

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 905**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2013 PCT/RU2013/000394**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014 WO14074012**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2013 E 13853343 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2918672**

54 Título: **Método para determinar la sensibilidad de microorganismos a sustancias antimicrobianas**

30 Prioridad:

06.11.2012 RU 2012147280

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

04.02.2020

73 Titular/es:

**TETS, VIKTOR VENIAMINOVICH (50.0%)
45 East 89th Street, Apt 10A
New York, NY 101028, US y
TETS, GEORGY VIKTOROVICH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TETS, VIKTOR VENIAMINOVICH y
TETS, GEORGY VIKTOROVICH**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 739 905 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 determinar la sensibilidad de microorganismos a sustancias antimicrobianas

5 **Campo técnico**

La invención se refiere a medios para determinar la sensibilidad de diversos microorganismos a sustancias antimicrobianas (incluyendo bacterias y hongos) que provocan enfermedades en humanos, animales y plantas y también dañan comida y productos industriales, antibióticos y antisépticos, y pueden utilizarse principalmente en medicina, así como en medicina veterinaria, agricultura e industria.

Antecedentes de la técnica

Uno de los problemas más serios de la medicina contemporánea, la medicina veterinaria, la industria y producción vegetal está en la actividad de diversos microorganismos, especialmente bacterias y hongos, que provocan enfermedades y daño de productos. La lucha contra bacterias y hongos sigue siendo insuficientemente eficaz debido a la gran variabilidad de microorganismos que conduce a la aparición de formas resistentes, la incapacidad para hacer crecer cantidades significativas de microbios y la ausencia de métodos eficaces para elegir medios antimicrobianos. Por esta razón, durante los primeros 3-4, las preparaciones antimicrobianas se utilizan de manera empírica. En medicina y medicina veterinaria, diversos antibióticos de amplio espectro se utilizan en tales situaciones, pero el número de tales antibióticos es limitado, lo que conduce a la rápida formación y propagación de resistencia hacia tales antibióticos, dando como resultado complicaciones y, a veces, incluso la muerte en medicina y medicina veterinaria, y daño irreversible de comida y productos industriales.

A este respecto, una evaluación rápida y precisa de la sensibilidad de microorganismos a preparaciones antimicrobianas, antibióticos y antisépticos, constituyen un problema urgente y aún sin resolver.

Métodos conocidos para determinar la sensibilidad a preparaciones antimicrobianas comprenden aislamiento preliminar de cultivo puro de un microorganismo e identificación de dicho cultivo puro.

Sin embargo, el aislamiento de cultivo puro de microorganismos tiene algunas implicaciones negativas, particularmente la pérdida de tiempo (48-96 horas). Además, si están presentes dos o más microorganismos, algunos de los mismos no se aislarán como cultivo puro. También debe observarse que algunos microbios "aún no cultivados" no pueden aislarse por completo, y según diversas fuentes tales microbios pueden constituir hasta un 90-95 % de todos los microbios.

Las dificultades de tratar con tales microbios consisten principalmente en la ausencia de métodos para aislar, hacer crecer e identificar estos microbios. Lo anterior se debe a la forma en la que se organiza la vida de bacterias dentro de comunidades microbianas (biopelículas), que determina gran interdependencia entre microorganismos. Estas condiciones todavía no se pueden recrear en un laboratorio, véase Lewis K., Epstein S.S. *Persistsers, biofilms, and the problem of culturability in incultivated microorganisms*. En la serie: *Microbiology Monographs*. Steinbuchel A. (ed.). Berlín / Heidelberg: Springer; 2009, págs. 181-194. Epstein S.S. *General model of microbial uncultivability in uncultivated microorganisms*. En la serie: *Microbiology Monographs*. Steinbuchel A. (ed.). Berlín / Heidelberg: Springer; 2009, págs. 131-150.

Un método conocido comprende aplicar sustancias antimicrobianas sobre tiras de una determinada manera, véase Isenberg H.D. *Essential Procedures for clinical Microbiology*, ASM-Press, 1998, USA, págs. 235-240. El método de dilución en serie comprende la inoculación de un cultivo puro sobre un medio fluido de propósito especial Muller Hinton con la adición de sustancias antimicrobianas (antibióticos) en concentraciones variantes, véase Isenberg H.D. *Essential Procedures for clinical Microbiology*, ASM-Press 1998, USA, págs. 216-223. Algunos métodos de determinación semiautomática de sensibilidad a antibióticos emplean detección por medio de equipo de propósito especial (por ejemplo, paneles Vitec 2 BioMerie). Sin embargo, el método también utiliza aislamiento preliminar de cultivo puro del supuesto agente causante con exposición posterior del mismo en pocillos del panel. Métodos genéticos permiten detectar determinados genes estudiados de resistencia antibiótica entre bacterias identificadas o incluso directamente en el material patológico. Dicho método es relativamente rápido, sin embargo, aún no permite la evaluación de manera completa de la sensibilidad a preparaciones antimicrobianas. Esto se debe al hecho de que muchos microorganismos no se han estudiado aún y por lo tanto no hay datos sobre su genoma o los genes de resistencia antibiótica de los mismos. De manera secundaria, incluso entre bacterias conocidas y cultivables, la resistencia a una preparación antimicrobiana específica puede codificarse por genes completamente diferentes, muchos de los que permanecen sin estudiar.

Otro método conocido para determinar la sensibilidad de microorganismos a una sustancia antimicrobiana comprende tomar material biológico y aislar un cultivo puro del microorganismo. Con el fin de aislar un cultivo puro, se inocula el material biológico en medios nutritivos que proporcionan condiciones favorables para el crecimiento de un microorganismo particular que probablemente provoca enfermedades o daño de productos y materiales. Si el crecimiento de microorganismo es exitoso, se identifica el microorganismo. Entonces, se determina la sensibilidad

del mismo a una sustancia antimicrobiana por medio de inoculación de cultivo puro aislado del microorganismo en medio nutritivo Muller Hinton o un medio no rico similar que no contiene la sustancia antimicrobiana, seguido de la colocación de discos de papel saturados con diversas sustancias antimicrobianas en la superficie del medio nutritivo inoculado con microorganismos, e incubación de los microorganismos en el medio nutritivo en la presencia de las sustancias antimicrobianas que están investigándose con evaluación posterior de los resultados, véase Isenberg H.D. *Essential Procedures for clinical Microbiology*, ASM-Press, 1998, USA, 1998, págs. 208-215.

Aún otro método conocido para determinar la sensibilidad de microorganismos a una sustancia antimicrobiana (antibióticos) comprende tomar material biológico, cultivar los microorganismos contenidos en el mismo en un medio nutritivo que no contiene la sustancia antimicrobiana, introducir la sustancia antimicrobiana que está investigándose en el medio y evaluar posteriormente los resultados; se cultiva el material biológico en caldo de azúcar durante al menos dos horas, entonces se introducen discos estándar que contienen los antibióticos que están investigándose y se incuba adicionalmente el medio durante al menos dos horas, se evalúa el resultado por el grado de opacidad de los contenidos de la muestra: cuanto menor es la opacidad, mayor es la sensibilidad de los microorganismos a las sustancias antibacterianas, véase el documento RU 2262533C2. También en el documento WO 96/28570 se da a conocer un método para detectar sensibilidad de microorganismos a sustancias antimicrobianas en un medio nutritivo líquido que contiene un indicador de reducción-oxidación de cambio de color. El documento WO 99/18232 describe un dispositivo y método de evaluación de múltiples compartimentos para detectar la presencia de un microorganismo objetivo en una muestra biológica y la susceptibilidad de tal microorganismo a organismos antimicrobianos. Para la detección se utiliza una molécula de señal.

Las desventajas de este método, que se ha tomado como modelo de la presente invención, consisten en las siguientes:

- precisión bastante baja de la evaluación de resultados, debido a que la reducción de opacidad del contenido de la muestra puede estar provocada por la inhibición de crecimiento de microbios distintos de los agentes causantes, cuya sensibilidad a una sustancia antimicrobiana se investiga;

- ya que el material biológico está contenido durante un largo tiempo (> 2 horas) en un medio nutritivo que no incluye una sustancia antimicrobiana, el crecimiento selectivo de algunos microorganismos cambia la composición global de microorganismos en comparación con el material original, que distorsiona drásticamente los resultados del estudio;

- la introducción de la sustancia antimicrobiana al medio nutritivo en discos estándar es razonable solamente para cultivos puros aislados, debido a que los valores de referencia de zonas de inhibición de crecimiento de microorganismo, que permitirían evaluar su sensibilidad y resistencia a una sustancia antimicrobiana particular, se definen solamente para cultivos puros. En dicho método, el cultivo puro del microorganismo no está aislado, haciendo de ese modo imposible tener en cuenta las especificaciones de microorganismo o la concentración máxima posible de la sustancia antimicrobiana en el lugar en el que se toma el material biológico;

- la utilización de un medio no rico en nutrientes fluido no permite el crecimiento de la mayoría de microorganismos.

Es un objeto de la presente invención proporcionar una solución para aumentar la precisión de la determinación de la sensibilidad de microorganismos a una sustancia antimicrobiana.

Sumario de la invención

La presente invención se dirige a un método para determinar la sensibilidad de microorganismos a sustancias antimicrobianas tal como se define en las reivindicaciones.

Según la invención, el método para determinar la sensibilidad de microorganismos a sustancias antimicrobianas comprende tomar material biológico, incubar el material biológico con todos los microorganismos contenidos en el mismo en un medio nutritivo, introducir una sustancia antimicrobiana que va a investigarse en el medio nutritivo y evaluar posteriormente el resultado, en el que se utiliza un medio rico en nutrientes sólido para cultivar los microorganismos, la sustancia antimicrobiana que está investigándose se introduce en el medio nutritivo antes del cultivo de los microorganismos en una concentración cercana a la concentración máxima alcanzable en la ubicación en la que se toma el material biológico, también se lleva a cabo una inoculación de control de microorganismos en el medio rico en nutrientes sólido que no contiene la sustancia antimicrobiana, y en el que se evalúa la sensibilidad de los microorganismos a la sustancia antimicrobiana tras la aparición de crecimiento visible de microorganismos en un cultivo de control; el medio rico en nutrientes sólido que se utiliza para incubar bacterias se materializa como medio de agar de *Brucella* o medio de agar de *Columbia*, mientras que se utiliza medio de *Sabouraud* para incubar hongos; pueden añadirse suero de sangre humana o suero de sangre animal y/o glóbulos rojos al medio nutritivo; pueden añadirse vitaminas y/o aminoácidos, y/o suplementos nutricionales al medio nutritivo; el medio nutritivo puede contener adicionalmente microorganismos que fomentan el crecimiento de microorganismos que están investigándose durante el cultivo conjunto de los mismos; pueden añadirse preparaciones antibacterianas al medio nutritivo utilizado para cultivar hongos; pueden añadirse preparaciones antifúngicas al medio nutritivo utilizado para cultivar bacterias; puede realizarse incubación del material biológico con todos los microorganismos contenidos en el

mismo en condiciones aeróbicas; puede realizarse incubación del material biológico con todos los microorganismos contenidos en el mismo en condiciones anaeróbicas; puede realizarse incubación en la presencia de una o diversas sustancias antimicrobianas suplementarias; puede colocarse el medio nutritivo en placas de Petri; puede colocarse el medio nutritivo en una placa hecha de plástico o papel.

5 La invención reivindicada difiere del modelo y otras soluciones análogas conocidas por que no está limitada a determinar la sensibilidad de determinados microorganismos que son característicos de una enfermedad particular de humanos, animales o plantas, o daño y deterioro de productos y materiales.

10 El método reivindicado se basa en un principio novedoso, que consiste en intentar hacer crecer (siempre y cuando sea posible) todos los microorganismos contenidos dentro del material recogido y entonces determinar qué sustancia antimicrobiana es la más eficaz y eficiente en la inhibición de la totalidad de dichos microorganismos, sin intentar identificar real o supuestamente estos microorganismos, como es el caso con los métodos conocidos.

15 En otras palabras, para proporcionar una solución para hacer frente a la fuente de enfermedades y daño de productos y materiales no se necesita conocer qué es la fuente, es suficiente conocer que sustancia hace posible eliminar o reducir los efectos dañinos de dicha fuente.

20 La implementación de las características de la invención proporciona el objeto de la invención con la propiedad fundamentalmente nueva mencionada anteriormente y el resultado técnico correspondiente, que consiste en precisión significativamente aumentada de los resultados de investigación.

25 El medio rico en nutrientes sólido permite hacer crecer el máximo número de microorganismos diferentes contenidos dentro de la muestra. Es importante introducir la sustancia antimicrobiana que va a investigarse en el medio nutritivo antes de que empiece el cultivo de microorganismos. Esta distinción evita cambios en la composición global de microorganismos durante el proceso de cultivo en comparación con el material original. Es importante introducir la sustancia antimicrobiana en una concentración que es cercana a la concentración máxima alcanzable en la ubicación en la que se toma el material biológico y no en una concentración arbitraria como es el caso al utilizar discos estándar para introducir la sustancia antimicrobiana. La evaluación de sensibilidad de microorganismos no se basa en el nivel de opacidad de los contenidos de muestra, que podría relacionarse con la inhibición de microbios que no son patógenos (dañinos); en su lugar, se basa en la aparición de crecimiento visible de microorganismos en un cultivo de control.

35 La circunstancia esencialmente novedosa del método reivindicado consiste en que la adición de determinados microorganismos en el medio nutritivo y el cultivo conjunto de los mismos junto con agentes causantes de enfermedades pueden fomentar el crecimiento de incluso aquellos microorganismos en la muestra que, de lo contrario, no se cultivan.

40 **Breve descripción de los dibujos**

La invención se explica además por medio de la descripción detallada de ejemplos de sus realizaciones, sin hacer referencia a ningún dibujo.

45 **Realización preferida**

La implementación del método se explica además por medio de los ejemplos proporcionados a continuación.

50 Ejemplo 1. Determinación rápida de sensibilidad de bacterias a azitromicina al inocular material obtenido de un paciente que sufre una infección del sistema urinario.

El material biológico se tomó: orina de un paciente que sufre cistitis.

Medio nutritivo: medio de agar de *Brucella*, rico sólido, enriquecido con suero de caballo y glóbulos rojos de oveja y humano. Se añadió azitromicina al medio de antemano en concentración máxima suficiente en orina, 4 µg/ml.

55 El material se inoculó en placas de Petri en la cantidad de 0,2 ml. Condiciones de medio y cultivo análogas se utilizaron para propósitos de control (en el cultivo de control). El cultivo se incubó a una temperatura de 37 °C.

60 Resultados de la investigación. Tras 4-6 horas de crecimiento a temperatura de 37 °C, se observó la formación de césped en el cultivo de control.

65 En otras palabras, el crecimiento de un gran número de bacterias no relacionadas diferentes se observó en medio rico en nutrientes sólido en el cultivo de control, mientras que no pudo observarse crecimiento de dichas bacterias en presencia de azitromicina, que puede, por lo tanto, utilizarse de manera exitosa para tratar este paciente particular. No se necesitó identificar agentes causantes específicos o aislar el cultivo puro. La respuesta necesaria para prescribir un antibiótico estuvo lista en 4 horas.

Ejemplo 2. Determinación rápida de sensibilidad de bacterias a ampicilina al inocular material obtenido de un animal (un perro) con infección de heridas.

5 El método se llevó a cabo de manera similar al modo descrito en el ejemplo 1.

Material que va a investigarse: secreción de la herida.

10 Medio nutritivo: medio de agar de *Columbia* enriquecido con suero de caballo y glóbulos rojos de oveja, vitaminas y aminoácidos. Se añadió ampicilina al medio en concentración máxima alcanzable en la ubicación en la que se tomó el material, 1 µg/ml.

15 Material tomado de la herida se situó en placa utilizando un frotis sobre el medio en una placa de Petri. Se utilizaron las mismas condiciones de cultivo y medio (sin ampicilina) para propósitos de control.

El cultivo se incubó a temperatura de 37 °C.

20 Resultados de la investigación. Tras 4-6 horas de crecimiento a temperatura de 37 °C, se observó la formación de césped en el cultivo de control. No se observó crecimiento bacteriano en la placa con ampicilina.

25 En otras palabras, el crecimiento de un gran número de bacterias no relacionadas diferentes se observó en medio rico sólido, mientras que no pudo observarse crecimiento de dichas bacterias en presencia de ampicilina, que puede, por lo tanto, utilizarse de manera exitosa para tratar este animal particular. No se necesitó identificar agentes causantes específicos o aislar el cultivo puro. La respuesta necesaria para prescribir un antibiótico estuvo lista en 4 horas.

Ejemplo 3. Elección de un antiséptico para eliminar moho doméstico obtenido a partir de escayola expuesta.

30 Material que va a investigarse: piezas de escayola expuesta que muestran evidencia de crecimiento de moho. Se preparó una suspensión de la escayola (0,5 g) en 1,0 ml de solución de cloruro sódico isotónica.

35 Medio nutritivo: medio de agar de *Sabouraud* enriquecido con componentes minerales, colocado en tres placas de Petri. Las preparaciones siguientes se añadieron al medio de antemano: la primera placa, antiséptico Multicide, un derivado de hidracina de poliguanidina, disolvente, agua en concentración final del 0,5 % (que puede lograrse sin alterar las propiedades de escayola y otros materiales similares, color, olor y características mecánicas); la segunda placa, antisépticos: Teflex, un complejo de copolímeros de guanidina. Disolvente, agua (0,5 %); la tercera placa, control sin ningún antiséptico.

40 El material se situó en placa utilizando un asa de siembra.

Las inoculaciones se cultivaron a 30 °C. los resultados se analizaron tras 4, 6, 12, 20, 24 y 48 horas tras la inoculación.

45 Resultados. Tras 6 horas de cultivo, se observó el crecimiento en la placa de control y en la placa que contenía agar con preparación Teflex. No se observó crecimiento en placas con Multicide. El moho resultó ser resistente a la preparación Teflex y sensible a la preparación Multicide. No se necesitó identificar agentes causantes específicos o aislar el cultivo puro. La respuesta requerida para elegir un antiséptico estuvo lista en 6 horas.

50 Ejemplo 4. Elección de un antibiótico para tratar enfermedades respiratorias.

Material que va a investigarse: esputo de un paciente.

55 Medio nutritivo: medio de agar de *Brucella* enriquecido con suero de caballo y glóbulos rojos humanos. Se añadieron bacterias *Haemophilus influenzae* al medio, que provocan enfermedades respiratorias y fomentan el crecimiento de otro patógeno, *Streptococcus pneumoniae*, que se cultiva de manera muy pobre en condiciones normales. Se añadió levofloxacin también al medio en la concentración máxima alcanzable en esputo, 10 µg/ml.

60 Esputo recién recogido del paciente se diluyó cinco veces en una solución isotónica de cloruro sódico, se situó en placa en la cantidad de 0,2 ml por placa utilizando una paleta y se incubó a una temperatura de 37 °C. Los resultados se analizaron tras 4, 6, 12, 20 y 24 horas tras la inoculación.

65 Resultados. Tras 4 horas de crecimiento a temperatura de 37 °C, se observó la formación de césped en el cultivo de control. En el medio que contenía levofloxacin: tras 4, 6, 12, 20 y 24 horas no hubo señales de crecimiento. La investigación microscópica mostró lo siguiente: tras 24 horas hubo más de 12 morfotipos de microorganismos en extensiones preparadas de bacterias crecidas en la muestra de control; mientras que en el medio que contenía levofloxacin no hubo crecimiento.

Por lo tanto, la tecnología proporcionada permite elegir rápidamente (en 4 horas) un antibiótico que inhibirá el crecimiento de todos los posibles agentes causantes de esta patología, incluyendo aquellos que no se cultivan prácticamente en condiciones normal. No se necesitó identificar el agente causante específico o aislar el cultivo puro.

Ejemplo 5. Determinación rápida de sensibilidad a una mezcla de antibióticos, concretamente gentamicina (principalmente afecta a bacterias aeróbicas) y metronidazol (activo contra bacterias anaeróbicas y microaerófilos), al inocular material obtenido de un paciente que sufre una enfermedad de periodonto.

Material que va a investigarse: secreción recién recogida de espacio subgingival.

Medio nutritivo: medio de agar de *Columbia* enriquecido con glóbulos rojos de oveja y suero de caballo se utilizó para el cultivo en condiciones aeróbicas. Se detectaron microorganismos anaeróbicos utilizando agar de *Schaedler* que contiene glóbulos rojos y suero de oveja. Se añadieron dos antibióticos al medio: gentamicina (activa contra un amplio rango de aerobios) y metronidazol que afecta selectivamente a bacterias anaeróbicas. El medio en las placas 1 y 1a contiene gentamicina; el medio en las placas 2 y 2a contiene metronidazol; el medio en las placas 3 y 3a contiene gentamicina y metronidazol; las placas 4 y 4a contienen solamente el medio nutritivo (control).

La secreción de espacio subgingival se diluyó cinco veces utilizando solución isotónica de cloruro sódico y se situó en placa en la cantidad de 0,05 ml por placa utilizando una paleta. Las inoculaciones se cultivaron: en el caso de aerobios (placas 1 - 4), en un baño de aire regular, y en el caso de anaerobios (placas 1a - 4a), en un baño de aire en condiciones anaeróbicas a 37 °C durante 48 - 72 horas. Conjuntos generadores de gas se utilizaron para crear condiciones anaeróbicas. Los resultados se analizaron tras 4, 8, 12, 20, 24 y 48 horas tras la inoculación (bacterias anaeróbicas se caracterizan por crecimiento prolongado).

Resultados. Tras 4 horas de crecimiento en condiciones aeróbicas y 8 horas de crecimiento en condiciones anaeróbicas a temperatura de 37 °C, se observó la formación de césped en el cultivo de control. En condiciones aeróbicas en la placa de prueba 3 que contenía gentamicina y metronidazol no hubo crecimiento a lo largo de todo el periodo de observación. En condiciones anaeróbicas en la placa de prueba 3a que contenía gentamicina y metronidazol no hubo crecimiento tras 8 horas. Se observó crecimiento microbiano en las placas 1, 1a, 2 y 2a. Los datos obtenidos muestran que la mezcla de gentamicina y metronidazol fue eficaz y que surgen clones resistentes cuando las preparaciones se utilizan individualmente.

Por lo tanto, el método reivindicado, al contrario del modelo del mismo, permite la evaluación de la sensibilidad a una mezcla de preparaciones antimicrobianas.

Ejemplo 6. Determinación rápida de la sensibilidad de hongos que provocan enfermedades de plantas (oídio) a preparaciones antifúngicas.

Material que va a investigarse: toma de muestras por frotado de solución isotónica de cloruro sódico tomada de zonas afectadas de una hoja de una planta que tiene indicios de crecimiento de hongos.

Medio nutritivo: medio de agar de *Sabouraud* enriquecido con componentes minerales, colocado en una placa con seis pocillos. Con el fin de prevenir el crecimiento de bacterias, se añadió gentamicina al agar en la cantidad de 0,01 mg/l. Las preparaciones antifúngicas que van a investigarse también se añadieron al medio: 1^{er} pocillo, propiconazol, en concentración final del 1 %; 2^o pocillo, nistatina (0,4 mg/l); 3^{er} pocillo, control sin ninguna preparación antifúngica.

Se lavó 1,0 ml de solución isotónica de cloruro sódico de 4 cm cúbicos de la zona afectada. El material se situó en placa utilizando un asa de siembra.

Las inoculaciones se cultivaron a 30 °C. Los resultados se analizaron tras 6, 8, 12, 20, 24 y 48 horas tras la inoculación.

Resultados. Tras 8 horas de cultivo, se observó el crecimiento en el pocillo de control y en el pocillo que contenía agar con preparación de nistatina. No se observó crecimiento en el pocillo con propiconazol. El moho resultó ser resistente a la preparación de nistatina. No se necesitó identificar el agente causante específico o aislar el cultivo puro. La respuesta requerida para elegir una preparación antifúngica estuvo lista en 8 horas.

Aplicabilidad industrial

La invención puede implementarse por medio de materiales y equipos conocidos.

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar la sensibilidad de microorganismos a sustancias antimicrobianas, en el que dicho método no implica una etapa de identificación de los microorganismos, dicho método comprende
- 5
tomar material biológico, incubar el material biológico con todos los microorganismos contenidos en el mismo sobre un medio rico en nutrientes sólido, que comprende una sustancia antimicrobiana introducida en el medio antes del cultivo de los microorganismos en una concentración cercana a la concentración máxima alcanzable en la ubicación en la que se toma el material biológico e incubar el material biológico con todos los microorganismos contenidos en el mismo sobre un medio de control que es idéntico al medio rico en nutrientes sólido pero no contiene la sustancia antimicrobiana;
- 10
y
- 15
evaluar posteriormente la sensibilidad de la totalidad de microorganismos a la sustancia antimicrobiana tras la aparición de crecimiento visible de microorganismos en un cultivo de control dentro de 4 a 6 horas desde el comienzo de cultivo.
- 20
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que el medio rico en nutrientes sólido que se utiliza para incubar bacterias se materializa como medio de agar de *Brucella* o medio de agar de *Columbia*, mientras que se utiliza medio de *Sabouraud* para incubar hongos.
3. Método según la reivindicación 2, caracterizado por que se añaden suero de sangre humana o suero de sangre animal y/o glóbulos rojos al medio rico en nutrientes sólido.
- 25
4. Método según la reivindicación 2, caracterizado por que se añaden vitaminas y/o aminoácidos, y/o suplementos nutricionales al medio rico en nutrientes sólido.
5. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que el medio rico en nutrientes sólido contiene adicionalmente microorganismos que fomentan el crecimiento de los microorganismos que están investigándose durante el cultivo conjunto de los mismos.
- 30
6. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que se añaden preparaciones antibacterianas al medio rico en nutrientes sólido utilizado para cultivar hongos.
- 35
7. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que se añaden preparaciones antifúngicas al medio rico en nutrientes sólido utilizado para cultivar bacterias.
8. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que la incubación del material biológico con todos los microorganismos se realiza en condiciones aeróbicas.
- 40
9. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que la incubación del material biológico con todos los microorganismos contenidos en el mismo se realiza en condiciones anaeróbicas.
- 45
10. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que la incubación del material biológico con todos los microorganismos contenidos en el mismo se realiza en presencia de una o diversas sustancias antimicrobianas suplementarias.
- 50
11. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que el medio rico en nutrientes sólido se coloca en placas de Petri.
12. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que el medio rico en nutrientes sólido se coloca en una placa hecha de plástico o papel.