



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 422**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 21/03 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05771979 .1**

96 Fecha de presentación : **16.08.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1791970**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.06.2007**

54 Título: **Detección de bacterias en fluidos.**

30 Prioridad: **16.08.2004 US 601644 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.04.2011

73 Titular/es: **BACTERIOSCAN
South Industrial Zone
23100 Migdal Ha'Emek, IL**

72 Inventor/es: **Weichselbaum, Amnon;
De La Zerda, Jaime y
Regev, Issachar**

74 Agente: **García Egea, Isidro José**

ES 2 356 422 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

Detección de bacterias en fluidos

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere en general al análisis de un fluido corporal. En particular, la presente invención se refiere al análisis óptico de la orina, para detectar la presencia de bacterias, las medidas de dispersión de la luz y la filtración.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 Los líquidos acuosos, tales como soluciones, emulsiones o suspensiones son muy comunes en el contexto biológico. Tales son el agua potable para consumo humano o animal, alimentos líquidos o bebidas, orina, líquido amniótico o de la columna vertebral. Tales fluidos pueden ser, en ocasiones, analizados para comprobar la presencia de bacterias. En los laboratorios de microbiología clínica, una gran proporción de las muestras analizadas son las muestras de orina. Un análisis típico de muestras de orina que implique uso de microscopio y/o cultivos, exige prácticos cualificados y consumen tiempo y recursos. Por lo tanto, cualquier método de detección rápida y económica que pueda evitar una cantidad significativa de métodos analíticos caros y consumidores de tiempo, sería beneficioso.

15 Las tiras reactivas para la detección de infecciones del tracto urinario están disponibles en el mercado. Estas cintas incluyen reactivos específicos incluidos en dos almohadillas distintas. Una almohadilla contiene reactivos de las pruebas para detectar la presencia de la esterasa de leucocitos en la muestra. La otra pastilla contiene reactivos para analizar el nitrito de tal modo que se determine la presencia de bacterias de formación de nitrito. La detección de la infección bacteriana se logra haciendo coincidir las almohadillas coloreadas con una gradación de colores en las tablas de color calibrado. La solicitud de patente europea 0320154A1 describe un método para la exploración de la orina sobre la base de un enfoque similar. El método incluye la realización de al menos dos análisis diferentes realizados en porciones de una muestra de orina mezclada con reactivos específicos. Un análisis detecta la presencia de leucocitos y el otro detecta la presencia de compuestos generados por las bacterias tales como el nitrito. Sin embargo, ambos métodos mencionados *supra* fallan en la detección de bacterias no generadas por aquellos productos que concuerdan con los reactivos específicos incluidos. Los métodos se basan en una concentración relativamente alta de bacterias en la muestra sometida a análisis y, por lo tanto, estos procesos de exploración son propensos a la sensibilidad suficiente y relativamente baja especificidad. Además, estos métodos de exploración están limitados a poblaciones específicas de pacientes, no deberían aplicarse, por ejemplo, a niños y/o a mujeres embarazadas.

20 La Patente Europea 1136563 divulga un método para la detección y cuantificación de bacterias en la orina que comprende la medición de la emisión de fluorescencia y subsiguiente dispersión en un velocímetro de flujo en la presencia de surfactante catiónico para reducir la interferencia por contaminantes, tales como hebras de mucosa, cristales, sales amorfas y fragmentos de células.

25 Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para detectar bacterias en un líquido que comprende las etapas de:

- a. filtrado de una muestra de dicho líquido por medio de un primer filtro de partículas de tal forma que se excluyan partículas más grandes que dichas bacterias;
- 40 b. iluminar dicha muestra de líquido utilizando un haz de luz colimada;
- c. la medición de la intensidad de la luz dispersada por dicha muestra de líquido por lo menos en un punto; y
- d. la comparación de dicha luz dispersada a una escala de calibración.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

45 La figura. 1 es una representación esquemática de un sistema para detectar bacterias en fluidos de acuerdo con la presente invención;.

La figura 2 es una visión en sección transversal en una cubeta esquemática de acuerdo con una realización preferida de la presente invención;

50 La figura 3 es una visión en sección transversal en una unidad óptica esquemática de un sistema para detectar bacterias en líquidos de acuerdo con una realización preferida de la presente invención;

La figura 4A es una visión isométrica de una unidad de cubeta de acuerdo con una realización preferida de la presente invención;

La figura 4B es un plano de despiece de la unidad de la cubeta que se muestra en la figura. 4A;

La figura 4C es una vista en sección transversal en una unidad de cubeta de acuerdo con otra realización preferida de la presente invención;

La figura 4D es una visión en sección transversal de la unidad de la cubeta que se muestra en la figura 4C;

5 La figura 5 es un sistema de coordenadas polares de una distribución simulada angular de la intensidad de la luz dispersada por dos partículas de diferentes tamaños;

La figura 6A es un gráfico que compara un perfil de dispersión simulada frente a un perfil de dispersión medida de una muestra de orina típica complementado con bacterias;

10 La figura 6B es un gráfico que compara las contribuciones simuladas frente las contribuciones medidas de las bacterias y las partículas de sal a los perfiles de dispersión de la figura 6A;

La figura 7A es una distribución angular de dispersión medida para una muestra usual de orina que contenga bacterias de unas medidas de 10^3 UFC/ml.

La figura 7B es una distribución angular de dispersión medida para una muestra usual de orina que contenga 10^4 UFC/ml.

15 La figura 7C es una distribución angular de dispersión medida para una muestra usual de orina que contenga 10^5 UFC/ml.

La figura 7D es una distribución angular de dispersión medida para una muestra usual de orina que contenga 10^6 UFC/ml.

20 La figura 8 es un gráfico que compara perfiles de dispersión medidos frente a adaptados calculados para las muestras de orina como se muestran en las Figuras 7A – 7D respectivamente;

La Figura 9 es un gráfico que compara perfiles de dispersión medidos frente a adaptados de una muestra de orina que contiene bacterias, tomada como ejemplo.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCION

25 El sistema de la presente invención permite la detección de bacterias en fluidos acuosos como el agua, soluciones acuosas, geles, emulsiones y/o suspensiones, comida líquida y bebidas, orina, fluidos espinales, líquido amniótico y suero. Para la descripción del sistema divulgado por la invención, hacemos referencia en primer lugar a la Figura 1, que muestra un esquema de un sistema para la detección de bacterias, de acuerdo con la presente invención. El sistema consiste de una unidad óptica (2) en la cual se analizan ópticamente muestras del líquido examinado. Un procesador (4) vinculado a la unidad óptica
30 lleva a cabo medidas y cálculos y activa la unidad óptica (2). Una unidad de interfaz de usuario, no mostrada, vinculada al procesador (4), consiste generalmente de un monitor para presentar los resultados de las medidas e instrucciones al operador y un teclado para introducir datos. Una batería, no mostrada, suministra energía a las unidades óptica y de interfaz del operador y al procesador.

Unidad Óptica

35 La unidad óptica (2) contiene una fuente luminosa (5) que produce un haz de luz. El haz de luz es colimado por un colimador (6). Una lente convergente (7), simple o compuesta, enfoca la luz que procede de una muestra de la muestra del líquido examinado hacia una unidad receptora (8). Una unidad de cubeta instalable (UC) (9) que contiene la muestra de fluido es ubicada entre el colimador (6) y la lente convergente (7). Varias características estructurales alternativas de la UC se describen *infra*. En general,
40 el término cubeta, a partir de aquí, se refiere a un recipiente transparente apto para contener una muestra del líquido y es instalable en la unidad óptica.

Los rayos luminosos (10) representan el haz iluminador emitido por la fuente de luz (5). El haz es colimado por un colimador (6) consistente de una lente simple o compuesta (12) y un diafragma que contiene una abertura (14). Un haz de luz colimada representada por los rayos (16) se propaga a través
45 de una ventana (18) y el líquido en el interior de la cubeta. Un medio de oscurecimiento de la luz (19) impide cualquier luz iluminadora entrar en la unidad receptora (8). La luz dispersada en el líquido se representa por rayos de luz (20) saliendo de la cubeta (9) a través de la zona no oscurecida de la ventana (18A). La luz dispersada es ulteriormente enfocada por medio de lente convergente (7), simple o compuesta, sobre el plano del detector (22) instalado en la unidad receptora (8). La luz dispersada que afecta a la lente (7) se ve limitada de acuerdo con la presente invención por medio de las paredes laterales de la UC (9) y el medio de oscurecimiento de la luz (19) hasta un rango predefinido de ángulos que continúan su dispersión. La unidad receptora (8) contiene un circuito electrónico (24) conectado al detector (22) que proporciona amplificación de señal, muestreo, digitalización, almacenamiento intermedio de datos y temporización. Los datos relacionados con la intensidad medida de la luz recibida por la unidad
50 receptora es transferida ulteriormente al procesador (4) para el post procesamiento descrito *infra*.

Una fuente de luz apropiada para el sistema puede ser cualquiera de las siguientes: incandescente, descarga de gas, chispa y/o lámparas de arco; dispositivos LEDS o láser en estado sólido, o cualquier fuente de láser operativa en el rango que va de lo casi infrarrojo hasta lo ultravioleta suave. Son preferibles las fuentes de luz aptas para la emisión de una energía luminosa que superar los requisitos mínimos especificados por la sensibilidad del sistema. Opcionalmente, se disponen, de forma adyacente a la lente colimadora (7), un filtro excluyente que permite el paso de una banda específica de amplitud de onda y/o un aparato de polarización. El detector de la invención es, generalmente, un detector único monolítico, una serie de detectores y/o una matriz monolítica de detector, operativa en los anchos de onda, banda o bandas de anchos de onda, o intervalo de anchos de onda de la fuente de luz. Son preferibles las series de detectores y/o matrices monolíticas de detector permitiendo la medición de la intensidad de la luz dispersada sobre un plano.

Hacemos referencia a la Figura 2, que muestra esquemáticamente una cubeta de acuerdo con una realización preferente de la presente invención. La cubeta (40) tiene ventanas transparentes (42 y 42A) dispuestas, respectivamente, en los dos lados opuestos de la cubeta. La abertura del diafragma (46) está dispuesta en el interior de la cubeta próxima a la ventana (42). Se dispone un medio de obscurecimiento de la luz (48) en la ventana (42A) coaxialmente con el diafragma (46). El haz de luz colimada es representado por rayos (50). El rayo de luz (52) dispersado a lo largo de su trayectoria después de atravesar la ventana (42), es bloqueado por el diafragma (46).

Nos referimos ahora a la Figura 3, en la que se muestra una unidad óptica esquemática de un sistema de acuerdo con una realización preferida de la presente invención. Un dispositivo de división del haz (60) está dispuesto entre la lente colimadora (62) y la ventana (64) de la cubeta (66). Dos haces colimados son emitidos desde el dispositivo de división de la luz (60). El primer haz se propaga hacia la cubeta (66). El segundo haz, perpendicular al primero, es reflejado por el reflector (72) hasta propagarse en paralelo con el primer haz hacia la cubeta (66A). La luz de cada una de las cubetas (66 y 66A) se enfoca sobre las partes respectivas de la unidad receptora dual (74).

Un sistema para la detección de bacterias en líquidos, también divulgado por la presente invención, emplea dos fuentes de luz tal como dos diodos de láser, obviando el divisor de haz y el reflector descritos *supra*. Opcionalmente, los diodos de láser difieren en sus longitudes de onda. Los medios de obscurecimiento (78) mostrados en la Figura 3 son opcionalmente omitidos en esta realización preferida de la invención, por lo que se promueve el incremento de la sensibilidad de las medidas de fluorescencia.

Unidad de Cubeta

Se hace referencia ahora a las Figuras 4A y 4B que muestran, respectivamente, una visión isométrica y una visión en plano de despiece de una unidad de cubeta (UC) de acuerdo con una realización preferida de la invención correspondiente. La UC (80) consiste de una cubeta única dispuesta en el interior del alojamiento de UC, con una ventana (82) dispuesta a un lado de la UC de cada a la fuente de luz y una ventana paralela (82A) dispuesta en el lado opuesto. Opcionalmente, un medio de filtración (84) con una abertura de entrada (86) está conectado a la abertura de entrada de la UC (88) ubicada en la cubierta de la UC (89). Un filtro de cierre, no mostrado, que expulsa las partículas por encima de un tamaño específico, se ubica en el interior del dispositivo de filtrado (84).

La UC y el cuerpo del dispositivo de filtrado están, generalmente, hechos de materiales, tales como las resinas de plástico, comúnmente usados para la fabricación de botellas o contenedores desechables. Preferentemente, las cubetas están fabricadas de materiales compatibles con los fluidos específicos que se someten a análisis de tal forma que no alteran la constitución de la cubeta o, a la inversa, que la cubeta no provoca cambios en el fluido examinado. Las ventanas están fabricadas, por ejemplo, del plástico generalmente utilizado para la fabricación de lentes ópticas, cristal o cuarzo. La homogeneidad del índice de refracción de la ventana, en particular las variaciones en el índice de refracción dentro de la ventana, no excede de 0.0001. El valor de la raíz cuadrada de la desigualdad de la superficie de la ventana no excede de un nanómetro. Son preferibles las ventanas que tienen una cualidad óptica de sus superficies definida por un número de rasguño/escarbado 40/20 o inferior. Son aceptables, de acuerdo con la invención, por ejemplo ventanas fabricadas de plástico o cristal cuya anchura no exceda de 0.5 milímetros. La homogeneidad óptica del volumen de la ventana y/o la rigidez de su superficie impacta la señal hasta una relación de sonido de una intensidad medida de la luz dispersa y, a su vez, la sensibilidad del sistema.

Se hace referencia ahora a las Figuras 4C – 4D, en las cuales, respectivamente, se muestran dos vistas seccionales de una UC con una configuración de cubeta dual, de acuerdo con otra realización de la presente invención. Tales UCs son especialmente adecuadas para analizar fluidos tales como la orina. Por la utilización de dos procedimientos de pre – procesamiento diferente, aplicados a cada una de las muestras de fluido dentro de cada cubeta, una sirve como muestra de referencia para la otra como se describe ulteriormente *infra*. La UC (90) consiste de un par de cubetas (92 y 92A) adosadas mutuamente a lo largo de sus paredes laterales. La UC (90) tiene una entrada común consistente de una abertura (93)

y un espacio (94) ubicados sobre ambas cubetas para recibir las muestras. Los filtros 95 y 95A, teniendo cada uno opcionalmente un diferente umbral de cierre, están dispuestos en el cierre de cada cubeta. En la Figura 4D se muestra una visión en sección de esta UC tal y como se indica en la Figura 4C. Se dispone un filtro (95) en el cierre (96). Se dispone una abertura en el diafragma (98) cercana a la ventana (97) y que es coaxial con un medio de oscurecimiento de la luz (99) dispuesto en la superficie interior de la ventana opuesta (97A). La cubeta (92A) está guarnecida, de forma similar, con ventanas, un filtro, una abertura en el diafragma y un medio de oscurecimiento de la luz, respectivamente.

El Análisis

En general, el análisis incluye tres etapas principales, tal y como sigue: (i) una etapa de pre – procesamiento; (ii) etapa de medición y (iii) una etapa de post procesamiento.

(i) Pre-procesamiento

La orina, generalmente, contiene micro partículas tales como cristales de sal, macromoléculas biológicas y células, todas las cuales tienen índices de refracción diferentes del índice de refracción del fluido. En consecuencia, tales partículas pueden interferir con la lectura de la dispersión asociada con las bacterias. Otros fluidos biológicos pueden contener una multitud de constitutivos que se interfieren. La fase de pre – procesamiento incluye, básicamente, exclusión simple por tamaño, tal como por el filtrado mecánico. Pueden ser opcionalmente utilizadas la acidificación, alcalización, sedimentación química o por enfriado o cualquier combinación de los mismos, además del filtrado mecánico. Sin embargo, tales tratamientos físicos o químicos adicionales están dirigidos a excluir partículas diferentes a las bacterias y no a inducir la proliferación de bacterias como se describe ulteriormente en el ejemplo 4 *infra*.

Se hace referencia de nuevo a las Figuras 4C. Los filtros 95 y 95A están dispuestos en la entrada de las cubetas 92 y 92A, respectivamente. Su cierre respectivo limita el paso de partículas más pequeñas que las del límite de dicho cierre. Por ejemplo, en el cribado de la orina para detectar la presencia de bacterias cuyo tamaño es de alrededor de 5 micrones, de acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el filtro (95) es tal que sólo partículas más pequeñas que 5 micrones pasan por él, mientras que el filtro 95A transmite partículas de un tamaño no mayor que 1 micrón. Una muestra de orina es presurizada en cubetas (92 y 92A) a través de la abertura (93). La presurización se lleva a cabo por medio de un inyector tal como una jeringa. La orina presurizada pasa del espacio (94) dentro de cada una de las cubetas por su filtro correspondiente. Como resultado, una cubeta (92) contiene la orina y las bacterias a un nivel de concentración de aproximadamente el nivel original de concentración bacteriana. Por otro lado, la otra cubeta (92A), debido a su filtro de tamaño de cierre más bajo, apenas contiene bacterias sino que, principalmente, contiene otras partículas en dispersión tales como cristales que están igualmente presentes en la otra cubeta.

Opcionalmente, se introducen reagentes para su interacción potencial con el líquido examinado, bien antes de su distribución en la UC o bien ya en la UC. Tales reagentes consisten de reactivos químicos o bioquímicos que, potencialmente, llevan a cabo reacciones químicas o bioquímicas o bien con las bacterias o bien con otros constitutivos del fluido. Sin embargo, tales reagentes e interacciones sólo aportan la disminución de los efectos de oscurecimiento de las partículas diferentes de las bacterias y no incluyen ningún componente alimenticio y/o tampoco incluyen procesos de incubación que, normalmente, inducen la proliferación de bacterias. Tales actividades que, normalmente, llevan a la proliferación de bacterias están excluidas de acuerdo con la presente invención y, de aquí en adelante, se designan como “incubación”. Los productos de tales reacciones son de unas características ópticas específicas que permiten la diferenciación entre bacterias y partículas de otro tipo. Alternativamente, tales reagentes son aptos para interactuar química o bioquímicamente con otras partículas tales como los componentes biológicos y las células orgánicas con objeto de promover su agregación y/o sedimentación.

(i) Mediciones

Subsiguientemente, la UC que contiene el fluido analizado es instalada en el interior de la unidad óptica. Generalmente, las mediciones se inician por el encendido tanto de la fuente de luz como de la unidad receptora. Entonces, las intensidades de la luz son medidas en diferentes puntos a lo largo del plano detector. Son aceptables diversos procedimientos de medición que se corresponden con diferentes técnicas de post procesamiento. Por ejemplo, una densidad angular de energía de la luz dispersada por las partículas contenidas en el fluido se mide o bien de forma independiente o bien como en función de las longitudes de onda y/o los ángulos de polarización del haz luminoso. Los perfiles de dispersión de muestras de fluidos con y sin bacterias difieren sustancialmente en aspectos angulares específicos. Tales diferencias son incrementadas cuando las longitudes de onda de la luz que ilumina están muy próximas dentro del intervalo casi infrarrojo. De forma similar, la diferente polarización resulta en diferentes modelos de dispersión tal como se induce por las bacterias.

(ii) Post procesamiento

La dispersión se define por el azimut y por valores de elevación angular. La función de distribución de la dispersión medida es, básicamente, un trazado de un mapa tri – dimensional en el que la intensidad de la luz que afecta a un plano del detector, es representada por el nivel de señal de los píxeles correspondientes. Un perfil de dispersión se obtiene, bien por selección de un azimut específico, o por cálculo del término medio de las funciones de distribución angular medida sobre un intervalo específico de ángulos de azimut.

En general, una etapa de post procesamiento se basa en una comparación entre una escala de calibración y los valores medidos y/o valores derivados de las mediciones. Hay diversas técnicas de post procesamiento diferentes que proporcionan una escala de calibración de acuerdo con la presente invención. Se describe a partir de aquí, y a título de ejemplo, una técnica de post procesamiento que realiza la presente invención. Esta técnica es aplicable con medidas de dispersado que son independientes de la longitud de onda y de la polarización de la luz que ilumina. El perfil de intensidad angular de una primera muestra de orina filtrada con un filtro de textura basta y de la que, por tanto, se sospecha que contiene bacterias, se compara con el perfil de una segunda muestra de la misma orina filtrada con un filtro de textura delicada. El segundo perfil medido es calibrado o normalizado tal como por medio de ajuste de curvas, al nivel de de un perfil de intensidad angular pre – almacenado de una muestra de orina libre de bacterias. Entonces, el perfil de la primera muestra, actualmente medido, es normalizado por el uso del mismo factor de normalización. El primer perfil normalizado se compara a una serie de perfiles de dispersión pre – almacenados de orina que contienen bacterias específicas a concentraciones bacterianas específicas. La orina se define como infectada con bacterias cuando las diferencias entre el perfil medido de la muestra se ajusta a una tendencia pre – almacenada de diferencias que, generalmente, existen entre perfiles que se corresponden con orina infectada y no infectada. El nivel de contaminación se deriva de la toma de la concentración bacteriana específica del perfil pre – almacenado que mejor se ajusta con el perfil medido en cuanto a ajuste de curvas.

Un conjunto de perfiles de dispersión de referencia para la detección de bacterias en un fluido tal como la orina, de acuerdo con una realización preferente de la presente invención, se prepara según se describe a continuación. Se reúne una multiplicidad de muestras de orina libres de gérmenes. Cada una de estas muestras es ulteriormente dividida en unas pocas sub – muestras diferenciadas que son ampliadas con bacterias específicas, cada una a una concentración específica. La distribución angular de dispersión se mide y es registrada para cada muestra de orina. Las funciones de la distribución angular registrada son, ulteriormente, agrupadas de acuerdo con el nivel de contaminación bacteriana. Un conjunto de referencia de distribución de dispersión angular normalizada se forma por la realización de un cálculo de valor medio de conjunto en correspondencia con cada nivel de concentración bacteriana calibrada. Los perfiles de dispersión calibrados se derivan de estas funciones de distribución de dispersión angular normalizada tal como se describe *supra*. Los niveles de concentración bacteriana se miden en unidades de formación de colonias (UFC) por milímetro (UFC/ml). Una bacteria única es aludida, a partir de aquí, como una UFC.

La detección de bacterias de acuerdo con una realización de la presente invención se lleva a cabo por ajuste de una combinación lineal de un perfil de dispersión calibrado de orina enriquecida con bacterias y un perfil de dispersión calibrado no infectado con el perfil de dispersión medido. Una combinación lineal de perfiles de dispersión calibrados se da por la ecuación:

$$S^c_i(x) = A_i S^f(x) + B_i S^b_i(x), \text{ donde}$$

X es el ángulo de dispersión;

$S^c_i(x)$ es el resultado número “i” de la combinación lineal como una función de x;

$S^f(x)$ es el perfil de dispersión calibrado no afectado como una función de x;

$S^b_i(x)$ es el perfil de dispersión calibrado número “i” del conjunto de perfiles de dispersión calibrados infectados con las bacterias o una mezcla específica de bacterias como una función de x, el índice i indica una concentración bacteriana específica;

A_i y B_i son parámetros, cuyos valores están determinados por el ajuste de curvas de la combinación lineal al perfil medido. El ajuste de curvas se lleva a cabo por la minimización de la suma de diferencias cuadradas entre el perfil medido y la combinación lineal de perfiles número “i” de cada valor por x, por la variación de los valores de los parámetros A_i y B_i . La combinación lineal número “j” se elige de aquellas en las que se consigue el mejor ajuste. El nivel de infección bacteriana derivada para esta muestra es el mismo del perfil de dispersión calibrado número “j”.

El procedimiento de las mediciones y las técnicas de post procesamiento son ulteriormente descritos en los ejemplos *Infra*.

Ejemplo 1

5 Fue realizado un análisis simulado de una distribución de dispersión angular: fue fabricado un modelo sintético de orina en el que fueron incluidas unas esferas de 2-4 micrones de diámetro con la misma constante dieléctrica que la de las bacterias. Las partículas de sal están representadas por esferas con un radio más pequeño de un micrón y una constante dieléctrica adaptada. Los cálculos se basan en la teoría de dispersión de Mie [H. C. van de Hulst, "*Light scattering by small particles*", John Wiley & Sons Publishing, Nueva York, 1957]. Se hace referencia ahora a la Figura 5 que muestra una estructura de la función de distribución de dispersión angular de suspensiones de las dos clases de partículas descritas *supra*. Una de las curvas (101) representa la intensidad de la luz dispersada por la suspensión de las partículas que representan bacterias. La otra curva (102) se corresponde con la intensidad de la luz dispersada por la pequeña partícula que representa a las partículas de sal cristalina en la orina. Se muestra la intensidad en una escala logarítmica y es representada en coordenadas polares frente al ángulo de dispersión. Se ha demostrado que la partículas más grandes se dispersan mayoritariamente en pequeños ángulos de dispersión, mientras que la dispersión de las partículas más pequeñas tiene una distribución angular considerablemente más amplia, que es de una intensidad ligeramente variante en ángulos de dispersión dentro de un considerable intervalo angular centrado en 0°.

Ejemplo 2

20 Las mediciones descritas *infra* fueron llevadas a cabo mediante la utilización de un sistema en el cual la fuente de luz es un diodo láser de una longitud de onda específica e intensidad y una UC que tiene una sola cubeta. Fue preparado un modelo elaborado de orina que contiene bacterias y una geometría a escala del sistema descrito en la Figura 1 al cual se hace de nuevo referencia fue utilizada del modo siguiente:

- 25 1) Las dimensiones de las bacterias están definidas en la literatura
- 2) Las bacterias son dispersadas al azar en el volumen iluminado de la muestra de fluido
- 3) La fuente de luz del modelo es un diodo láser que tiene las mismas características que la fuente de luz del sistema utilizado, de hecho, en las mediciones
- 30 4) Las intensidades angulares de la luz dispersada para cada bacteria individual fueron calculadas usando el modelo de dispersión Mie mencionado *supra*.
- 5) Son trazados ópticamente rayos de luz dispersados usando un modelo de la unidad óptica utilizada, de hecho, para las mediciones.
- 6) La densidad de poder del haz disperso se calcula en el plano del detector.

35 Se hace referencia a la Figura 6A que muestra estructuras de intensidades de luz dispersa frente a ángulos de dispersión de dos muestras de orina. La curva (110) representa la transmisión sintética de la cubeta, considerando el reflector de luz. Una de las curvas (114) representa el perfil de dispersión medido de una muestra tipo de orina infectada con *E. coli* a una concentración bacteriana de 10^4 UFC/ml. La otra curva (116) representa el perfil simulado de la misma muestra de orina de la cual su intensidad total se normaliza adaptándola a la del perfil medido.

40 Se hace referencia a la Figura 6B en la que se muestra una correspondiente comparación entre distribuciones angulares medidas y simuladas de intensidad de dispersión utilizando orina complementada con bacterias. Las medidas fueron efectuadas utilizando la misma unidad óptica y UCs de configuración de cubeta única como se describió en el ejemplo 1 *supra*. Las intensidades de dispersión simulados fueron calculadas para bacterias estadísticamente distribuidas entre un intervalo de 0 – 1.5 micrones conformándose a los datos medidos. Las curvas (118 y 119) representan, respectivamente, intensidades de señal simuladas y medidas, como una función del ángulo de dispersión utilizando muestras de orina con bacterias. Las curvas (120 y 121) muestran, respectivamente, los perfiles de dispersión estimulada y medida de las muestras de orina sin bacterias.

Ejemplo 3

50 Las mediciones de dispersión de luz fueron llevadas a cabo mediante la utilización de la misma unidad óptica y UCs como se describió en el ejemplo 2 *supra* y varias muestras de orina enriquecidas con bacterias a diferentes niveles de concentración bacteriana. Los niveles de concentración bacteriana fueron calibrados de forma independiente media la utilización de la incubación como en el estado de la técnica. Se hace ahora referencia a las Figuras 7A – 7D en las cuales se muestran funciones de distribución de dispersión angular típica de orina infectada a niveles de concentración bacteriana de 10^3 , 10^4 , 10^5 , y 10^6 UFC/ml, respectivamente. Los perfiles de dispersión se derivaron de estas funciones de

distribución típicas por prorratio sobre la mayoría del intervalo de acimut. En la Figura 8, se muestra un gráfico que compara los perfiles de dispersión correspondientes a las funciones medidas de distribución angular de las Figuras 7A-7D. Las estructuras (123, 124, 125 y 126) representan estos perfiles de distribución de orina infectada a los mismos niveles de concentración bacteriana de las Figuras 7A – 7D, respectivamente.

Una muestra típica de orina de la que se sabía que estaba contaminada con *e-coli* fue analizada para detectar presencia de bacterias mediante la utilización del mismo dispositivo de medición óptica y UCs de configuración de cubeta única como se describió *supra*. El perfil de dispersión fue medido y se llevó a cabo la detección de bacterias de acuerdo con la realización preferente de la presente invención como se describió *supra*. Se hace referencia ahora a la Figura 9, en la que se muestran los dos perfiles correspondientes a un conjunto de perfiles calibrados y los perfiles de distribución ajustada y medida de esta muestra de orina. Una de las curvas (130) representa el perfil de dispersión calibrado de orina no infectada. Otra curva (132) representa uno de los perfiles de dispersión calibrados de orina infectada (limpiada de cualquier partícula de sal) en un nivel específico de concentración bacteriana. Otra curva (134) representa el perfil de dispersión ajustado al ejemplo examinado. La restante curva (136) representa el perfil de dispersión medido de esta muestra bajo análisis. Se demuestra un considerable alto nivel de correspondencia sobre un intervalo significativo de ángulos de dispersión. El ángulo detectado de concentración bacteriana en esta muestra examinada se desvió del nivel de referencia en un pequeño porcentaje.

Ejemplo 3

Se describe aquí un experimento llevado a cabo para la estimación de la sensibilidad y especificidad del método de la invención. Un total de 364 muestras de orina, cada una de ellas recibida de un paciente diferente en un procedimiento clínico, fueron examinadas para detectar la presencia de bacterias. Un grupo de 158 muestras fueron almacenadas de forma hermética a temperatura ambiente durante un tiempo que no excedió de 6 horas desde el momento de su recepción antes de ser analizados de acuerdo con el método de la invención. Un segundo grupo de 206 muestras de orina fueron herméticamente almacenadas a una temperatura inferior a 5° C durante un tiempo que no excedió de 12 horas desde el momento de su recepción. Las muestras del primer grupo serán denominadas, en adelante, como muestras frescas y las muestras del segundo grupo serán denominadas como muestras refrigeradas. La detección de bacterias fue llevada a cabo por el ajuste de una combinación lineal de un perfil de dispersión calibrado de orina enriquecida con bacterias y un perfil de dispersión calibrado no infectado al perfil de dispersión medido de cada muestra de ambos grupos. Los resultados de los análisis son resumidos en la tabla a.

Tabla a. Detección de bacterias en orina de acuerdo con el método de la presente invención

	Refrigerada	Fresca
Despejada (libre de bacterias)	95	138
Contaminada con bacterias	111	20
Total	206	158

Los resultados recibidos fueron comparados a los resultados de los análisis llevados a cabo por la incubación de las muestras de orina. La tabla 2 resume los resultados del experimento para ambos grupos.

Tabla b. Sensibilidad y especificidad de los resultados mostrados en la tabla a

	Refrigerada	Fresca
Especificidad	83 %	90 %
Sensibilidad	80 %	82 %

La sensibilidad y especificidad son definidos por las siguientes expresiones,

$$\text{Sensibilidad} = \text{VP} * 100 / (\text{VP} + \text{FN}),$$

$$\text{Especificidad} = \text{VN} * 100 / (\text{VN} + \text{FP}),$$

Donde VP, FP, VN y FN significan verdadero positivo, falso positivo, verdadero negativo y falso negativo, respectivamente. La sensibilidad y especificidad de la detección en las muestras refrigeradas es algo inferior que los mismos valores recibidos para las muestras frescas. Sin embargo, los valores de especificidad son significativamente más altos que la sensibilidad recibida para ambos grupos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de bacterias en un fluido que comprende las etapas:
 - (i) Filtrado de una muestra de dicho fluido por medio de un primer filtro con lo que se excluyen las partículas mayores que dichas bacterias;
 - (ii) Iluminación de dicha muestra de fluido usando un haz de luz colimada.
 - 5 (iii) Medición de la intensidad de luz dispersada por dicha muestra de fluido al menos en un punto, y
 - (iv) Comparación de dicha luz dispersada con una escala de calibración.
2. Un método como el de la reivindicación 1, comprendiendo además:
 - 10 (i) Filtrado de una segunda muestra de dicho fluido por medio de un segundo filtro con lo que se excluyen las partículas mayores de un límite predefinido más pequeño que el de dichas bacterias;
 - (ii) Iluminación de dicha segunda muestra de fluido usando un haz de luz colimada.
 - (iii) Medición de la intensidad de luz dispersada por dicha segunda muestra de fluido al menos en un punto, y
 - 15 (iv) Comparación de dicha luz dispersada con una escala de calibración.
3. Un método como el de la reivindicación 1, comprendiendo además la asociación de un perfil de dispersión con dicha intensidad medida, en el que dicha medición se llevó a cabo al menos en dos puntos diferentes.
4. Un método como el de la reivindicación 1, comprendiendo además el emparejamiento a dicho perfil de dispersión asociado de cualquier artículo seleccionado de una lista de artículos consistentes de perfiles de dispersión calibrados pre – almacenados y combinaciones lineales de perfiles de dispersión calibrados pre – almacenados.
5. Un método como el de la reivindicación 1, comprendiendo además la polarización de dicho haz de luz colimada.
- 25 6. Un método como el de la reivindicación 1, en el que dicha medición es llevada a cabo en relación, al menos, con una longitud de onda específica.
7. Un método como el de la reivindicación 1, en el que dicha iluminación se lleva a cabo por al menos un diodo láser.

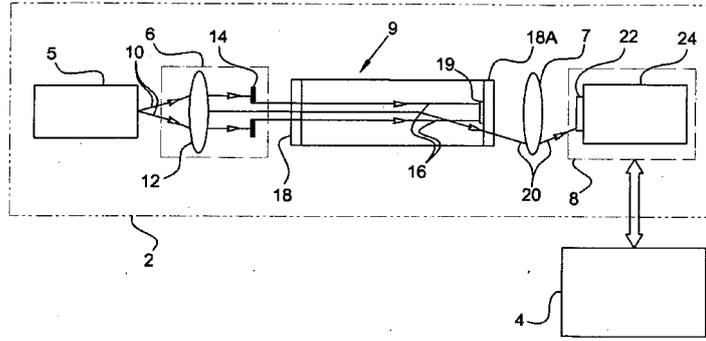


Fig. 1

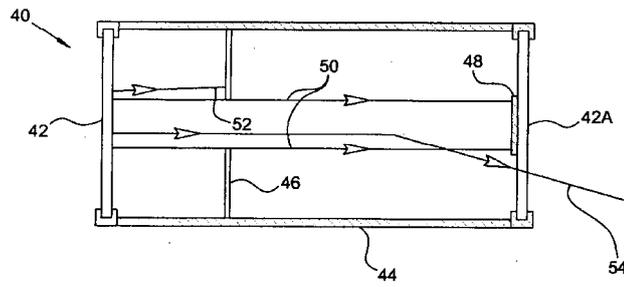


Fig. 2

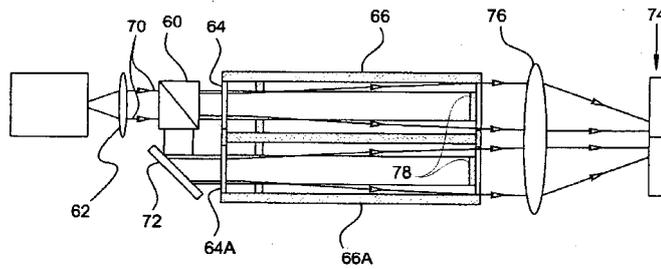


Fig. 3

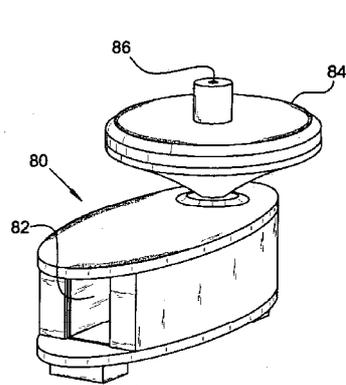


Fig. 4A

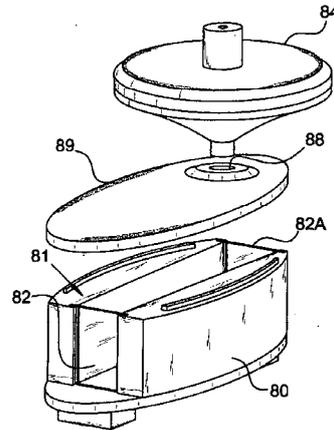


Fig. 4B

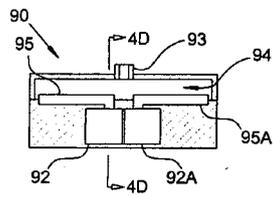


Fig. 4C

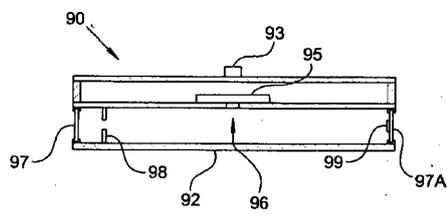


Fig. 4D

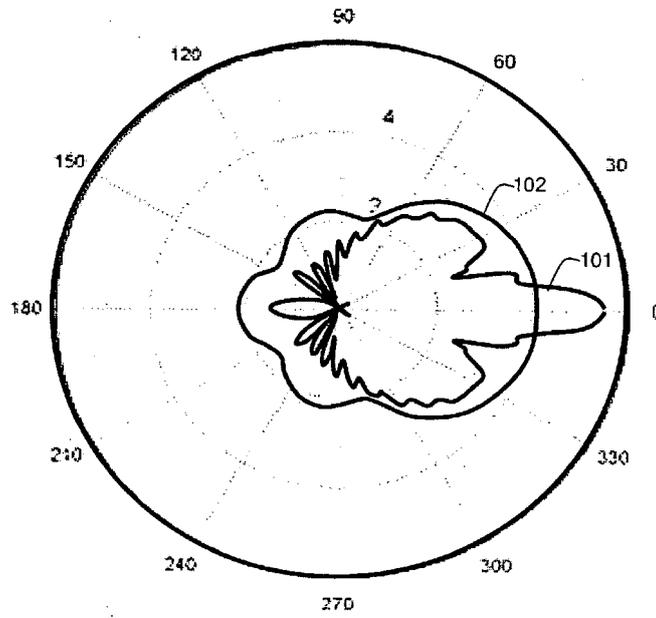
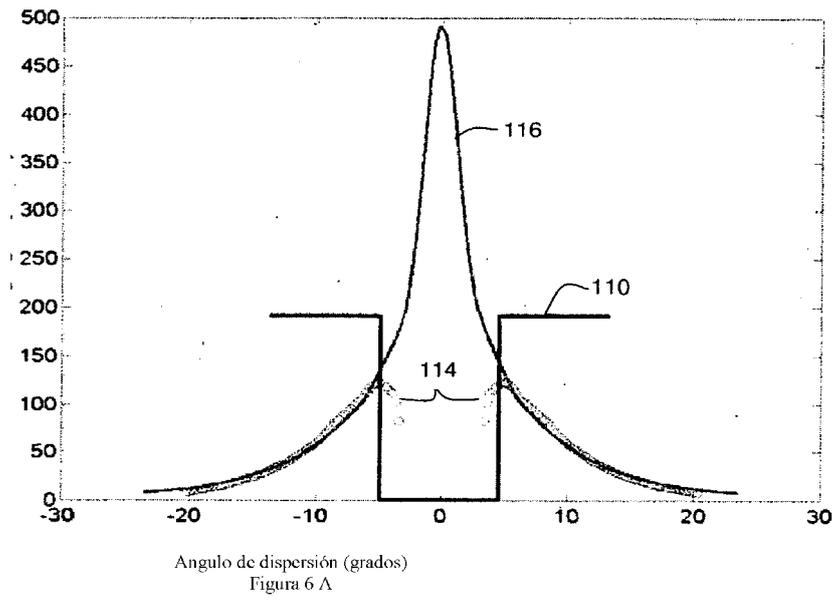
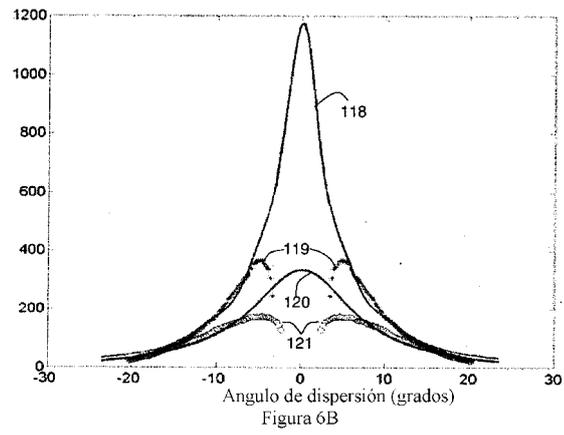


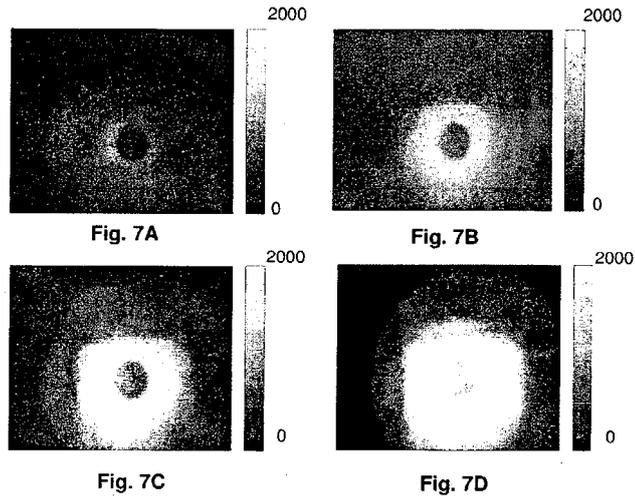
Fig. 5

Señal de dispersión (cálculos)

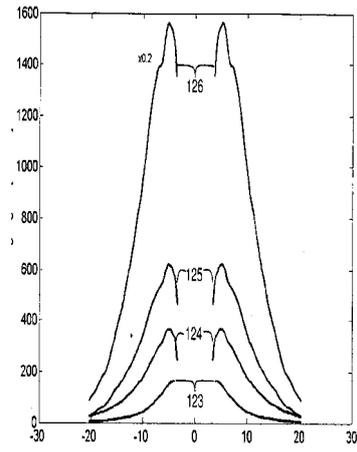


Señal de dispersión (cálculos)





Señal de dispersión (cuentas)



Ángulo de dispersión (grados)
Figura 8

Señal de dispersión (cuentas)

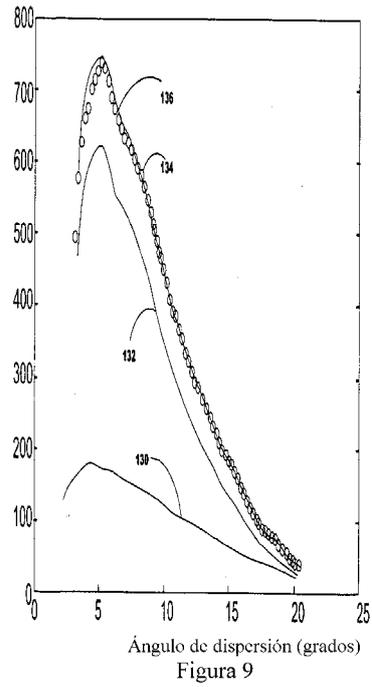


Figura 9