez al inicio de la detección, detectado en correspondencia con la primera posición P1, y entre la segunda curva, $V2(t)$, y un segundo valor instantáneo $V2(0)$ de turbidez al inicio de la detección, detectado en correspondencia con la segunda posición P2.

15 A partir de las curvas diferenciales, $\Delta1(t)$ y $\Delta2(t)$, se extrapolan parámetros matemáticos específicos para cada curva, basados en modelos de regresión no lineal. También resulta posible combinar los parámetros homólogos de las dos curvas (por ejemplo mediante el cálculo de proporciones o diferencias o sumas) con el fin de obtener parámetros derivados adicionales.

20 La totalidad de estos parámetros (o juegos) proporciona una descripción sintética de las características de la curva de la bacteria presente en la muestra analizada.

Un ejemplo de una ecuación de regresión aplicable a las curvas es una tal como:

25
$$\Delta(t) = a + b * e^{(c * t)}$$

que puede utilizarse eficazmente para describir el desarrollo de crecimiento exponencial de una colonia bacteriana.

30 La ecuación puede aplicarse a ambas curvas diferenciales, $\Delta1(t)$ y $\Delta2(t)$:

$$\Delta1(t) = a1 + b1 * e^{(c1 * t)}$$

$$\Delta2(t) = a2 + b2 * e^{(c2 * t)}$$

35 A partir de estas ecuaciones resulta posible extrapolar los parámetros $a1$, $b1$, $c1$, $a2$, $b2$ y $c2$. Después, los medios de procesamiento 26 comparan los primeros datos D1 con los parámetros extrapolados de las curvas diferenciales $\Delta1(t)$ y $\Delta2(t)$. En este caso, los primeros datos D1 consisten en una colección de valores típicos de dichos juegos de parámetros de las ecuaciones de regresión aplicadas a las curvas de crecimiento (incluyendo los intervalos de validez de las mismas) para diversos tipos de bacterias, o para bacterias de tipo coco o bacilo, o para diferentes familias de bacterias, o para diferentes especies bacterias o para diferentes cepas bacterianas.

40 En particular, los medios de procesamiento 26 comparan el juego de parámetros de la bacteria estudiada con los diversos juegos de parámetros presentes en los datos D1 que determinan, con la ayuda de técnicas estadísticas adecuadas, qué tipo o familia o especie o cepa es, con la mayor probabilidad, a la que pertenece la bacteria en cuestión.

45 En los medios de memorización 26, se almacenan unos segundos datos D2, con respecto a la dependencia entre el desarrollo de las dos curvas diferenciales, $\Delta1(t)$ y $\Delta2(t)$, y valores de turbidez según el estándar de McFarland.

50 Los segundos datos de dependencia D2 se definen y se dividen para cada familia a la que pertenecen las bacterias. Los datos D2 son los parámetros de las relaciones de dependencia para las diversas familias, entre el incremento de turbidez medido con la técnica de dispersión y el incremento relativo de turbidez de McFarland.

55 Los medios de procesamiento 26 son capaces de correlacionar las dos curvas diferenciales, $\Delta1(t)$ y $\Delta2(t)$, con un valor definido de turbidez según el estándar de McFarland, ventajosamente McFarland 0,5.

60 El valor de lectura detectado por la unidad de lectura 11 al inicio del análisis ($t=0$) se memoriza y se asigna convencionalmente al mismo un nivel de turbidez de McFarland de referencia, en este caso cero (0). Experimentalmente se determinó una relación de dependencia entre el incremento del valor detectado por la unidad de lectura 11 (expresado como diferencia o delta Δ con respecto al valor inicialmente memorizado) y la variación relativa de turbidez expresada en unidades de McFarland.

Los valores detectados por los dos sensores 18 y 20 al inicio del análisis, es decir, en el tiempo cero (t=0), se indican convencionalmente como V1(0) y V2(0), y se envían a los medios de procesamiento 26, en donde son memorizados en los medios de memorización 28.

5 Durante el curso del análisis, los primeros 18 y segundos 20 medios sensores detectan la cantidad de luz refractada en los dos ángulos a y b en los que se encuentran con respecto al tubo de ensayo 16. Dado que t es un instante de tiempo genérico durante el análisis, los valores leídos por los primeros 18 y segundos 20 medios sensores en el tiempo t se indican convencionalmente como V1(t) y V2(t), indicando con ello el desarrollo o función de la luz difundida con respecto al tiempo t.

10 La fig. 2 muestra el desarrollo temporal exponencial típico de la curva asociada a las funciones V1(t) y V2(t) de los valores detectados por los primeros 18 y segundos 20 medios sensores durante el análisis de una muestra biológica que contiene bacterias en crecimiento en un medio eugónico.

15 Según la presente invención, en el tiempo t, se calcula la diferencia para cada sensor, entre el valor actual V(t) y el valor en el instante t=0, es decir, para el primer sensor 18 la fórmula es:

$$\Delta 1(t) = V1(t) - V1(0)$$

20 mientras que para el segundo sensor 20, la fórmula es:

$$\Delta 2(t) = V2(t) - V2(0)$$

25 Por lo tanto, resulta posible obtener las dos curvas, $\Delta 1(t)$ y $\Delta 2(t)$ (mostradas en la fig. 3), que representan la variación de la dispersión detectada por los dos sensores durante el tiempo.

30 El Solicitante ha identificado una relación de dependencia entre la variación de turbidez medida con la tecnología de dispersión lumínica media la unidad de lectura 11 (indicada por el símbolo Δ) y la misma variación de turbidez expresada en unidades de McFarland (indicada por δ , mientras que el desarrollo relativo en el tiempo, o función del tiempo, se indica como $\delta(t)$). Esta dependencia no es fija sino que depende de diversos factores, incluyendo la forma y tamaño de la bacteria en cuestión.

35 El Solicitante ha examinado experimentalmente el crecimiento de diferentes familias de bacterias, detectadas tal como se indica en referencia a la fig. 1. En particular, se examinaron los desarrollos de la variación de dispersión, $\Delta 1(t)$ y $\Delta 2(t)$, comparándolos con un incremento del valor de turbidez expresado en McFarland (δ) detectado mediante un fotómetro de referencia.

40 A partir de estos ensayos se extrapolaron las dependencias para cada familia bacteriana examinada, entre el incremento del valor de dispersión detectado en los dos sensores 18 y 20, $\Delta 1(t)$ y $\Delta 2(t)$, y el incremento relativo de turbidez expresado en unidades de McFarland (δ). La información sobre la dependencia, segundos datos D2, se memorizó en los medios de memorización 28.

45 A título de ejemplo, los segundos datos D2 pueden presentar una estructura tal como la mostrada en la tabla a continuación:

Tabla

Familia de la bacteria	Relación de dependencia
Familia 1	$\delta = a1 * \Delta^2 + b1 * \Delta + c1$
Familia 2	$\delta = a2 * \Delta^2 + b2 * \Delta + c2$
Familia 3	$\delta = a3 * \Delta^2 + b3 * \Delta + c3$

50 En la Tabla, con cada familia de bacterias se asocia una relación de dependencia que asocia la variación de turbidez expresada en unidades de McFarland (δ) y la variación relativa de turbidez medida según la técnica de dispersión lumínica (Δ).

55 Por lo tanto, en el caso de que se conozca la familia a la que pertenece la bacteria estudiada (p.ej. Familia 1) y en el caso de que conozcamos la variación de turbidez medida según la técnica de dispersión lumínica partiendo del instante inicial t=0 (Δ), la variación correspondiente de turbidez expresada en unidades de McFarland (δ) es:

$$\delta = a1 * \Delta^2 + b1 * \Delta + c1$$

en donde a1, b1 y c1 son parámetros específicos adecuados de la familia identificada.

La fig. 4 muestra esquemáticamente el principio de detección de la turbidez de McFarland $\delta(t)$ partiendo de las curvas $\Delta 1(t)$ y $\Delta 2(t)$. A partir del análisis comparativo, basado en los primeros datos D1 de las curvas $\Delta 1(t)$ y $\Delta 2(t)$ resulta posible rastrear el tipo de bacteria examinada o por lo menos la familia a la que pertenece.

5 De acuerdo con la familia a la que pertenezca resulta posible definir la relación de dependencia entre Δ y δ , partiendo de la base de datos de los experimentos de laboratorio.

En este punto, ya que se conoce la relación de dependencia, resulta posible calcular el valor actual de turbidez de McFarland δ de la muestra analizada, aplicando dicha fórmula a las dos curvas, $\Delta 1(t)$ y $\Delta 2(t)$.

10 Preferentemente, también se proporcionan látex con una concentración conocida, como confirmación adicional de la medición realizada.

15 La aplicación práctica de esta técnica permite detectar si se ha alcanzado un nivel determinado de turbidez de McFarland (en este caso 0,5 unidades), lo que resulta necesario como concentración estandarizada para el inóculo del ensayo de antibiograma durante el crecimiento de la muestra positiva sometida a análisis de cultivo.

20 La monitorización continua de la turbidez de la muestra durante el crecimiento proporciona ventajas operativas que permiten acelerar los procedimientos de inoculación para el ensayo clínico estándar de antibiograma.

25 Ello se debe a que los procedimientos estándares requieren, tal como es conocido, que las colonias previamente aisladas en una placa se diluyan en soluciones salinas fisiológicas hasta obtener suspensiones con una turbidez estandarizada. Por lo tanto, la metodología conocida puede resultar en errores de dilución, de manipulación o de elección de las colonias utilizadas. Estas preparaciones se obtienen normalmente cuando dichas bacterias ya han crecido en las placas Petri normales que requieren por lo menos una incubación durante la noche.

30 Con la nueva técnica tal como se describe en la presente memoria, se evitan todas aquellas operaciones manuales relacionadas con la preparación de la suspensión bacteriana, reduciendo de esta manera los posibles factores de error y permitiendo una mayor automatización del ensayo.

El tiempo que se requiere para alcanzar un nivel predeterminado de turbidez de McFarland, por ejemplo 0,5, de la muestra durante la etapa de crecimiento depende de la carga bacteriana inicial de la muestra, en la que a mayor valor del recuento, más rápidamente se alcanza el umbral de McFarland preestablecido.

35 Ventajosamente, la unidad de lectura 11 y el dispositivo relacionado 10 para preparar la muestra hasta el nivel de turbidez deseado tal como se indica pueden integrarse en un único instrumento automático.

40 Según una variante ventajosa de la presente invención, se aplica el método, así como en el caso del crecimiento bacteriano con una etapa de latencia con una curva plana desde el tiempo $t=0$, en la que el valor mínimo de la curva es igual al valor inicial $V(0)$ en el tiempo $t=0$, también cuando las bacterias ya se encuentran en la etapa de replicación (ausencia de etapa de latencia) antes del análisis.

45 En este caso, la curva de crecimiento extrapolada partiendo de los valores de crecimiento leídos se desplaza cualitativamente hacia atrás, es decir, a la izquierda con respecto a la dirección del eje x temporal, con respecto a la curva con etapa de latencia y presenta un valor de turbidez $V(0)$ en el tiempo en que se ha iniciado el análisis $t=0$, que no es el valor inicial mínimo de la curva tal como, por el contrario, sí es el caso de la curva plana que se inicia con una etapa de latencia.

50 En esta situación, la presente invención puede calcular la diferencia de turbidez no ya con respecto al valor $V(0)$ en el tiempo inicial ($t=0$), sino con respecto al valor mínimo real, V_{\min} , de la curva extrapolada partiendo de los valores de crecimiento bacteriano leídos en continuo, es decir, extrapolada para valores temporales inferiores a cero, $t<0$. Esta elección resulta ventajosa porque también considera la contribución, en términos de turbidez, de las bacterias que ya han iniciado la replicación, proporcionando de esta manera su contribución de turbidez antes de iniciarse el análisis, es decir, antes del tiempo $t=0$.

55

REIVINDICACIONES

1. Método para la investigación bacteriológica de una muestra biológica destinada a la identificación de una carga bacteriana en la muestra y a la selección del antibiótico más eficaz para el tratamiento terapéutico de la misma, caracterizado porque proporciona la realización de una lectura de dispersión lumínica con el fin de determinar la turbidez según el estándar de McFarland de una suspensión formada a partir de medios de cultivo líquido o medio eugónico en el que se inocular la muestra biológica, y en los que se mide continuamente la turbidez directamente a partir de la suspensión de la muestra analizada durante la etapa de crecimiento de las bacterias, hasta alcanzar un umbral de turbidez determinado expresado según el estándar de McFarland, y porque detecta que el umbral de turbidez de McFarland se ha alcanzado, mediante cálculo diferencial dese el inicio de la etapa de crecimiento de las bacterias, proporcionando una señal de que se ha alcanzado el umbral de turbidez de McFarland en correspondencia con una variación de la turbidez, proporcionada sustancialmente por el valor calculado de la diferencia entre el valor final y el valor inicial de turbidez medido continuamente durante la etapa de replicación, en donde el alcance del umbral de turbidez de McFarland deseado es independiente de la turbidez absoluta.

2. Método según la reivindicación 1, que comprende:
 - una primera etapa en la que se lleva a cabo el crecimiento bacteriano en la suspensión de la muestra biológica inoculada en los medios de cultivo líquido contenidos en un elemento de contención (16) por lo menos parcialmente transparente a las radiaciones electromagnéticas, haciendo incidir en el elemento de contención (16), simultáneamente al crecimiento bacteriano, un haz colimado (14) de luz y detectando la cantidad de luz refractada o difundida por la suspensión durante el tiempo, llevando a cabo dicha detección en correspondencia con una primera (P1) y segunda (P2) posiciones angulares, diferentes entre sí, con respecto a dicho elemento de contención (16), de manera que se determina una primera V1(t) y una segunda curva V2(t), asociadas respectivamente a la primera (P1) y segunda (P2) posiciones angulares, del desarrollo durante el tiempo de la turbidez de la suspensión bacteriana,

 - caracterizado porque comprende:
 - una segunda etapa en la que se determinan dos curvas diferenciales, $\Delta 1(t)$ y $\Delta 2(t)$, proporcionadas por la diferencia, respectivamente, entre dicha primera curva V1(t) y un primer valor instantáneo V1(0) de turbidez al inicio de la primera etapa, detectado en correspondencia con la primera posición angular (P1) y entre dicha segunda curva, V2(t), y un segundo valor instantáneo V2(0) de turbidez al inicio de la primera etapa, detectado en correspondencia con la segunda posición angular (P2),
 - una tercera etapa en la que, a partir del desarrollo de las dos curvas diferenciales, $\Delta 1(t)$ y $\Delta 2(t)$, en comparación con los primeros datos de clasificación (D1) que consisten en la colección de los valores típicos de juegos de parámetros de las ecuaciones de regresión aplicadas a las curvas de crecimiento para los diversos tipos de bacterias, o para bacterias del tipo coco o bacilo, o para diferentes familias de bacterias, o para diferentes especies bacterianas o para diferentes cepas bacterianas, se deduce el tipo de bacteria presente en la muestra o la familia, cepa o especie a la que pertenece,
 - una cuarta etapa en la que se correlacionan las dos curvas diferenciales, $\Delta 1(t)$ y $\Delta 2(t)$, con una variación correspondiente δ de los valores de turbidez en referencia al estándar de McFarland $\delta(t)$, que define dicho umbral de turbidez, según segundos datos (D2) prememorizados de dependencia entre el desarrollo de las dos curvas diferenciales, $\Delta 1(t)$ y $\Delta 2(t)$, y los valores de turbidez según el estándar de McFarland $\delta(t)$, definiendo y dividiendo dichos segundos datos (D2) para cada familia, cepa o especie a la que pertenece la bacteria, en donde dicha dependencia se expresa mediante la relación $\delta = a_1 * \Delta^2 + b_1 * \Delta + c_1$, en la que a1, b1 y c1 son parámetros específicos adecuados de la familia identificada.

3. Método según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la variación δ de la cuarta etapa corresponde al estándar de McFarland 0,5.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque proporciona una etapa para controlar la medición correcta de la turbidez de McFarland mediante una comparación con suspensiones de partículas de látex de concentración conocida.

5. Método según cualquier reivindicación anterior, caracterizado porque proporciona la extrapolación para valores temporales inferiores a cero de la curva de crecimiento a partir de los valores de turbidez medidos en continuo, y la detección de que se ha alcanzado el umbral de turbidez de McFarland mediante un cálculo diferencial con respecto al valor mínimo de la curva extrapolada, de manera que se considera también la contribución de turbidez de los microorganismos que se replican antes del inicio del análisis.

6. Dispositivo para la investigación bacteriana de una muestra biológica destinada a identificar una carga bacteriana en la muestra y a seleccionar el antibiótico más eficaz para el tratamiento terapéutico de la misma, caracterizado porque comprende:

- un elemento de contención (16) por lo menos parcialmente transparente a las radiaciones electromagnéticas, dentro del cual se proporciona el crecimiento bacteriano de una suspensión de la muestra biológica inoculada en unos medios de cultivo líquido o medio eugónico,
 - una unidad de lectura (11) provista de medios emisores (12) por medio de los cuales, sobre dicho elemento de contención (16), se hace incidir un haz coherente y colimado de luz (14), y con primeros (18) y segundos (20) medios sensores por medio de los cuales los haces (22, 23) de luz refractada o difundida por la suspensión se detectan durante el tiempo, estando situados dichos primeros (18) y segundos (20) medios sensores en correspondencia con una primera (P1) y una segunda (P2) posiciones angulares, diferentes entre sí, con respecto a dicho elemento de contención (16), de manera que se determina una primera V1(t) y una segunda V2(t) curva, respectivamente asociadas a la primera (P1) y segunda (P2) posiciones angulares, del desarrollo durante el tiempo de la turbidez de la suspensión bacteriana, midiendo dicha turbidez en continuo durante la etapa de replicación,
 - medios de procesamiento (26) capaces de procesar señales producidas por los primeros (18) y segundos (20) medios sensores de manera que se determinan dos curvas diferenciales, $\Delta 1(t)$ y $\Delta 2(t)$, proporcionadas por la diferencia, respectivamente, entre dicha primera curva V1(t) y un primer valor instantáneo V1(0) de turbidez al inicio de la detección, detectado en correspondencia con la primera (P1) posición angular y entre dicha segunda curva V2(t) y un segundo valor V2(0) de turbidez instantáneo al inicio de la detección, detectado en correspondencia con la segunda posición angular (P2), comprendiendo dichos medios de procesamiento (26) medios de memorización (28) de bases de datos en los que se memorizan primeros datos de clasificación (D1) que consisten en la colección de los valores típicos de juegos de parámetros de las ecuaciones de regresión aplicadas a las curvas de crecimiento para diversos tipos de bacterias, o para bacterias del tipo coco o bacilo, o para diferentes familias de bacterias, o para diferentes especies bacterianas o para diferentes cepas bacterianas, mediante los cuales, a partir del desarrollo de las dos curvas diferenciales, $\Delta 1(t)$ y $\Delta 2(t)$, se deduce el tipo de bacteria presente en la muestra biológica o la familia, cepa o especie a la que pertenece, encontrándose también en dichos medios de memorización (28) segundos datos prememorizados (D2) de dependencia entre el desarrollo de las dos curvas diferenciales, $\Delta 1(t)$ y $\Delta 2(t)$, y una variación correspondiente δ de los valores de turbidez según el estándar de McFarland $\delta(t)$ que define un umbral de turbidez deseado que se obtiene independientemente de que el umbral de turbidez de McFarland deseado alcance una turbidez absoluta, definiendo y dividiendo dichos segundos datos de dependencia (D2) para cada familia, cepa o especie a la que pertenece la bacteria, en donde dicha dependencia se expresa mediante la relación $\delta = a_1 * \Delta^2 + b_1 * \Delta + c_1$, en la que a_1 , b_1 y c_1 son parámetros específicos adecuados de la familia identificada, siendo capaces dichos medios de procesamiento (26) de correlacionar las dos curvas diferenciales, $\Delta 1(t)$ y $\Delta 2(t)$, con la variación correspondiente δ de dichos valores de turbidez según el estándar de McFarland.

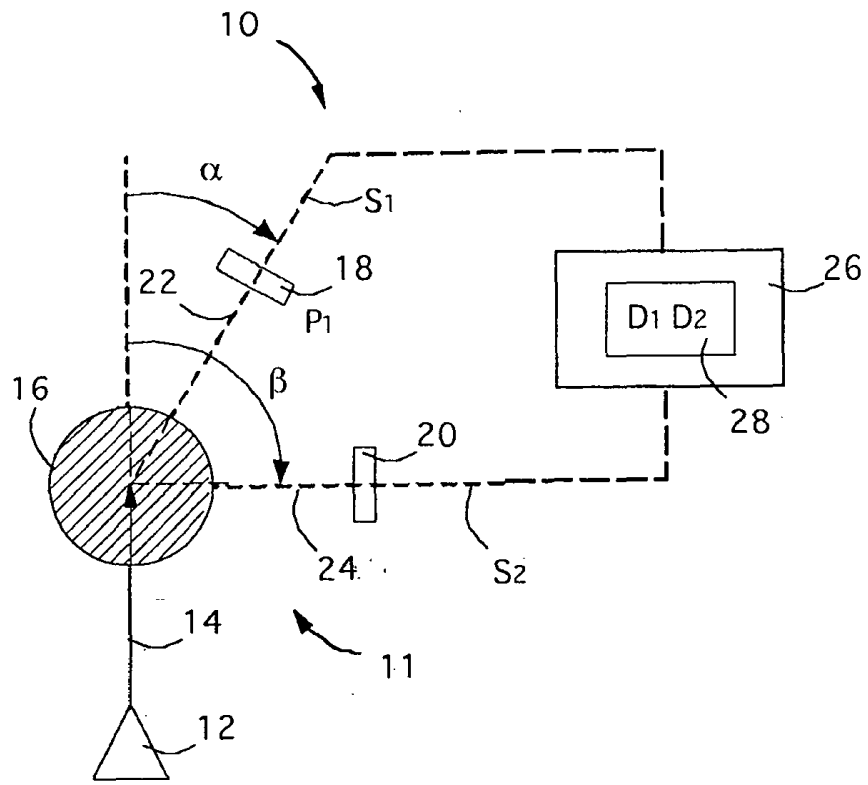


Fig. 1

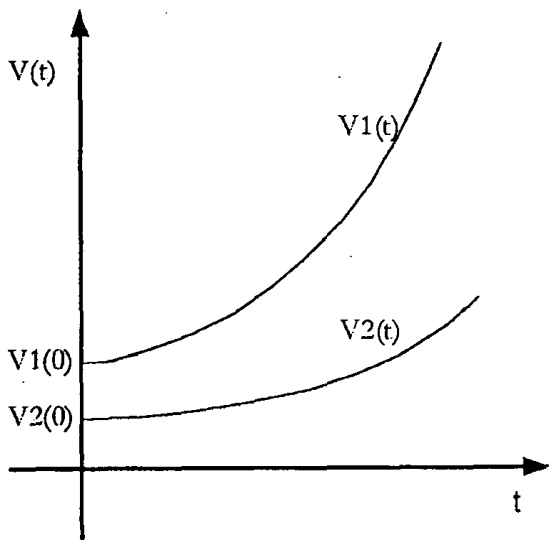


Fig. 2

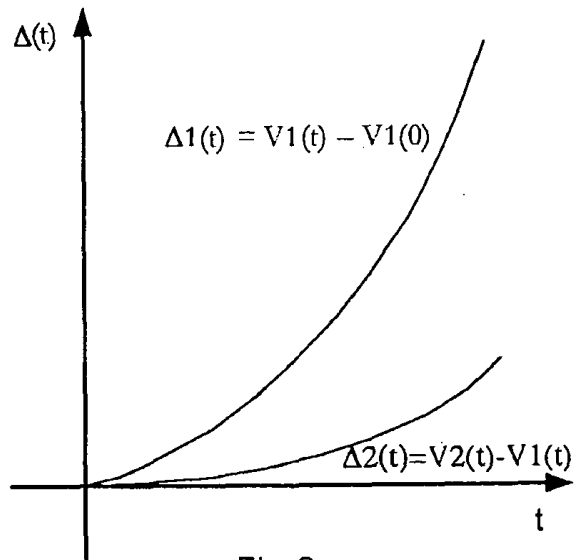


Fig. 3

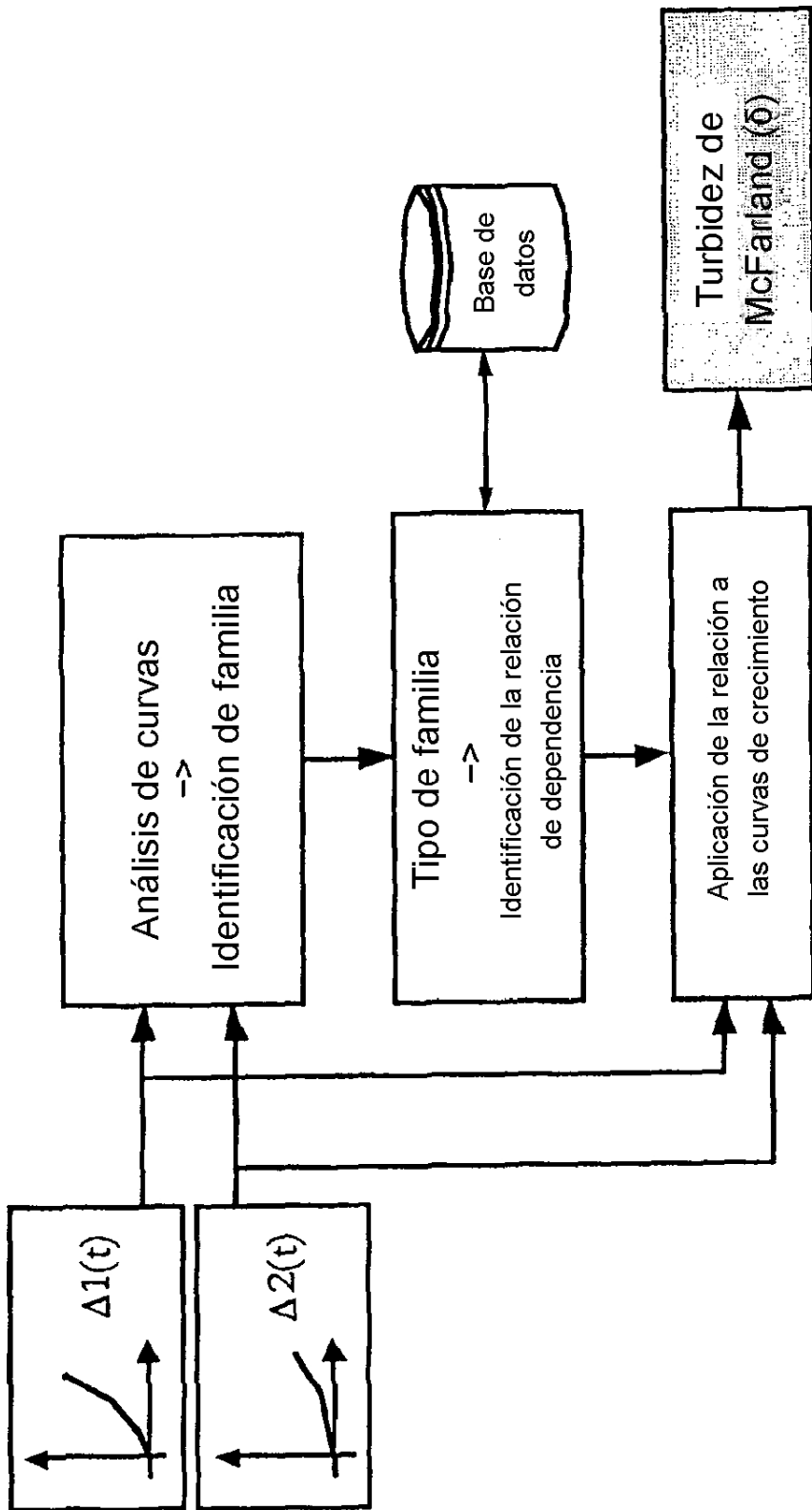


Fig. 4