

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 752**

51 Int. Cl.:

C12M 3/00	(2006.01)
C12M 1/18	(2006.01)
C12M 1/40	(2006.01)
C12M 1/32	(2006.01)
C12M 3/06	(2006.01)
C12M 1/00	(2006.01)
C12Q 1/18	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2014 PCT/KR2014/003977**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2014 WO14178692**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2014 E 14791482 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 2987851**

54 Título: **Equipo de prueba para cultivos celulares basado en pocillos múltiples para microfluidos**

30 Prioridad:

02.05.2013 KR 20130049681

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.03.2020

73 Titular/es:

**QUANTA MATRIX CO, . LTD (100.0%)
105ho, 106ho, 107ho, 108ho, 109ho, B1, Center
for, medical innovation, Seoul National University
Hospital, 71, Daehako-ro
Jongno-gu, Seoul, 03082, KR**

72 Inventor/es:

**JUNG, YONG GYUN;
KIM, EUN GEUN;
KWON, SUNG HOON y
CHOI, JUNG IL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 745 752 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

Equipo de prueba para cultivos celulares basado en pocillos múltiples para microfluidos

5 Campo técnico

La presente divulgación se refiere en general a un dispositivo de prueba para cultivos celulares con base en pocillos múltiples para microfluidos.

10 Técnica antecedente

En general, las respuestas de las células a un fármaco se observan colocando las células en una placa- multipocillo, inyectando el fármaco en forma de líquido y monitorizando los cambios dependientes del tiempo de las células usando un sistema de medición óptica para obtener resultados estadísticos. Como método de prueba de susceptibilidad a antibióticos en un medio sólido, se conoce la prueba de Kirby-Bauer (KB) en la que las bacterias se dispersan sobre un medio de agar, se colocan papeles con antibióticos absorbidos sobre los mismos y se observa crecimiento bacteriano. En el caso de las pruebas de microdilución en medios líquidos, se han desarrollado una serie de sistemas automatizados, como VITEK2, Microscan y Phoenix, para las pruebas de sensibilidad a los antibióticos. Tal sistema puede usarse para pruebas de susceptibilidad a antibióticos colocando un antibiótico en pocillos de tamaño milimétrico, inyectando bacterias, junto con un medio líquido, en los pocillos, y monitorizando y determinando estadísticamente el crecimiento bacteriano a través de la turbidez.

25 Cuando las respuestas de las células a diferentes fármacos se prueban utilizando los sistemas convencionales, las células se colocan en un medio líquido o sólido, los fármacos se mezclan con el medio líquido o se colocan discos de papel absorbidos en el medio sólido para permitir que las células respondan a los fármacos, y las respuestas de crecimiento celular a los fármacos están determinadas por la medición de turbidez (absorbancia). Sin embargo, este enfoque depende de la recopilación de datos estadísticamente válidos en lugar de los cambios de células individuales, y requiere un tiempo de incubación prolongado (generalmente de 16 a 24 horas) porque al menos debería crecer un número predeterminado de células (generalmente un millón de células por ml) para obtener resultados estadísticos. En este caso, es imposible monitorizar los cambios que ocurren en células individuales contra fármacos y monitorizar células individuales móviles en tiempo real. Además, se requiere mucho tiempo y trabajo para probar la gran cantidad de fármacos porque los fármacos individuales se inyectan por separado. La prueba KB para pruebas de susceptibilidad a antibióticos en medios sólidos requiere básicamente una gran cantidad de placas de medio de agar para probar la susceptibilidad de decenas de antibióticos debido al número limitado de fármacos que se pueden colocar en los medios sólidos. VITEK, un sistema automatizado desarrollado para minimizar el tiempo de prueba, también requiere un tiempo relativamente largo de aproximadamente 12 horas porque la turbidez de las bacterias debería aumentar por encima de un nivel predeterminado. Además, dado que los entornos para los métodos de prueba convencionales son diferentes de los ambientes *in vivo*, puede haber muchas diferencias sustanciales entre los resultados de la prueba y los fenómenos que ocurren *in vivo* (Gregory G. Anderson, et al.(2003), "Intracellular Bacterial Biofilm-Like Pods in Urinary Tract Infections", Science 301, 105; Gallo et al.(2011), "Demonstration of Bacillus cereus in Orthopaedic-Implant-Related Infection with Use of a Multi-Primer Polymerase Chain Reaction-Mass Spectrometric Assay.", J Bone Joint Surg Am, 93). Además, el documento US 2012/003732 A1 describe una pluralidad de diferentes sistemas de cultivo de células de microfluidos para diferentes aplicaciones. Las estructuras para microfluidos descritas en el mismo pueden comprender una cámara de cultivo, una entrada de flujo de objeto, una salida de flujo de objeto y una o más entradas de medios para fluidos, en donde la entrada de flujo de objeto y la salida de flujo están dispuestas en el mismo lado de la línea que bisecta la cámara de cultivo de modo que los objetos y los medios de flujo de objetos que ingresan a la cámara de cultivo desde la entrada de flujo de objetos se mueven a través de la cámara para salir de la cámara a través de la salida de flujo de objetos.

50 Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar una técnica precisa y rápida para las pruebas de sensibilidad a los antibióticos en comparación con las técnicas convencionales.

Descripción detallada de la invención

55 Un aspecto de la presente invención proporciona un dispositivo de prueba de cultivo celular basado en múltiples pocillos para microfluidos que tiene una estructura de matriz de una pluralidad de unidades de pocillos para microfluidos alineados, cada una de las unidades de pocillos para microfluidos incluye una entrada a través de la cual entra un primer fluido, un compartimento de acomodación adaptado para acomodar un segundo fluido en el mismo, un canal para microfluidos a través del cual fluye el primer fluido, y una salida de aire adaptada para facilitar la entrada del primer fluido, en donde el canal para microfluidos está en comunicación con la entrada y la salida de aire de tal manera que se permite que el primer fluido fluya y llene el canal para microfluidos, en donde el compartimento de acomodación está diseñado en forma de un pocillo de modo que el segundo fluido entrante se retiene, y se forma una válvula capilar donde una parte del lado lateral inferior del compartimento de acomodación está en comunicación con una parte del lado lateral del canal para microfluidos de modo que el primer fluido y el segundo fluido se encuentran para formar una interfaz, en donde la salida de aire se forma en un extremo del canal para microfluidos, está en comunicación con la pared superior del canal para microfluidos y está expuesta a la atmósfera.

De acuerdo con una realización, las dimensiones de la unidad de pocillos para microfluidos pueden corresponder a las de cada uno de los pocillos de una placa comercial de pocillos múltiples.

5 Según una realización, cada uno de los pocillos puede estar dispuesto en una matriz 1×1, 1×2, 1×4, 2×4, 4×6, 12×8, 24×16 o 48×32.

Según una realización, el canal para microfluidos puede estar dispuesto para rodear el compartimento de acomodación de modo que la unidad de pocillo para microfluidos tenga una estructura cuadrangular.

10 Según una realización, la válvula capilar puede tener un grosor y ancho predeterminados para evitar que el primer fluido entre en el compartimento de acomodación.

15 Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un método de análisis celular que usa un dispositivo de prueba de cultivo celular en microfluidos basado en múltiples pocillos que tiene una estructura de matriz de una pluralidad de unidades de pocillos para microfluidos alineados. Cada una de las unidades de pocillos para microfluidos incluye una entrada a través de la cual entra una solución de mezcla de un medio líquido que contiene un agente gelificante y un agente biológico, un compartimento de acomodación adaptado para acomodar una sustancia fisiológicamente activa en el mismo, un canal para microfluidos en comunicación con la entrada y a través del cual fluye el medio líquido, y una válvula capilar a través de la cual una porción del lado lateral inferior del canal para microfluidos está en comunicación con una porción del lado lateral del compartimento de acomodación. El método de análisis celular incluye los pasos de (a) introducir la solución de mezcla del medio líquido que contiene el agente gelificante y el agente biológico en la entrada para llenar la solución de la mezcla en el canal para microfluidos y gelificar la solución de la mezcla para formar una película delgada sólida, (b) alimentar la sustancia fisiológicamente activa en el compartimento de acomodación y difundir la sustancia fisiológicamente activa en la película delgada sólida a través de la válvula capilar, y (c) observar los cambios del agente biológico que ocurren en una interfaz donde la solución de la mezcla y la fisiológica sustancia activa se encuentran, en una sola célula.

20 Según una realización, la etapa (a) puede incluir (a-1) introducir una solución que contiene el agente biológico en la entrada para llenar una porción del canal para microfluidos y (a-2) introducir adicionalmente el medio líquido que contiene el agente gelificante en la entrada para permitir que el medio líquido forme un flujo laminar y llene el canal para microfluidos, de modo que se forme una monocapa del agente biológico en las superficies de las paredes superior e inferior del canal para microfluidos.

30 De acuerdo con una realización, el método de análisis celular puede incluir además una etapa de (d) observar las respuestas del agente biológico a la sustancia fisiológicamente activa en una sola célula para determinar la concentración inhibitoria mínima (MIC) o la concentración mínima de erradicación de biopelícula (MBEC) de la sustancia fisiológicamente activa.

40 Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1 y 2 ilustran un dispositivo de prueba de cultivo celular en microfluidos basado en múltiples pocillos de acuerdo con una realización de la presente invención.

45 La Figura 3 es una vista en sección transversal de una unidad de pocillo para microfluidos.

La Figura 4 es un diagrama conceptual que muestra un procedimiento de obtención de imágenes utilizando un dispositivo de prueba de cultivo celular con un diseño de chip de 96 pocillos.

50 La Figura 5 muestra un procedimiento para la prueba de sensibilidad a antibióticos usando un dispositivo de prueba de cultivo celular de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 6 muestra imágenes de resultados experimentales que demuestran que los valores de MIC del antibiótico de penicilina para una cepa de *E. faecalis* podrían determinarse rápidamente utilizando un chip MAC.

55 La Figura 7 muestra imágenes que muestran las formas de biopelículas que responden a un antibiótico, que se investigaron usando un chip MAC de acuerdo con una realización de la presente invención.

60 La Figura 8 muestra el crecimiento de una especie bacteriana gram-negativa en agarosa en presencia de un antibiótico β-lactámico a diferentes concentraciones en un estado en donde la agarosa se mezcló con una solución de la bacteria.

La Figura 9 es un diagrama detallado que explica los fenómenos mostrados en la Figura 8.

65 La Figura 10 muestra la aparición de los fenómenos explicados en la Figura 9 en una cepa de *E. coli* en presencia de un antibiótico β-lactámico.

La Figura 11 muestra un procedimiento para introducir materias primas en un canal para microfluidos para obtener una imagen de una monocapa de bacterias.

5 La Figura 12 muestra imágenes que muestran el crecimiento de una especie bacteriana en presencia de un antibiótico a diferentes concentraciones en un estado en donde las bacterias se formaron en una monocapa.

La Figura 13 muestra imágenes que muestran el crecimiento de una cepa de *P. aeruginosa* en presencia de aztreonam como antibiótico β -lactámico a concentraciones por debajo y por encima de MIC.

10 Las Figuras 14 y 15 son imágenes de microscopía óptica que muestran el crecimiento de dos cepas bacterianas sin antibiótico y dos cepas bacterianas resistentes a un antibiótico, revelando que podría medirse la doble infección con las cepas bacterianas.

15 La Figura 16 es un diagrama que muestra el cultivo en 3D de células de mamífero usando un dispositivo de prueba de cultivo celular de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 17 muestra los valores de MIC para 4 especies de cepas clínicas, medidos por análisis morfológico unicelular (SCMA) usando un chip MAC.

20 Modo para llevar a cabo la invención

25 Las realizaciones de la presente invención se describirán ahora con más detalle con referencia a los dibujos adjuntos. Sin embargo, la presente invención no se limita a las realizaciones expuestas en el presente documento y puede realizarse de muchas formas diferentes. Por el contrario, estas realizaciones se proporcionan de modo que esta descripción sea exhaustiva y completa, y transmitirá completamente el alcance de la invención a los expertos en la materia. En los dibujos, los tamaños, como el ancho y el grosor, de los elementos pueden exagerarse para mayor claridad. Los dibujos se explican completamente desde el punto de vista de un observador. Se entenderá que cuando se hace referencia a un elemento como "sobre" otro elemento, puede estar directamente sobre el otro elemento o uno o más elementos intermedios también pueden estar presentes entre ellos. Los expertos en la materia apreciarán que se pueden hacer muchas modificaciones y variaciones sin apartarse del espíritu de la invención. A lo largo de los dibujos adjuntos, se usan los mismos números de referencia para designar sustancialmente los mismos elementos.

35 Por otro lado, los términos utilizados en este documento deben entenderse como se describe a continuación. Los términos "primero", "segundo", etc. se usan solo para distinguir un elemento de otro y el alcance de las reivindicaciones no debe estar limitado por estos términos. Por ejemplo, un primer elemento podría denominarse un segundo elemento y, de manera similar, un segundo elemento podría denominarse un primer elemento.

40 Como se usa en este documento, las formas singulares "uno", "un/una" y "el/la" están destinadas a incluir también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Se entenderá además que los términos "incluye(n)", "que incluye", "tienen (tiene)" y/o "que tiene", cuando se usan en esta especificación, especifican la presencia de características, números enteros, pasos, operaciones establecidos, elementos y/o componentes, pero no excluyen la presencia o adición de una o más características, números enteros, pasos, operaciones, elementos, componentes y/o grupos de los mismos. Los pasos respectivos de los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en un orden diferente al que se describe explícitamente. En otras palabras, los pasos respectivos pueden realizarse en el mismo orden que se describe, simultáneamente o en orden inverso.

50 Las Figuras 1 y 2 ilustran un dispositivo de prueba de cultivo celular en microfluidos basado en múltiples pocillos de acuerdo con una realización de la presente invención. Específicamente, las Figuras 1 y 2 son vistas en perspectiva superior e inferior del dispositivo de prueba de cultivo celular en microfluidos basado en múltiples pocillos, respectivamente.

55 Con referencia a la Figura 1, el dispositivo 100 de prueba de cultivo celular tiene entradas 120 abiertas hacia el exterior, compartimentos 130 de acomodación y salidas 150 de aire, como se ve desde la parte superior. Debido a esta estructura, los fluidos primero y segundo pueden introducirse en el dispositivo 100 de prueba de cultivo celular. Con referencia a la Figura 2, a diferencia de la estructura superior, el dispositivo 100 de prueba de cultivo celular tiene una estructura bloqueada desde el exterior, como se ve desde la parte inferior. Debido a esta estructura, el primer y segundo fluidos pueden acomodarse en el dispositivo 100 de prueba de cultivo celular.

60 Con referencia a las Figuras 1 y 2, el dispositivo 100 de prueba de cultivo celular basado en múltiples pocillos para microfluidos tiene una estructura de matriz de una pluralidad de unidades 110 de pocillos para microfluidos alineados. Cada una de las unidades 110 de pocillos para microfluidos incluye una entrada 120 a través de la cual entra un primer fluido, un compartimento 130 de acomodación adaptado para acomodar un segundo fluido en el mismo, un canal 140 para microfluidos a través del cual fluye el primer fluido, y una salida 150 de aire adaptada para facilitar la entrada del primer fluido. Las unidades 110 de pocillos para microfluidos alineados pueden tener dimensiones correspondientes a las dimensiones de los pocillos de una placa comercial de múltiples pocillos en su conjunto. Preferiblemente, los

65

centros de las unidades 110 de pocillos para microfluidos coinciden con los de los pocillos de una placa comercial de múltiples pocillos.

Las placas multipocillo son herramientas estándar para tratar y analizar una serie de muestras en ensayos químicos, bioquímicos y/o biológicos. Las placas de pocillos múltiples pueden adoptar diversas formas, tamaños y formas. En general, las placas de pocillos múltiples se fabrican para tener tamaños y formas estándar y tienen disposiciones estándar de pocillos. Las disposiciones estándar de pocillos incluyen las que se encuentran en placas de 96 pocillos (matriz de pocillos de 12 × 8), placas de 384 pocillos (matriz de pocillos de 24 × 16) y placas de 1536 pocillos (matriz de 48 pocillos de 32 pocillos). Las placas de pocillos múltiples que tienen otras disposiciones de pocillos están disponibles comercialmente.

Dado que el dispositivo 100 de prueba de cultivo celular tiene dimensiones similares a las dimensiones de las placas comerciales de múltiples pocillos, es fácilmente intercambiable con placas comerciales de múltiples pocillos para diversas técnicas convencionales de análisis biológico.

Cada uno de los fluidos primero y segundo puede incluir 80% o más en peso de agua o 90% o más en peso de agua como medio de dispersión o disolvente. Por ejemplo, el primer fluido puede ser una solución de mezcla de un medio líquido que contiene un agente gelificante y un agente biológico. El segundo fluido puede ser una solución acuosa que contiene una sustancia fisiológicamente activa. El primer fluido entra a través de las entradas 120 abiertas hacia el exterior formadas en la porción superior del dispositivo 100 de prueba de cultivo celular. Del mismo modo, el segundo fluido ingresa al dispositivo 100 de prueba de cultivo celular a través de las aberturas superiores de los compartimentos 130 de acomodación. El segundo fluido puede introducirse usando una bomba especial o pipeteando.

Cada uno de los compartimentos 130 de acomodación está diseñado en forma de un pocillo que tiene un espacio cuyo tamaño es suficiente para retener el segundo fluido entrante. El volumen del pocillo no está particularmente limitado siempre que sea suficiente para observar las reacciones durante mucho tiempo después de que ingrese el segundo fluido. El volumen del pocillo es preferiblemente de 100 µl a 2000 µl.

Cada uno de los canales 140 para microfluidos está en comunicación con la entrada 120 y la salida 150 de aire de manera que se permite que el primer fluido fluya y llene el canal 140 para microfluidos. Por ejemplo, el canal 140 para microfluidos puede tener una anchura de cientos de µm a varios mm y una profundidad (o espesor) de cientos de µm. Con estas dimensiones, la obtención de imágenes posterior es fácil de realizar y el primer fluido puede llenar el canal 140 para microfluidos por acción capilar. En el caso en donde el primer fluido es un medio líquido que contiene un agente gelificante, el primer fluido puede gelificarse después de un lapso de tiempo predeterminado, lo que da como resultado la formación de una película delgada sólida que llena el canal 140 para microfluidos.

Una porción del lado lateral inferior del compartimento 130 de acomodación está en comunicación con una porción del lado lateral del canal 140 para microfluidos de tal manera que el primer fluido y el segundo fluido se encuentran para formar una interfaz.

Preferiblemente, el cuerpo del dispositivo 100 de prueba de cultivo celular está hecho de un material transparente para que los fenómenos que ocurren en el dispositivo 100 de prueba de cultivo celular puedan observarse fácilmente. El material transparente es preferiblemente una resina polimérica, tal como poliestireno, polietileno, polipropileno, polimetacrilato o policarbonato. El dispositivo 100 de prueba de cultivo celular puede fabricarse moldeando por inyección la resina polimérica.

La Figura 3 es una vista en sección transversal de la unidad de pocillo para microfluidos. Con referencia a la Figura 3, la unidad 110 de pocillos para microfluidos tiene una estructura cercana a un cuadrángulo en su conjunto, cuyas dimensiones son similares a las dimensiones de cada pocillo de una placa comercial de múltiples pocillos. Por ejemplo, la unidad 110 de pocillos para microfluidos tiene una estructura cuadrada. El canal 140 para microfluidos rodea el compartimento 130 de acomodación y se alarga tanto como sea posible. Esta estructura aumenta la cantidad del primer fluido que ingresa. Debido a esta ventaja, la muestra es fácil de manejar. El canal 140 para microfluidos está cerrado en un extremo pero está en comunicación con la salida 150 de aire de tal manera que el primer fluido que ingresa a través de la entrada 120 fluye y llena fácilmente el canal 140 para microfluidos. El primer fluido puede ser un medio líquido que contiene un agente gelificante, como la agarosa. El primer fluido puede incluir un agente biológico, como una cepa bacteriana. Se forma una válvula 160 capilar donde el canal 140 para microfluidos está en comunicación con el compartimento 130 de acomodación. Cuando el primer fluido llena el canal 140 para microfluidos por acción capilar, la presencia de la válvula 160 capilar permite la formación de una interfaz entre el primer fluido y el segundo fluido mientras evita que el primer fluido entre en el compartimento 130 de acomodación. Es decir, el grosor y el ancho de la válvula 160 capilar se controlan de modo que se mantenga la acción capilar. La válvula 160 capilar típicamente tiene un espesor de 100 a 500 µm y una anchura de 500 µm a 2 mm. Dentro de estos intervalos, se evita que el primer fluido se desborde en el compartimento 130 de acomodación y puede llenar el canal 140 para microfluidos. La salida 150 de aire formada en un extremo del canal 140 para microfluidos está en comunicación con la pared superior del canal 140 para microfluidos y está expuesta a la atmósfera. Con esta disposición, cuando el primer fluido llena el canal 140 para microfluidos, el aire presente en el canal 140 para microfluidos se libera a la atmósfera a través de la salida 150 de aire.

La Figura 4 es un diagrama conceptual que muestra un procedimiento de obtención de imágenes utilizando el dispositivo de prueba de cultivo celular con un diseño de chip de 96 pocillos. En algunas realizaciones, se introduce una solución de agarosa como primer fluido en el canal para microfluidos. Por esta razón, el dispositivo de prueba de cultivo celular de acuerdo con una realización de la presente invención también puede denominarse un "chip de canal de agarosa para microfluidos (MAC)".

Con referencia a la Figura 4, se introduce una solución de agarosa que contiene bacterias a través de la entrada del dispositivo de prueba de cultivo celular para llenar el canal para microfluidos. La solución de agarosa se gelifica luego. Posteriormente, se introduce una solución antibiótica a través del compartimento de acomodación. En este momento, la agarosa gelificada y la solución antibiótica forman una interfaz en la unión del canal para microfluidos y el compartimento de acomodación. Luego, el antibiótico cruza la interfaz, se difunde a la agarosa gelificada y se encuentra con la bacteria. Como la agarosa gelificada en su conjunto forma una película delgada sólida, las bacterias se inmovilizan en la película delgada. Esta inmovilización permite la observación de la reactividad de la bacteria en una sola célula través de un sistema de generación de imágenes. Se proporcionarán más detalles a continuación.

La Figura 5 muestra un procedimiento para la prueba de susceptibilidad a antibióticos usando el dispositivo de prueba de cultivo celular de acuerdo con una realización de la presente invención.

Primero, un medio líquido que contiene un agente gelificante se mezcla con un agente biológico para preparar una solución de mezcla.

El medio líquido comprende agua en una cantidad de aproximadamente el 95% o más. El medio líquido puede solidificarse debido a la presencia del agente gelificante. Como agente gelificante, pueden ejemplificarse agar, agarosa, gelatina, alginato, colágeno o fibrina. Se prefiere el uso de agar o agarosa. Por ejemplo, el agar puede usarse en una cantidad de 0.5 a 4% en peso en el medio líquido. El medio líquido generalmente no requiere nutrientes. Sin embargo, en algunos ejemplos, el medio líquido puede incluir nutrientes.

Ejemplos de agentes biológicos adecuados para su uso en la presente invención incluyen virus, bacterias, hongos, algas, protozoos, patógenos parásitos, células humanas y de mamíferos, y biopelículas. El agente biológico puede crecer en un medio líquido o sólido, y el crecimiento del mismo puede verse afectado por el tipo y la concentración de una sustancia fisiológicamente activa extraña. La densidad del agente biológico en la solución de mezcla es de 10^2 a 10^{10} células/ml, preferiblemente de 10^4 a 10^{10} células/ml, más preferiblemente de 10^5 a 10^9 células/ml. Si la densidad del agente biológico está por debajo del límite inferior definido anteriormente, puede ser difícil percibir la ubicación del agente biológico. Mientras tanto, si la densidad del agente biológico excede el límite superior definido anteriormente, puede ser difícil percibir el estado individual del agente biológico.

A continuación, se introduce una cantidad predeterminada (*por ejemplo*, 10-12 μ l) de la solución de mezcla a través de la entrada. Luego, la agarosa que contiene bacterias se mueve a lo largo del canal. A medida que el canal se llena con la solución de mezcla, el aire escapa del canal a través de la salida de aire, lo que facilita la introducción de la solución de mezcla en el canal.

La solución de mezcla se gelifica para formar una película delgada sólida en la que el agente biológico se inmoviliza. Cuando el medio líquido se enfría a una temperatura más baja, el medio se gelifica y, como resultado, el movimiento del agente biológico se ralentiza. Esta inmovilización facilita la observación continua del agente biológico móvil.

El dispositivo de prueba de cultivo celular está hecho preferiblemente de un material transparente para imágenes ópticas. El medio líquido puede aplicarse y gelificarse en cada canal para microfluidos del dispositivo de prueba de cultivo celular para formar una película delgada sólida. El medio líquido se alimenta a través de la entrada y se gelifica en el canal para microfluidos. El espesor de la película delgada sólida puede determinarse dependiendo de la profundidad del canal para microfluidos. La profundidad del canal para microfluidos puede estar en el rango de 1 μ m a 5 mm, 1 μ m a 3 mm, 1 μ m a 2 mm, 1 μ m a 1.5 mm, 1 μ m a 1 mm, 1 μ m a 800 μ m, 1 μ m a 500 μ m, 1 μ m a 100 μ m, 10 μ m a 3 mm, 100 μ m a 500 μ m, 10 μ m a 1 mm, 100 μ m a 1 mm, 200 μ m a 1 mm, 500 μ m a 1 mm, o 100 μ m a 500 μ m. La profundidad del canal para microfluidos es preferiblemente de 100 μ m a 500 μ m.

Cuando se tiene en cuenta el tamaño de un área de imagen, el ancho del canal para microfluidos puede ser de 100 μ m a 5 mm, 300 μ m a 5 mm, 500 μ m a 3 mm o 1 mm a 3 mm. El ancho del canal para microfluidos es preferiblemente de 1 mm a 3 mm.

No hay restricción particular en la forma y longitud del canal para microfluidos. Se prefiere que la mayor cantidad posible de la solución de mezcla del medio líquido que contiene el agente gelificante y el agente biológico se introduzca en el canal para microfluidos mientras se mantienen las dimensiones y la anchura del canal para microfluidos. Esto facilita un control preciso sobre las reacciones con el antibiótico. Preferiblemente, cada unidad de pocillo para microfluidos tiene dimensiones correspondientes al tamaño de cada pocillo de una placa multipocillo comercial y el canal para microfluidos rodea el compartimento de acomodación de manera que se alargue tanto como sea posible.

El grosor y la anchura de la película delgada sólida se determinan dependiendo de la profundidad y el ancho del canal para microfluidos. El término "película delgada" usada en el presente documento se refiere a una capa delgada que tiene un espesor suficiente para inmovilizar el agente biológico y observar el agente biológico en una sola célula. El espesor de la película delgada está típicamente en el rango de 1 μm a 5 mm, 1 μm a 3 mm, 1 μm a 2 mm, 1 μm a 1.5 mm, 1 μm a 1 mm, 1 μm a 800 μm , 1 μm a 500 μm , 1 μm a 100 μm , 10 μm a 3 mm, 100 μm a 500 μm , 10 μm a 1 mm, 100 μm a 1 mm, 200 μm a 1 mm o 500 μm a 1 mm, pero no es particularmente limitado a este rango. El grosor de la película delgada sólida puede corresponder al tamaño de un lado de la película delgada sólida en una dirección perpendicular a un lado de la película delgada sólida a observar. Cuando el grosor de la película delgada sólida está en el rango definido anteriormente, el agente biológico inmovilizado en la película delgada sólida puede observarse en una sola célula.

A continuación, se introduce una sustancia fisiológicamente activa en el compartimento de acomodación a través de una abertura del compartimento de acomodación y se deja difundir en la película delgada sólida. La sustancia fisiológicamente activa puede incluir una sustancia seleccionada de fármacos, como antibióticos, agentes anticancerígenos e inmunosupresores, nutrientes, secreciones celulares, transductores de señales, virus, células, microARN, proteínas, antígenos, anticuerpos y ADN. Es deseable que el compartimento de acomodación sea lo suficientemente grande como para acomodar una cantidad suficiente de la sustancia fisiológicamente activa. Por ejemplo, el compartimento de acomodación puede tener un diámetro de aproximadamente 3 mm a aproximadamente 15 mm y una altura de aproximadamente 3 mm a aproximadamente 15 mm. Con estas dimensiones, las reacciones de las materias primas se pueden observar fácilmente después de una inyección única de las materias primas mientras se mantienen las reacciones durante mucho tiempo.

A continuación, se observan las respuestas del agente biológico a la sustancia fisiológicamente activa. El agente biológico se inmoviliza y se distribuye bidimensionalmente en la película delgada sólida, y como resultado, se puede observar en una sola célula. Los cambios en el crecimiento de las células individuales se pueden observar típicamente en varias decenas de minutos (normalmente 30 minutos). Por consiguiente, el uso del dispositivo de prueba de cultivo celular según la presente invención permite la identificación precisa y rápida del efecto de la sustancia fisiológicamente activa sobre el agente biológico en comparación con el uso de dispositivos de prueba de cultivo celular convencionales. Por ejemplo, la prueba de actividad fisiológica en células bacterianas se puede completar en 3-4 horas. Aquí, un método de prueba de actividad fisiológica tan rápido se denomina "análisis morfológico unicelular (SCMA)". El uso del sistema MAC permite la observación de cambios en la morfología unicelular en presencia de diversos antibióticos mediante imágenes de lapso de tiempo.

Se puede usar un sistema de medición óptica para la observación. El sistema de medición óptica puede incluir un sistema de generación de imágenes, como una cámara CCD o CMOS. El sistema de medición óptica puede incluir unidades ópticas o dispositivos necesarios para enfocar e imágenes de luz, como una lente, un iluminador y una guía de luz. El sistema de medición óptica puede incluir un sistema de procesamiento de imágenes para procesar y analizar datos de imágenes observados por el sistema de generación de imágenes. El sistema de medición óptica registra y analiza rápidamente los cambios en el crecimiento del agente biológico observado durante la prueba para obtener los resultados de la prueba. Se obtiene un área de imagen desde la vecindad de la interfaz entre el canal para microfluidos y el compartimento de acomodación. El área de formación de imágenes puede tener un tamaño de aproximadamente 300 μm *300 μm a aproximadamente 500 μm *500 μm . La anchura del canal para microfluidos es al menos mayor que el del área de imágenes.

En consecuencia, el uso del dispositivo de prueba de cultivo de acuerdo con la presente invención basado en la inmovilización del agente biológico y la difusión de la sustancia fisiológicamente activa puede reducir en gran medida las cantidades de fármacos y células necesarios para la prueba de fármacos, y permite un seguimiento rápido de los cambios en el crecimiento de células individuales para obtener resultados de pruebas en las fármacos tan rápido como 2 horas (normalmente dentro de 3-4 horas), en comparación con la técnica anterior. Esta es la velocidad de prueba más rápida conocida hasta ahora.

La Figura 6 muestra imágenes de resultados experimentales que demuestran que los valores de MIC del antibiótico de penicilina para una cepa de *E. faecalis* podrían determinarse rápidamente utilizando el chip MAC. Para este experimento, una solución de *E. faecalis* se homogeneizó con agarosa líquida y se inyectó en el chip. La agarosa se gelificó a temperatura ambiente. Posteriormente, se inyectó penicilina líquida como antibiótico en los espacios del pocillo. El chip se incubó luego en una incubadora a 37°C y los resultados se observaron después de 4 horas de incubación.

Los resultados de la prueba de susceptibilidad obtenidos usando el antibiótico a varias concentraciones de 0.5 a 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se muestran en la Figura 6. La MIC de la penicilina (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) se pudo obtener en 4 horas. En contraste, según las pruebas de micro-dilución (MDT), se consumió un tiempo mucho más largo (18 horas) para obtener la MIC de la penicilina.

El uso de los canales para microfluidos puede reducir las cantidades necesarias del agente biológico y la sustancia fisiológicamente activa, lo que permite realizar pruebas de actividad fisiológica a un coste reducido. Otra ventaja

asociada con el uso del sistema de canales para microfluidos es que las respuestas de un único agente biológico a diversos tipos y concentraciones de sustancias fisiológicamente activas pueden observarse simultáneamente.

El chip MAC puede ser muy útil para el análisis de biopelículas y para la prueba de susceptibilidad a antibióticos. Las biopelículas se encuentran en áreas infectadas con microbios o a las que están unidos los microbios. Las biopelículas se refieren a películas que constituyen complejos microbianos mucilaginosos, que están formados por microbios rodeados de matrices de polímeros. La formación de biopelículas puede afectar en gran medida la salud humana. Las biopelículas causan infecciones pulmonares, otitis media, periodontitis y otras enfermedades infecciosas. La resistencia de las bacterias presentes en las biopelículas contra los antibióticos es al menos 1,000 veces más fuerte que la de las bacterias en suspensión. Se han utilizado sistemas de celdas de flujo y sistemas basados en pocillos para investigar biopelículas. Sin embargo, estos sistemas de ensayo requieren un largo tiempo de varios días para la formación de biopelículas. Otras dificultades asociadas con el uso de los sistemas de ensayo son la necesidad de teñir las biopelículas y el uso de microscopios confocales para la observación. Se necesitan más experimentos para la medición de la concentración inhibitoria mínima (MIC) o la concentración mínima de erradicación de biopelículas (MBEC). Dichos sistemas tienen un tamaño muy grande y no muestran claramente las etapas de formación de biopelículas y no representan la formación de biopelículas *in vivo*.

Por lo tanto, existe la necesidad de sistemas eficientes que sean adecuados para investigar la formación de biopelículas y la reactividad de las biopelículas con antibióticos. En consideración a esta necesidad, el chip MAC de acuerdo con una realización de la presente invención demuestra ser una excelente alternativa a los sistemas convencionales.

La Figura 7 muestra imágenes que muestran las formas de biopelículas que responden a un antibiótico, que se investigaron usando el chip MAC de acuerdo con una realización de la presente invención. Para este experimento, una solución de *E. faecalis* se homogeneizó con agarosa líquida y se inyectó en el chip. La agarosa se gelificó a temperatura ambiente. Posteriormente, se inyectó penicilina líquida como antibiótico en los compartimentos de acomodación del chip MAC. El chip se incubó luego en una incubadora a 37°C y los resultados se observaron después de 4 horas de incubación. Las bacterias fueron inmovilizadas por la agarosa circundante. En este estado, las bacterias se dividieron continuamente para formar poblaciones bacterianas, que constituyen una biopelícula.

Ciertas especies de bacterias crecen en filamentos en presencia de un antibiótico específico a una concentración superior a la MIC. Este crecimiento filamentosos no se distingue claramente de la división de la bacteria, que parece crecimiento. Por lo tanto, puede haber dificultades para determinar la MIC.

La Figura 8 muestra el crecimiento de una especie bacteriana gram-negativa en agarosa en presencia de un antibiótico β -lactámico a diferentes concentraciones en un estado en donde la agarosa se mezcló con una solución de la bacteria. Se puede observar en la Figura 8 que las bacterias aún crecían incluso a concentraciones superiores a la MIC. En los resultados de MDT, sin embargo, se observó que el crecimiento de la bacteria se inhibía a 0.06 $\mu\text{g/ml}$.

La Figura 9 es un diagrama detallado que explica los fenómenos mostrados en la Figura 8. En este experimento, se inyectó un antibiótico en un estado en donde las bacterias se mezclaron con agarosa. El antibiótico se ajustó para tener concentraciones por debajo y por encima de la MIC. Los resultados muestran el crecimiento filamentosos de la bacteria en la MIC (parte inferior de la Figura 9) y el crecimiento dividido de la bacteria en la MIC (parte superior de la Figura 9), que se parece al crecimiento filamentosos. La Figura 10 muestra la aparición de los fenómenos explicados en la figura 9 en una cepa de *E. coli* en presencia de un antibiótico β -lactámico. El crecimiento divisorio de las bacterias en la MIC no se distinguió del crecimiento filamentosos de las bacterias en la MIC, lo que causó dificultad para determinar la MIC. Por lo tanto, la formación de una monocapa de la bacteria en un área de imagen permitiría una observación más precisa.

De acuerdo con una realización de la presente invención, se proporciona un método de prueba de susceptibilidad a antibióticos mediante el cual se puede observar una monocapa de foco único.

Generalmente, cuando se introduce una solución de mezcla homogénea de bacterias y un medio líquido que contiene agarosa en cada canal para microfluidos, un cierto número de bacterias están presentes estocásticamente en el fondo del canal para formar una monocapa. La introducción secuencial de la bacteria y el medio líquido que contiene agarosa como materia prima en cada canal para microfluidos se considera un enfoque preferible para formar una mejor monocapa.

La Figura 11 muestra un procedimiento para introducir materias primas en el canal para microfluidos para obtener una imagen de una monocapa de bacterias. Con referencia a la Figura 11, primero, se introduce una solución de cultivo bacteriano en el canal para microfluidos a través de la entrada del dispositivo de prueba de cultivo celular. En este momento, se prefiere que un espacio predeterminado del canal para microfluidos permanezca sin llenar y que solo una parte del canal se llene con la solución de cultivo. Por ejemplo, aproximadamente un tercio del volumen del canal se llena con la solución de cultivo, y luego se introduce un medio líquido que contiene agarosa en el canal para microfluidos. La introducción rápida del medio líquido que contiene agarosa crea un flujo laminar del medio líquido y hace que las bacterias se acumulen en las superficies de las paredes del canal (principalmente en las superficies de

las paredes superior e inferior del canal cuando el ancho y la profundidad del canal son tomados en consideración) Como consecuencia, las bacterias se pueden distribuir sustancialmente en forma de monocapa en las superficies de las paredes.

5 La Figura 12 muestra imágenes que muestran el crecimiento de una especie bacteriana en presencia de un antibiótico a diferentes concentraciones en un estado en donde las bacterias se formaron en una monocapa. Las bacterias se dividieron en concentraciones (control y 0.06 µg/mL) bajo la MIC mientras que crecieron solo en forma de filamentos a una concentración (0.5 µg/mL) sobre la MIC. A partir de estas observaciones, se pudo determinar la MIC. La Figura 13 muestra imágenes que muestran el crecimiento de una cepa de *P. aeruginosa* en presencia de aztreonam como antibiótico β-lactámico a concentraciones (control y 0.06 µg/mL) bajo la MIC y concentraciones (0.25 y 0.5 µg/ mL) sobre la MIC. Las bacterias se dividieron para crecer en forma de filamentos debajo de la MIC, mientras que crecieron solo en forma de filamentos sobre la MIC. La MIC se puede determinar observando la división de la bacteria en las imágenes de las monocapas.

15 De acuerdo con la presente invención, las células pueden observarse tanto mediante generación de imágenes monocapa de foco único como mediante generación de imágenes 3D. Es decir, cuando se introduce una mezcla de agarosa como agente gelificante y células bacterianas en cada canal, las células pueden observarse en forma de una monocapa en la interfaz entre la placa inferior del chip MAC y la agarosa y pueden observarse en las otras porciones después del cultivo 3D.

20 Mientras tanto, la adición secuencial de células bacterianas y un agente gelificante (agarosa) a través de una entrada conduce a la formación de una monocapa de la bacteria, que se puede observar mediante imágenes de foco único.

25 Además, el uso del dispositivo de prueba de cultivo celular según la presente invención permite la observación de una infección doble mediante generación de imágenes.

Las Figuras 14 y 15 son imágenes de microscopía óptica que muestran el crecimiento de dos cepas bacterianas sin antibiótico y dos cepas bacterianas resistentes a un antibiótico, revelando que podría medirse la doble infección con las cepas bacterianas.

30 Las condiciones experimentales son las siguientes:

* Cepas

- 35 • *E. coli* ATCC 25922 (cepa en forma de barra)
-
- *E. faecalis* ATCC 29212 (cepa esférica)
-

* Antibióticos

- 40 • Gentamicina (concentración: 32 µg/mL)
-

Las MIC están en el rango susceptible para ambas cepas

- 45 • Eritromicina (concentración: 8 µg/mL)
-

Susceptible a *E. faecalis* ATCC 29212 solamente

- Control
-

50 * Tiempo de incubación: 3 horas.

* Concentración de cepa

- 55 • McFarland 0.25
-

* Concentración de agarosa: 2%

* Observado con lentes de aumento de 100×

60 Las formas de las bacterias eran difíciles de discernir en las imágenes de 0 horas y no se pudieron controlar hasta que las bacterias se dividieron en cierta medida después del lapso de 4 horas. En este momento, se confirmó la coexistencia de las bacterias en forma de bastón y las bacterias esféricas. También se pudo confirmar si se produjo una infección doble con la bacteria.

65

5 La Figura 16 es un diagrama que muestra el cultivo en 3D de células de mamífero usando el dispositivo de prueba de cultivo celular de acuerdo con una realización de la presente invención. Para este experimento, se introdujo una mezcla de células de mamífero y un ECM (colágeno, matrigel, fibrina, agarosa, etc.) en el canal. Después de la gelificación del ECM, se inyectó un medio o un fármaco. Como resultado, las células fueron cultivadas por nutrientes suministrados por el medio. Alternativamente, las células fueron destruidas por el fármaco. En tales entornos, la bacteria creció tridimensionalmente, *es decir*, en cultivo 3D.

10 La Figura 17 muestra los valores de MIC para 4 especies de cepas clínicas, medidos por análisis morfológico unicelular (SCMA) utilizando el chip MAC. Se obtuvieron cuatro cepas, incluidas *E. coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, de aproximadamente 40 pacientes del profesor Seung-ok Lee (Department of diagnostic medicine, Incheon St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea). Se usaron lentes objetivo 60× (lentes 40× para *E. coli*) para microscopía. A Mc=0.5, cada cepa se mezcló con agarosa. Se observó la formación de una monocapa en el fondo. El valor MIC se pudo obtener usando el chip MAC en 4 horas. Con referencia a la Figura 17, los valores de MIC medidos utilizando el chip MAC estaban en buen acuerdo con los rangos de MIC (*es decir*, los rangos de control de calidad) definidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Por lo tanto, el análisis morfológico de una sola célula utilizando el chip MAC puede considerarse un ensayo AST muy rápido y preciso.

20 Aunque la presente invención se ha descrito en detalle con referencia a los dibujos y realizaciones, los expertos en la materia apreciarán que se pueden realizar diversas variaciones y modificaciones a las realizaciones sin apartarse del espíritu de la presente invención como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

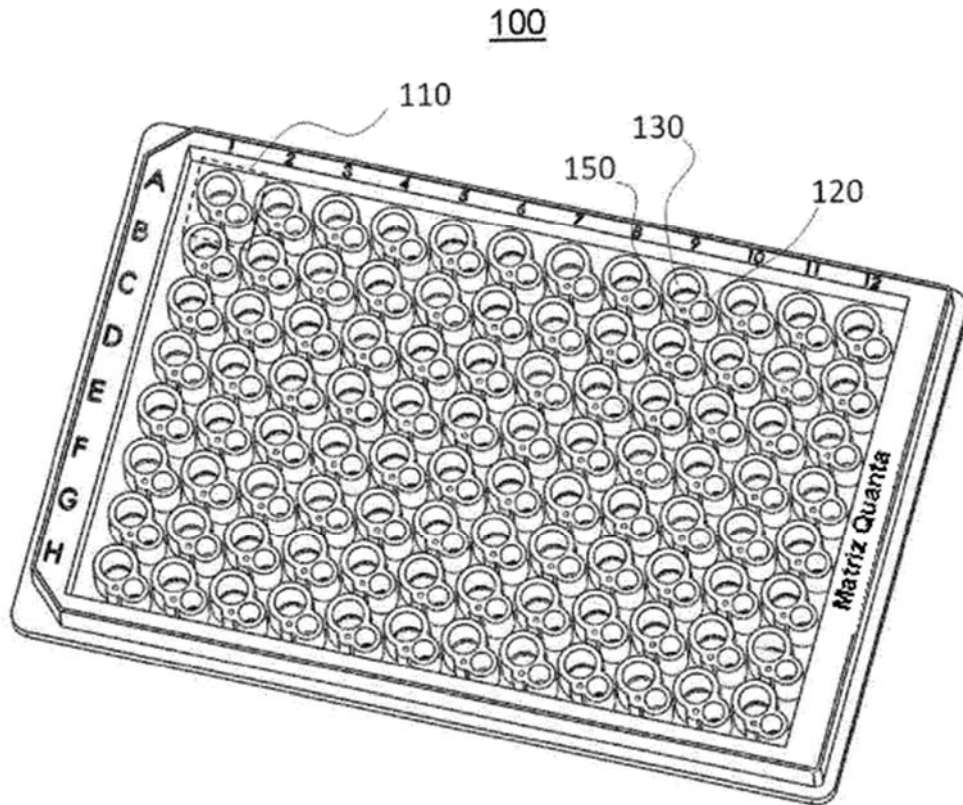
REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de prueba de cultivo celular en microfluidos basado en múltiples pocillos que tiene una estructura de matriz de una pluralidad de unidades de pocillos para microfluidos alineados, cada una de las unidades de pocillos para microfluidos comprende una entrada a través de la cual entra un primer fluido, un compartimento de acomodación adaptado para acomodar un segundo fluido en el mismo, un canal para microfluidos a través del cual fluye el primer fluido, y una salida de aire adaptada para facilitar la entrada del primer fluido, en donde el canal para microfluidos está en comunicación con la entrada y la salida de aire de manera que se permite que el primer fluido fluya y llenar el canal para microfluidos, en donde el compartimento de acomodación está diseñado en forma de un pocillo de modo que el segundo fluido entrante se retiene, y se forma una válvula capilar donde una parte del lado lateral inferior del compartimento de acomodación está en comunicación con una parte del lado lateral del canal para microfluidos de modo que el primer fluido y el segundo fluido se encuentran para formar una interfaz, en donde la salida de aire está formada en un extremo del canal para microfluidos, está en comunicación con la pared superior del canal para microfluidos y está expuesta a la atmósfera.
2. El dispositivo de prueba de cultivo celular basado en múltiples pocillos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las dimensiones de la unidad de pocillo para microfluidos corresponde a los de cada uno de los pocillos de una placa comercial de múltiples pocillos.
3. El dispositivo de prueba de cultivo celular basado en múltiples pocillos de acuerdo con la reivindicación 2, en donde los pocillos están dispuestos en matriz 1×1, 1×2, 1×4, 2×4, 4×6, 12×8, 24×16 o 48×32.
4. El dispositivo de prueba de cultivo celular basado en múltiples pocillos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el canal para microfluidos está dispuesto para rodear el compartimento de acomodación de modo que la unidad de pocillo para microfluidos tenga una estructura cuadrangular.
5. El dispositivo de prueba de cultivo celular basado en múltiples pocillos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la válvula capilar tiene un grosor y anchura predeterminados para evitar que el primer fluido entre en el compartimento de acomodación.
6. El dispositivo de prueba de cultivo celular basado en múltiples pocillos de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el grosor de la válvula capilar está definido por el grosor del canal para microfluidos.
7. El dispositivo de prueba de cultivo celular basado en múltiples pocillos de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la válvula capilar tiene un espesor de 100 a 500 μm y una anchura de 500 μm a 2 mm.
8. Dispositivo de prueba de cultivo celular basado en múltiples pocillos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el primer fluido es una solución de mezcla de un medio líquido que contiene un agente gelificante y un agente biológico y el segundo fluido es una solución que contiene una sustancia fisiológicamente activa.
9. El dispositivo de prueba de cultivo celular basado en múltiples pocillos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cuerpo del dispositivo de prueba de cultivo celular está hecho de un material transparente.
10. Un método de análisis celular que utiliza un dispositivo de prueba de cultivo celular basado en múltiples pocillos para microfluidos que tiene una estructura de matriz de una pluralidad de unidades de pocillos para microfluidos alineados, cada una de las unidades de pocillos para microfluidos comprende una entrada a través de la cual entra una solución de mezcla de un agente gelificante que contiene medio líquido y un agente biológico, un compartimento de acomodación adaptado para acomodar una sustancia fisiológicamente activa en el mismo, un canal para microfluidos en comunicación con la entrada y a través del cual fluye el medio líquido, y una válvula capilar a través de la cual una porción del lado lateral inferior del canal para microfluidos está en comunicación con una parte del lado lateral del compartimento de acomodación, comprendiendo el método los pasos de (a) introducir la solución de mezcla del medio líquido que contiene el agente gelificante y el agente biológico en la entrada para llenar la solución de mezcla en el canal para microfluidos y gelificando la solución de mezcla para formar una película delgada sólida; (b) alimentar la sustancia fisiológicamente activa en el compartimento de acomodación y difundir la sustancia fisiológicamente activa en la película delgada sólida a través de la válvula capilar; y (c) observar los cambios del agente biológico que ocurren en una interfaz donde la solución de la mezcla y la sustancia fisiológicamente activa se encuentran en una sola célula.
11. El método de análisis celular de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la etapa (a) comprende (a-1) introducir una solución que contiene el agente biológico en la entrada para llenar una porción del canal para microfluidos y (a-2) introducir además el medio líquido que contiene el agente de gelificación en la entrada para permitir que el medio líquido forme un flujo laminar y llene el canal para microfluidos, de modo que se forme una monocapa del agente biológico en las superficies de las paredes superior e inferior del canal para microfluidos.
12. El método de análisis celular de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende además una etapa de (d) observar las respuestas del agente biológico a la sustancia fisiológicamente activa con base en una sola célula para

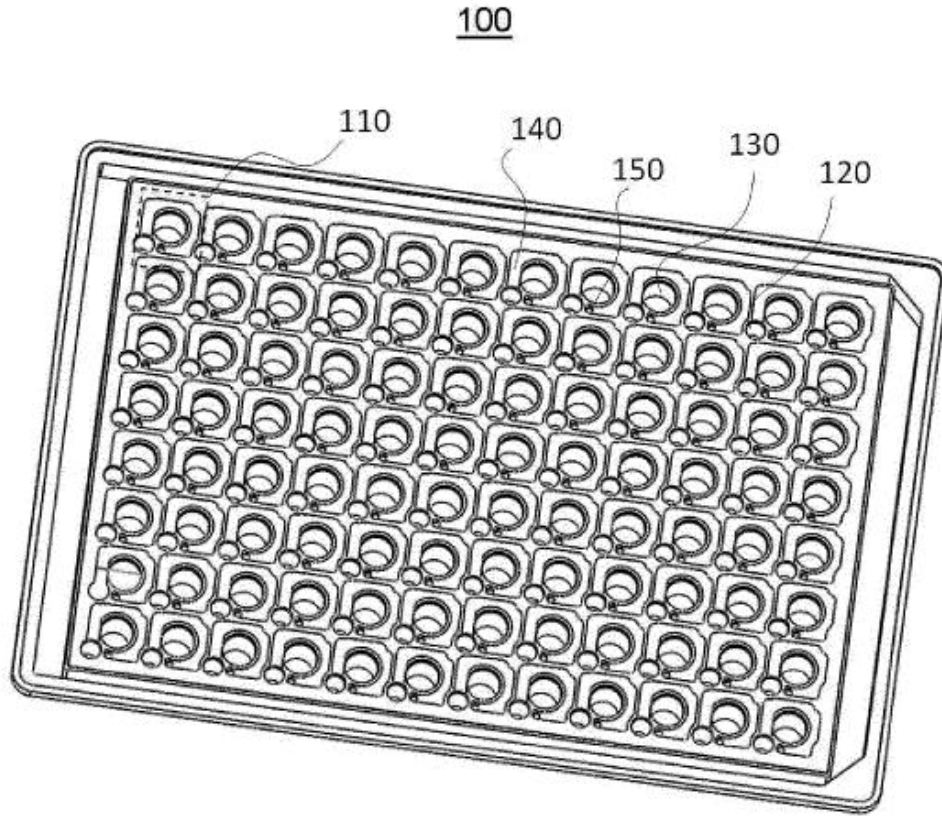
ES 2 745 752 T3

determinar la concentración inhibitoria mínima (MIC) o la concentración mínima de erradicación de biopelícula (MBEC) de la sustancia fisiológicamente activa.

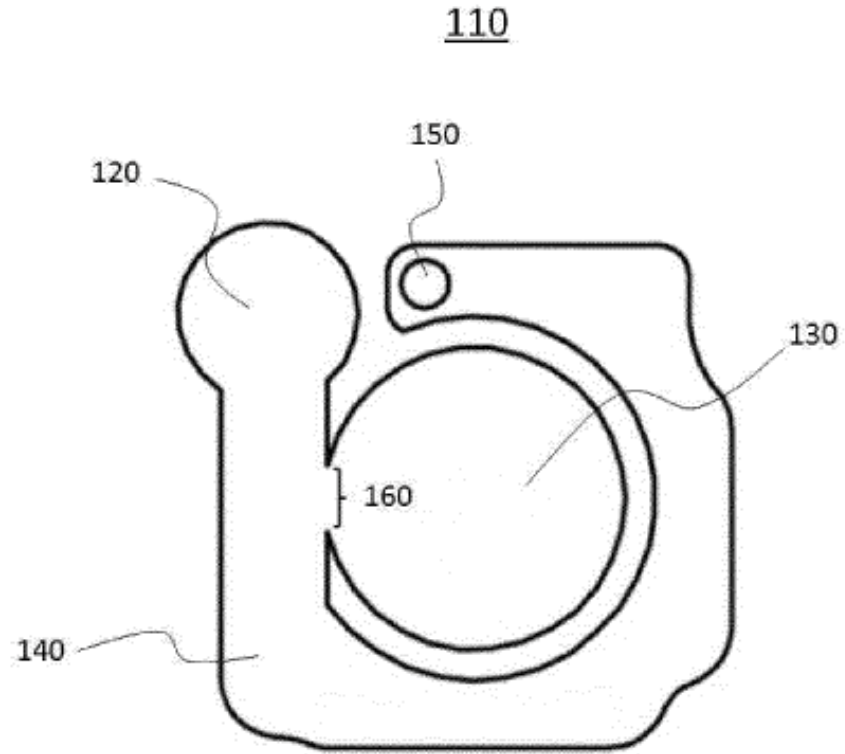
[Fig. 1]



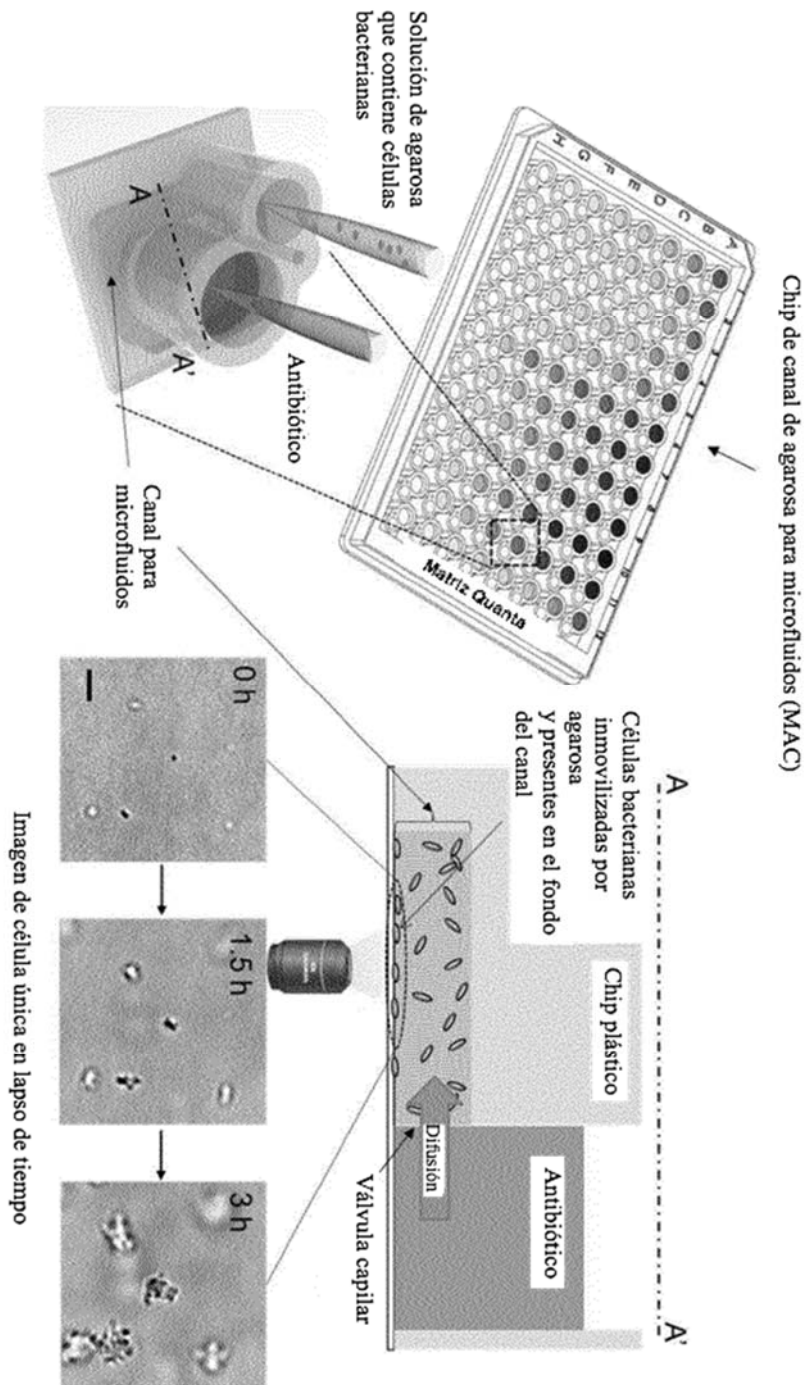
[Fig. 2]



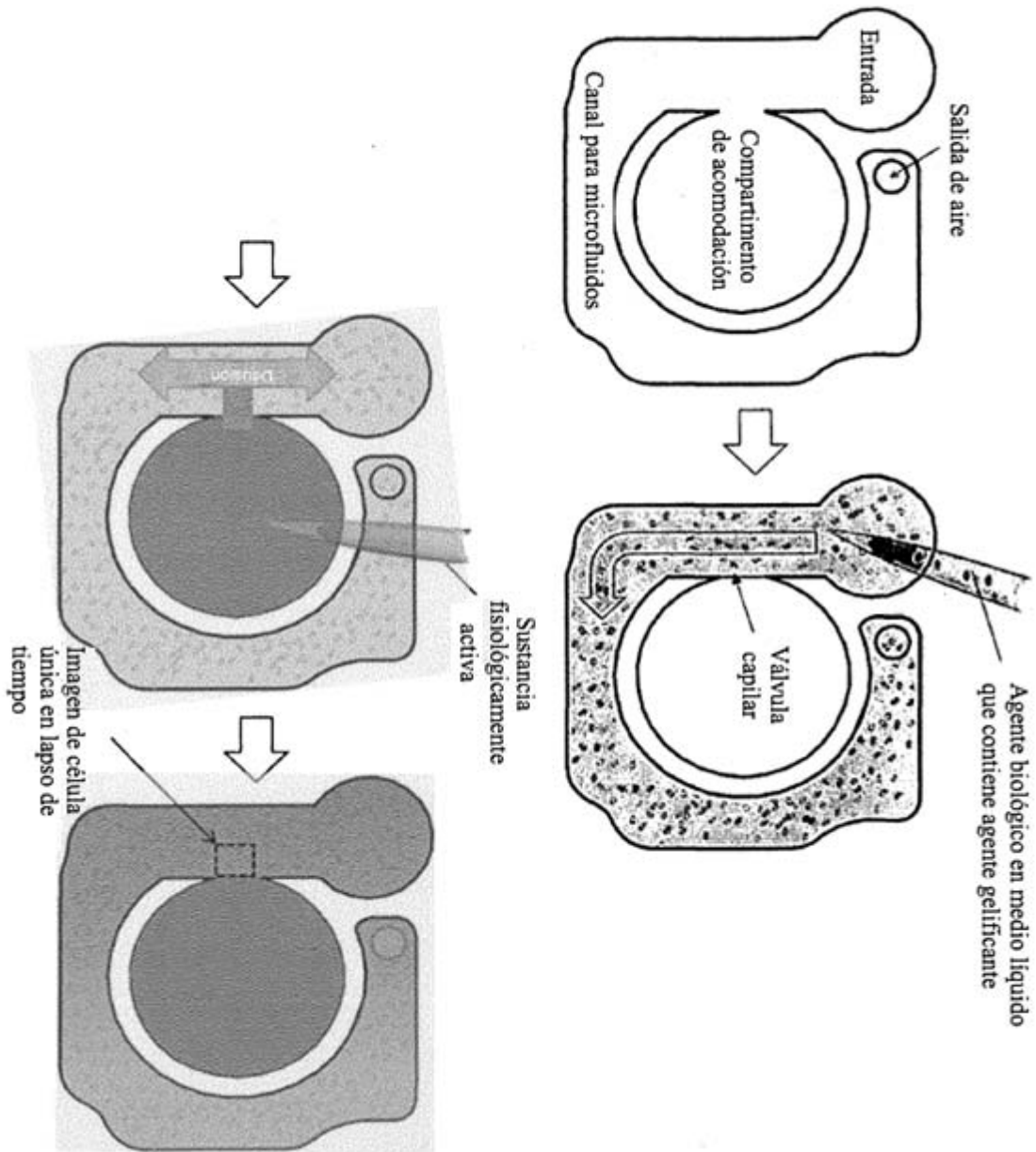
[Fig. 3]



[Fig. 4]

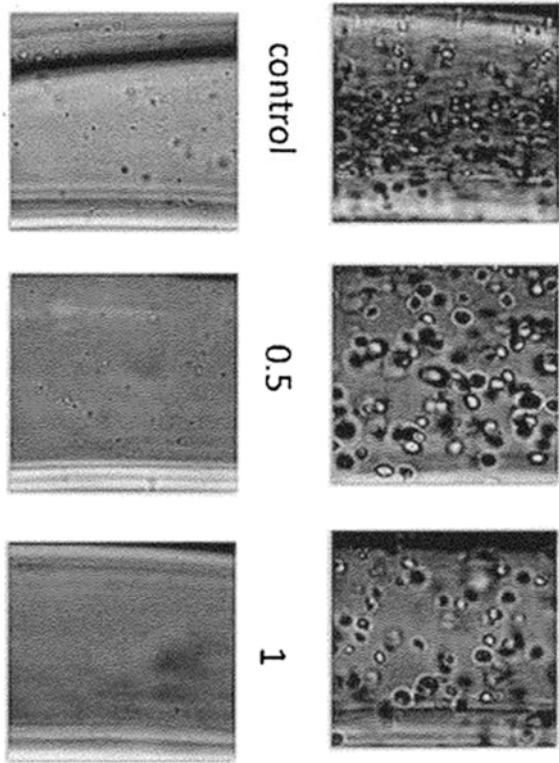


[Fig. 5]



Cepa: *E. fecalis* 1.5%, Antibiótico: penicilina (ug/ml), 4 horas de incubación

[Fig. 6]



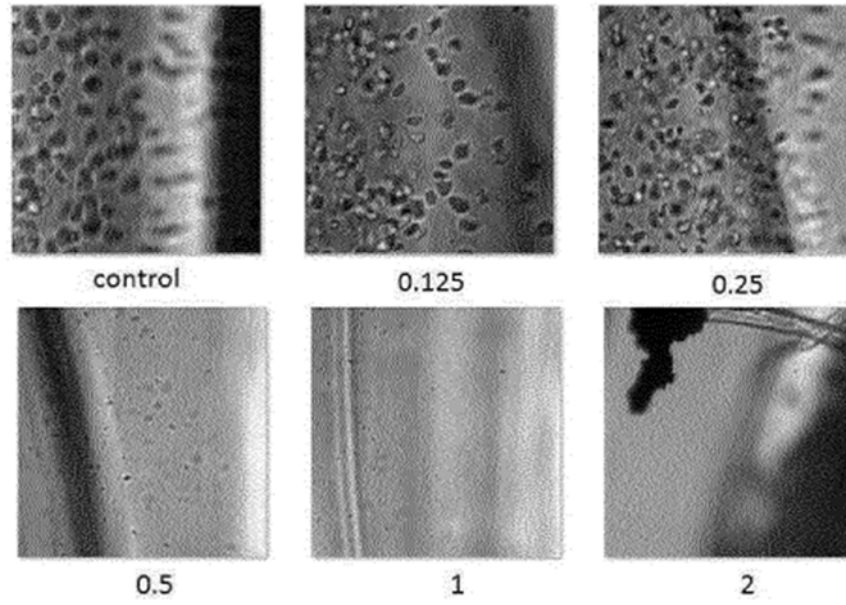
MIC = 2 ug/ml

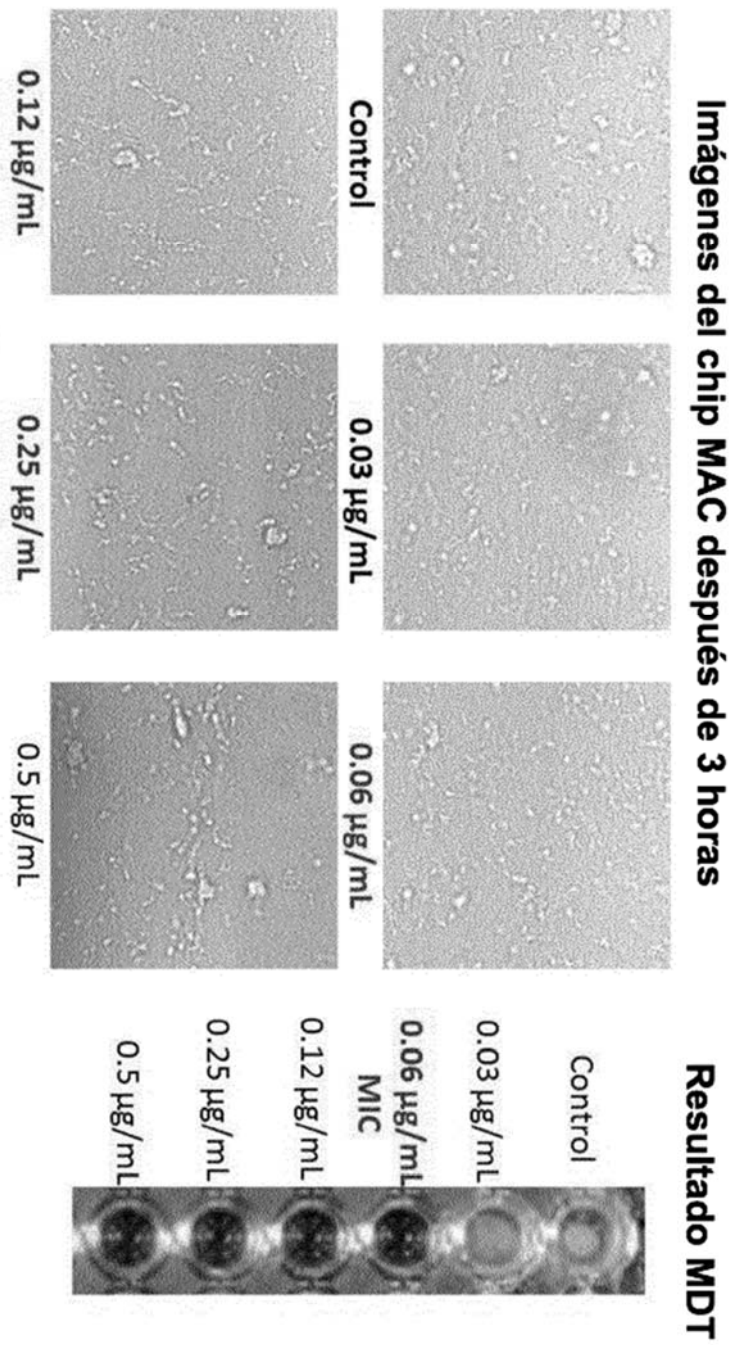
**Prueba de microdilución
18 horas de incubación**

	Penicilina	
	0.026	0.022
Control	0.03	0.035
0.5	0.037	0.031
1	0.01	0.005
2	-0.001	-0.002
4	0	-0.001
8	-0.001	-0.001

[Fig. 7]

Cepa: *E. coli* 1.5%, Antibiótico: Gentamicina (ug/ml), 4 horas de incubación

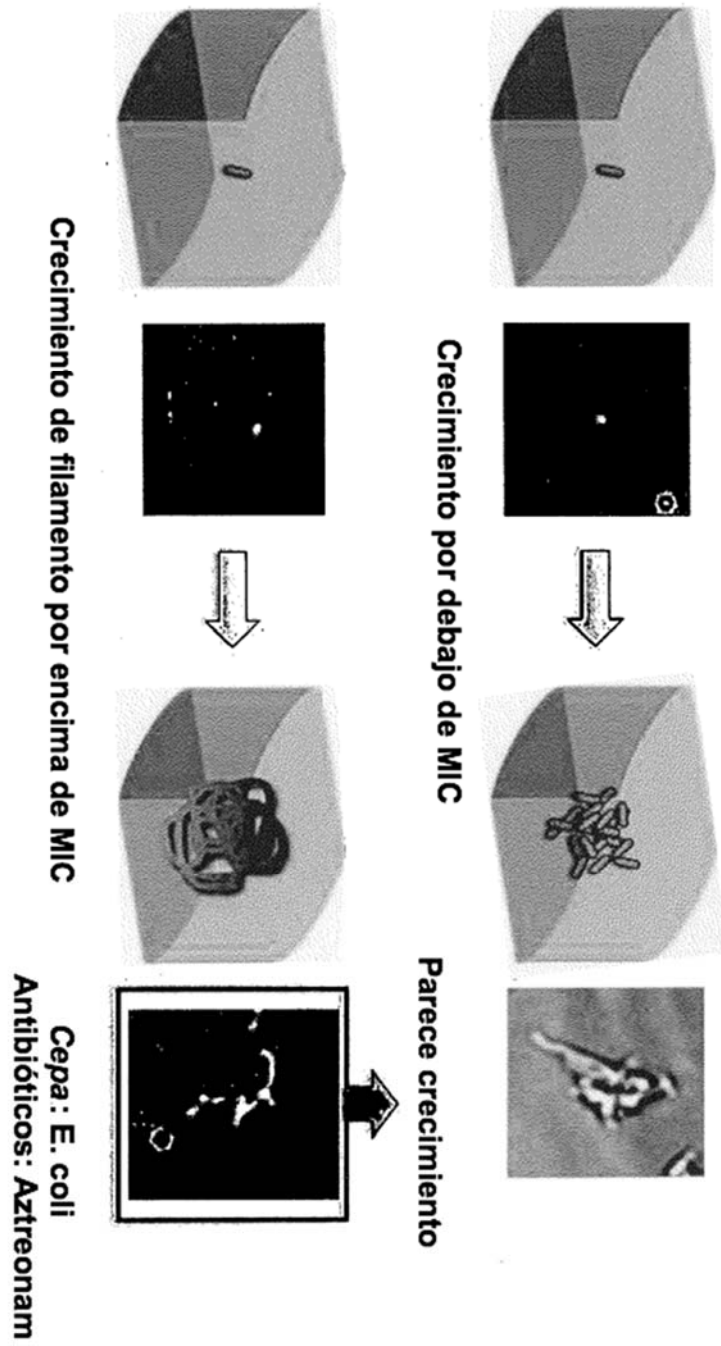




[Fig. 8]

Cepa: *E. coli* ATCC 25922
Antibiótico: Aztreonam

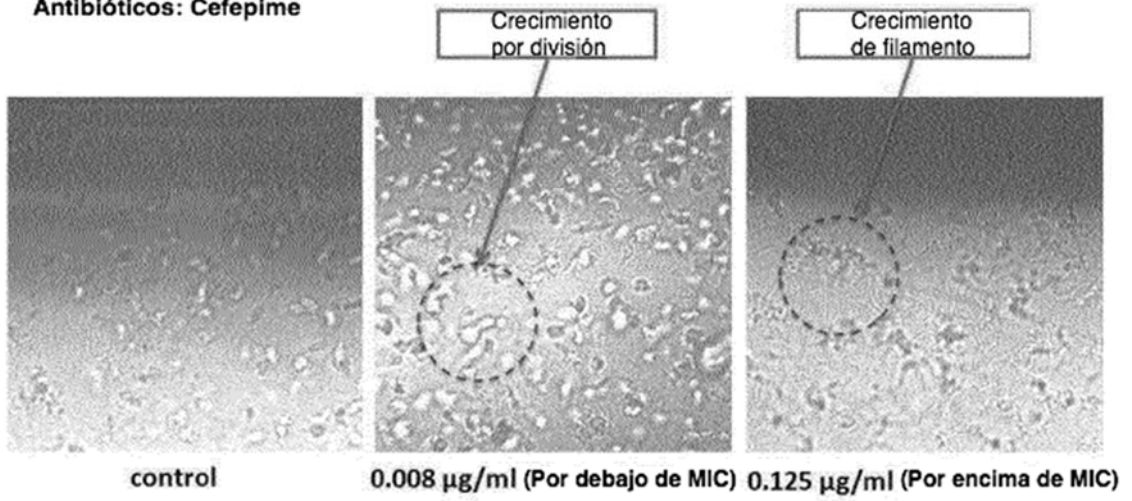
[Fig. 9]



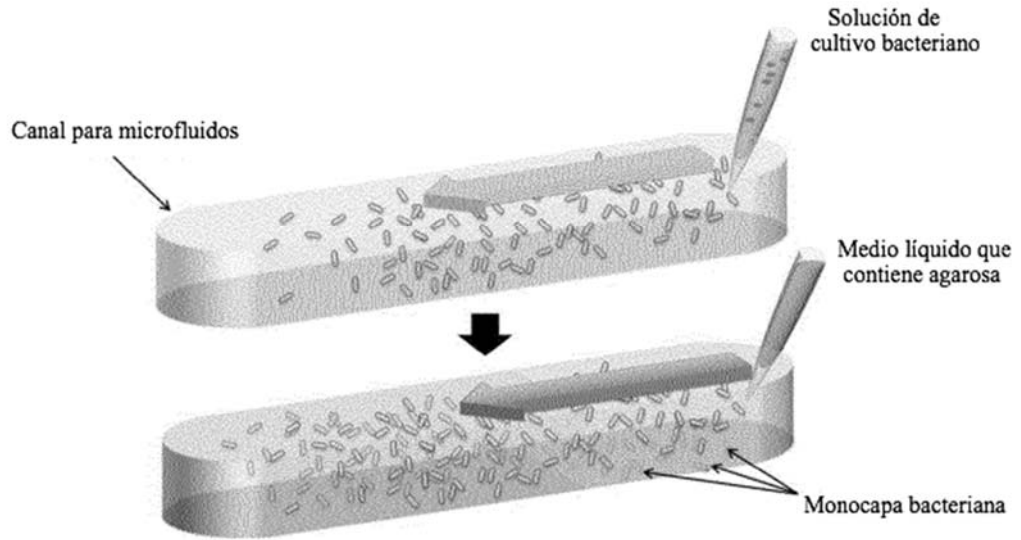
[Fig. 10]

Cepa: *E. coli* ATCC 25922

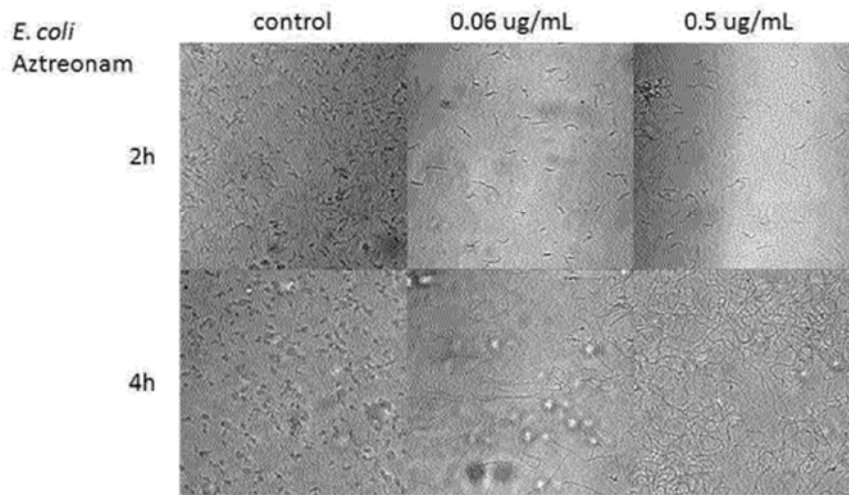
Antibióticos: Cefepime



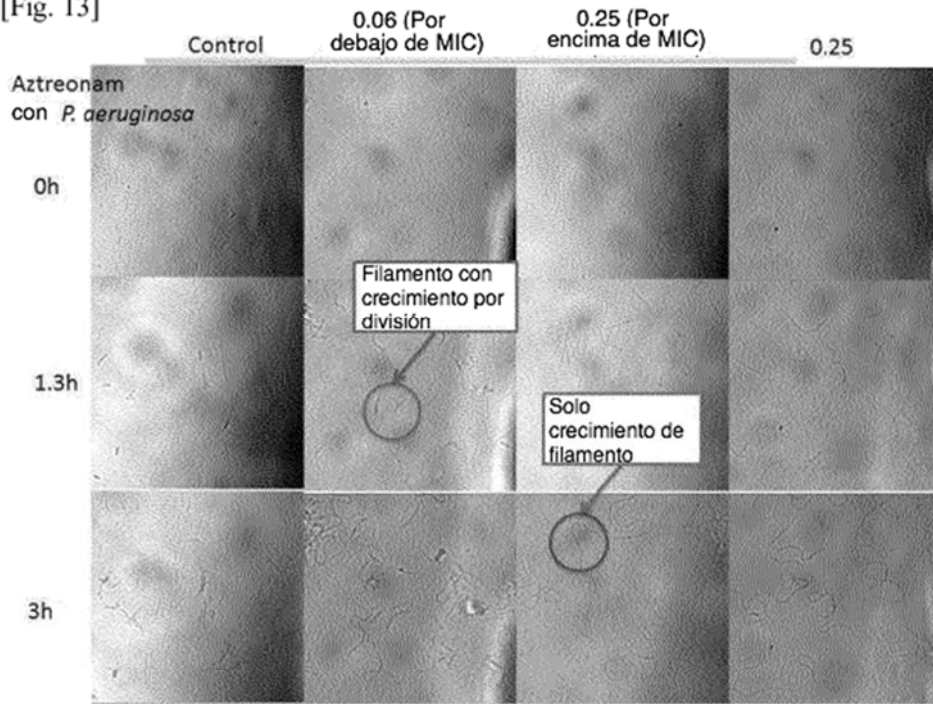
[Fig. 11]



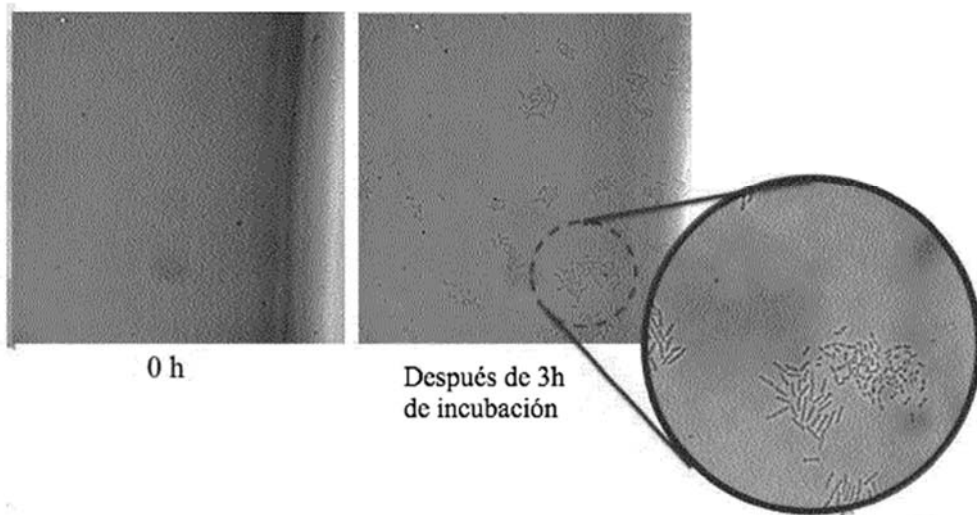
[Fig. 12]



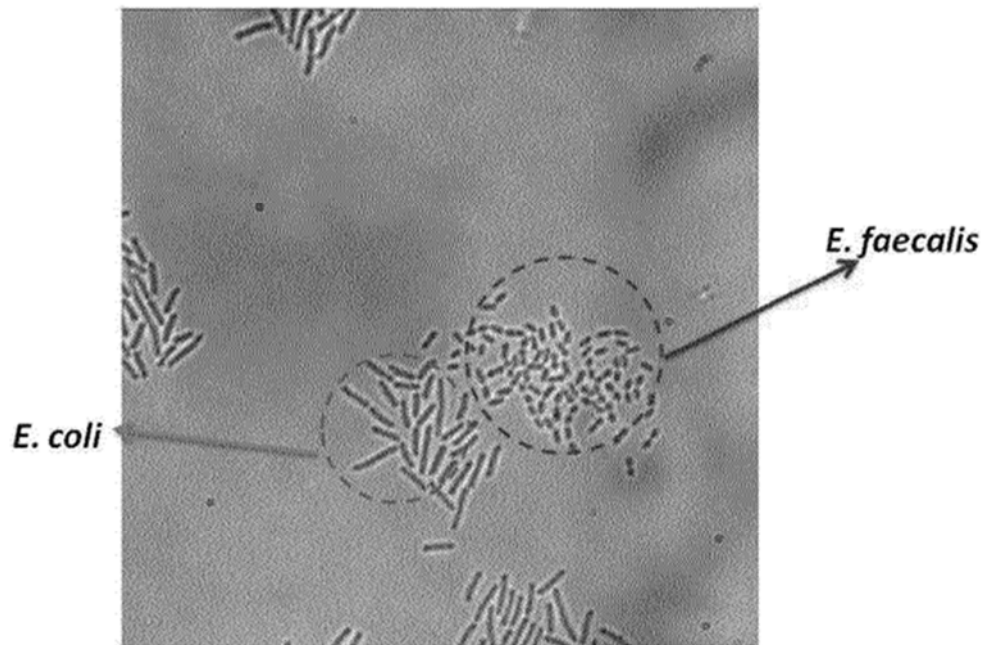
[Fig. 13]



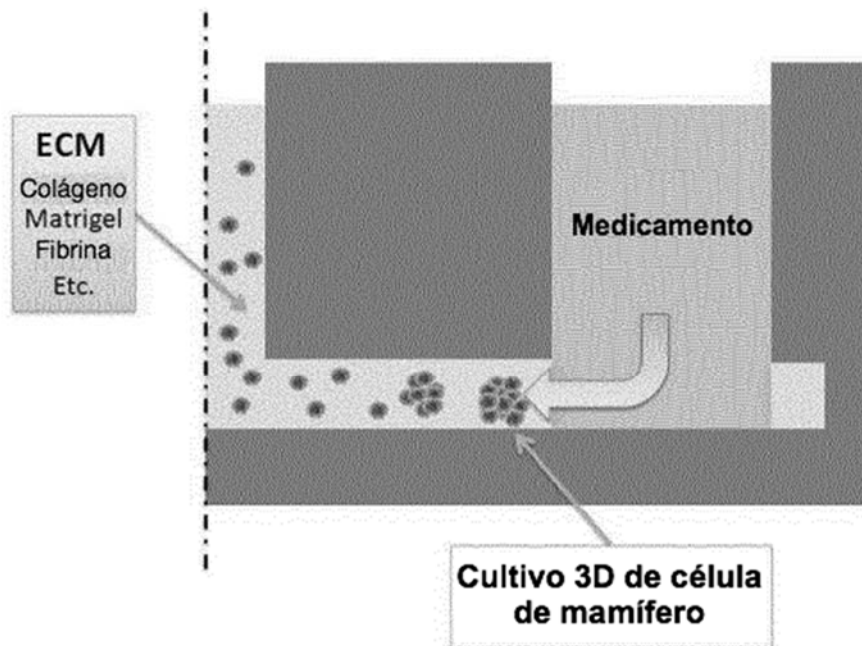
[Fig. 14]



[Fig. 15]



[Fig. 16]



[Fig. 17]

Cepas gram-negativas		<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	
Antibiótico	MAC	Rango QC	MAC	Rango QC	
Amikacina	0.5-1	0.5-4	1-2	1-4	
Amoxicilina/Ácido clavulánico	4/2	2/1-8/4	-	-	
Ampicilina	2-4	2-8	-	-	
Aztreonam	0.12	0.06-0.25	2-4	2-8	
Cefazolina	2	1-4	-	-	
Cefepime	0.03-0.06	0.015-0.12	0.5-2	0.5-4	
Cefotaxima	0.06	0.03-0.12	16	8-32	
Cefotaxina	2	2-8	-	-	
Ceftazidima	0.5	0.06-0.5	2-4	1-4	
Ciprofloxacina	0.004-0.008	0.004-0.015	0.25-0.5	0.25-1	
Gentamicina	0.25	0.25-1	0.5-1	0.5-2	
Imipenem	0.12	0.06-0.25	1	1-4	
Norfloxacina	0.03-0.06	0.03-0.12	-	-	
meropenem	-	-	1	0.25-1	
Piperacilina	2	1-4	4-8	1-8	
Piperacilina/Tazobactam	1/4-2/4	1/4-4/4	2/4-8/4	1/4-8/4	
Tetraciclina	1	0.5-2	-	-	
Timetropina/Sulfametoxazol	≤0.5/9.5	≤0.5/9.5	-	-	
Ticarcilina	-	-	16	8-32	
Ticarcilina/Ácido clavulánico	-	-	16/2	8/2-32/2	
Tobramicina	-	-	0.25-0.5	0.25-1	
Tiempo de medición	3 h	16-20 h	3 h	16-20 h	

Cepas gram-positivas		<i>S. aureus</i> ATCC 29213		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	
Antibiótico	MAC	Rango QC	MAC	Rango QC	
Ampicilina	1	0.5-2	0.5-1	0.5-2	
Amoxicilina/Ácido clavulánico	0.25/0.12-0.5/0.25	0.12/0.06-0.5/0.25	-	-	
Ciprofloxacina	0.5	0.12-0.5	0.5-2	0.25-2	
Clindamicina	0.12	0.06-0.25	-	-	
Eritromicina	0.25	0.25-1	1 (6h)	1-4	
Gentamicina	0.25-0.5	0.12-1	≤500	≤500	
Imipenem	0.03	0.015-0.06	-	-	
Levofloxacina	0.12-0.25	0.06-0.5	1	0.25-2	
Linezolid	1-4	1-4	1-2	1-4	
Oxacilina	0.5	0.12-0.5	-	-	
Norfloxacina	-	-	2-4	2-8	
Penicilina	0.5	0.25-2	1-2	1-4	
Rifampin	0.004-0.008 (6 h)	0.004-0.015	0.5	0.5-4	
Nivel alto de estreptomicina	-	-	≤500	≤500	
Teicoplanina	-	-	0.5	0.25-1	
Tetraciclina	0.12-0.5	0.12-1	8 (6 h)	8-32	
Timetropina/Sulfametoxazol	≤0.5/9.5	≤0.5/9.5	-	-	
Vancomicina	1	0.5-2	2-4	1-4	
Tiempo de medición	4 hr	16-20 h	4 h	16-20 h	