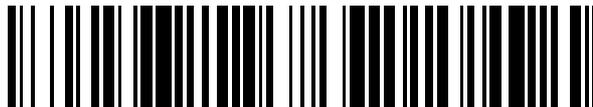


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 659**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06821599 .5**
96 Fecha de presentación: **29.11.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1960532**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.08.2008**

54 Título: **SISTEMA PARA RECUENTO DE BACTERIAS Y DETERMINACIÓN DE SU SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS.**

30 Prioridad:
29.11.2005 US 597395 P
08.08.2006 GB 0615692

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.12.2011

73 Titular/es:
BACTERIOSCAN LTD.
SOUTH INDUSTRIAL ZONE
23100 MIGDAL HA'EMREK, IL

72 Inventor/es:
WEICHSELBAUM, Amnon y
DE LA ZERDA, Jaime

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 370 659 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

Sistema para recuento de bacterias y determinación de su susceptibilidad a los antibióticos

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere en general a ensayar fluidos biológicos. En particular, la presente invención se refiere a ensayar ópticamente la orina para detectar bacterias y determinar su susceptibilidad a los antibióticos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Fluidos biológicos tales como la orina, fluidos amnióticos, pleurales, peritoneales y cefalorraquídeos se someten a veces a ensayo por la presencia de bacterias. Como etapa complementaria, se puede requerir determinar la susceptibilidad de tales bacterias infecciosas a los antibióticos para idear un plan de tratamiento si se detecta una infección. Métodos analíticos comunes implican cultivo y o microscopía, requieren expertos y llevan tiempo y recursos. Normalmente, médicos y veterinarios tienen que esperar días para recibir resultados del laboratorio que determinen si un ser humano o un individuo animal está infectado con bacterias y recomiende el antibiótico como lo más apropiado para el tratamiento requerido.

15 Un método para determinar la susceptibilidad bacteriana a agentes antibióticos que requiera menos tiempo se explica en "Light scattering methods for antibiotic sensitivity tests", por J. Murray, P. Evans y D. W. L. Hukins, en J. Clin Pathol, (1.980) 33, 995-1.001. Este método se basa en la observación de que el ángulo de luz dispersada de una muestra de fluido que contiene bacterias cambia después de que se añade un agente antibiótico adecuado al fluido examinado. Se cultivan simultáneamente dos muestras del mismo fluido, una de las cuales es un agente antibiótico. El tiempo de cultivo como se describe es significativamente mayor que la vida media de la proliferación bacteriana y es preferiblemente aproximadamente 90 minutos. Se realizan mediciones de dispersión de la luz por un intervalo angular amplio (incluyendo dispersión posterior) para ambas muestras mediante un fotómetro de dispersión de la luz diferencial. Se calculan parámetros representativos, tal como un parámetro de desplazamiento que es proporcional al área de separación entre las representaciones gráficas de perfiles de dispersión angular de las dos muestras dividido por el intervalo angular. Los valores de tales parámetros se equiparan con una escala de calibración para determinar la susceptibilidad de las bacterias a un agente antibiótico específico. Sin embargo los resultados de implantar este método no son satisfactorios ya que se indica que se obtuvo al menos 20% de discrepancia entre ensayos usando el método descrito comparado con un método común de incubación y microscopía.

30 Además de los métodos de cultivo comunes, se ha desarrollado una serie de técnicas adicionales para la determinación de la presencia de bacterias en fluidos, incluyendo, por ejemplo, tiras de ensayo para investigación de infección del tracto urinario (UTI, por sus siglas en inglés), basadas en el ensayo de la presencia de productos en la muestra creada por infección bacteriana tal como nitrito. Sin embargo, el método mencionado falla a la hora de detectar bacterias que no generan productos específicos. El método requiere alta concentración bacteriana en la muestra examinada y por lo tanto tal procedimiento de investigación tiende a una sensibilidad insuficiente y una especificidad relativamente baja.

40 La solicitud de patente internacional WO 06018839 A2 describe un sistema y un método para detectar y contar bacterias en tales fluidos biológicos. El método descrito incluye las etapas de: (1) retirar partículas más grandes en tamaño que las bacterias por filtración de una muestra del fluido; (2) medir la intensidad de la luz dispersada del fluido filtrado en uno o más puntos desplazados del eje del rayo de luz iluminador; (3) asociar un perfil de dispersión con las medidas de dispersión; (4) comparar el perfil de dispersión asociado con perfiles de dispersión de referencia almacenados; (5) la concentración bacteriana se determina por el recuento respectivo relacionado con el perfil de dispersión de referencia que mejor se adapte al perfil de dispersión asociado. Los perfiles básicos almacenados según el método descrito consisten en perfiles de dispersión medida y o calculada promediada de manera estadística relacionados con muestras calibradas de fluidos filtrados y o combinaciones lineales de tales perfiles. También se describe una cubeta especialmente apta para tal medición de dispersión de la luz. Obviamente tal método puede reducir significativamente el tiempo y laboratorio asociado con la detección de infección bacteriana, sin embargo la susceptibilidad de las bacterias detectadas a los antibióticos queda sin resolver.

50 En la patente de EE.UU. 6.861.230 se describe un método para ensayar el crecimiento característico de las bacterias incluyendo ensayar la susceptibilidad bacteriana a un agente antibiótico. Este método combina cultivar una muestra de fluido y mediciones de luminiscencia de la muestra cultivada. En una fase de preparación se cultiva una muestra del fluido que contiene el agente antibiótico durante un rato para generar un nivel de referencia de adenilato cinasa libre. Se determina la susceptibilidad bacteriana comparando los niveles de adenilato cinasa libre medidos repetidamente de manera que: se realiza una primera medición; después se añade el agente antibiótico a la muestra

examinada, que después de una demora de preferiblemente quince minutos se hace una segunda medición. El nivel de adenilato cinasa aumenta en casos en que las bacterias son susceptibles al agente antibiótico. El método descrito se indica que es sensible incluso en casos en que la concentración bacteriana en el fluido examinado es considerablemente bajo y o la segunda medición del nivel de adenilato cinasa se retrasa por un intervalo de tiempo que es más corto que el intervalo de tiempo preferido. Sin embargo su implantación requiere química húmeda, cultivo y el uso de equipo relativamente sofisticado.

- 5
- Por lo tanto, es beneficioso un método de investigación rápido y que ahorre laboratorio que pueda obviar una cantidad significativa de trabajo costoso y que exija tiempo en la realización de los ensayos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 10 La Fig. 1 es una presentación esquemática de una medición de dispersión de la luz según la presente invención;
- La Fig. 2 es un diagrama de bloques que describe un sistema para detectar y contar bacterias y determinar su susceptibilidad a los antibióticos según el método de la presente invención;
- La Fig. 3A es una vista en sección longitudinal de una cubeta para detectar bacterias según una realización preferida del método de la presente invención;
- 15 La Fig. 3B es una vista en sección longitudinal de una cubeta para detectar bacterias según otra realización preferida del método de la presente invención;
- La Fig. 4 es un diagrama de flujo que describe un procedimiento para detectar y contar bacterias y determinar su susceptibilidad a los antibióticos según una realización preferida de la presente invención;
- La Fig. 5 es una imagen de puntos simulada de una muestra de orina sintética que contiene bacterias;
- 20 La Fig. 6 muestra perfiles de intensidad-tiempo ejemplares calculados para bacterias en un movimiento;
- La Fig. 7 es un gráfico que presenta distribuciones de frecuencia ejemplares de la intensidad dependiente del tiempo de luz dispersada calculada para un píxel de una imagen de puntos;
- Las Figs 8A y 8B muestran respectivamente un perfil de intensidad – ángulo de dispersión – tiempo de una muestra de orina que contiene E-coli y una muestra de orina que contiene partículas de PMMA;
- 25 La Fig. 8C muestra perfiles de intensidad – tiempo medidos a uno de los píxeles mostrados en las Figs 8A;
- La Fig. 9A muestra gráficos ejemplares de perfiles de dispersión estándar, un perfil de dispersión asociado a intensidades medidas de luz dispersada por una muestra de orina y un perfil de dispersión adaptado, como una función del ángulo de dispersión;
- 30 Las Figs 9B y 9C muestran respectivamente representaciones gráficas diferentes calculadas en dos puntos diferentes en el tiempo empleando medidas de luz dispersada de una muestra ejemplar que contiene E-coli;
- La Fig. 9D muestra un perfil de tiempo de un derivado promedio ejemplar de la concentración de dispersores en el tiempo, calculado para una muestra ejemplar que contiene E-coli;
- Las Figs 10A y 10B muestran respectivamente perfiles de intensidad con velocidad unidireccional constante y por partículas con la misma velocidad unidireccional que se mueven simultáneamente en un movimiento Browniano.

35 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCION

- De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para detectar y contar bacterias suspendidas en un fluido. El procedimiento según la invención emplea primero filtrado mecánico de una muestra de un fluido examinado seguido por medición de intensidades de luz dispersada por la muestra filtrada previamente a y después de una introducción de un agente antibiótico. La filtración proporciona exclusión de partículas cuyos tamaños exceden del tamaño de las bacterias para evitar problemas de distribución potencial de la luz. Las muestras de fluido se toman de individuos normalmente recibidas en un laboratorio para investigar las bacterias, tal como asociado a
- 40

hospitales y o estudios clínicos. Los fluidos examinados según la invención incluyen pero no se limitan a fluidos biológicos, tales como orina, fluidos amniótico, pleural, peritoneal y cefalorraquídeo. La muestra recibida o la muestra de fluido, no requiere ser cultivada o tratada de manera química previamente al ensayo según el método de la invención.

5 Se hace referencia primero a la **Fig. 1**, que muestra esquemáticamente un montaje para medición de dispersión de la luz según la invención. Un rayo de luz coherente, colimado en un volumen de haces confinado por **10** de luz, ilumina las partículas **12** suspendidas en un fluido contenido en la cubeta **14**. El punto **16** situado en una cara del detector **18** de luz está separado aparte del eje **20** óptico por una distancia indicada por la doble disposición **22**. La luz dispersada por partículas en un volumen por el que se propaga la luz iluminadora se acumula coherentemente para proporcionar la intensidad de luz medida en el punto **16**. Tales partículas son partículas **12**, u otras partículas suspendidas de manera similar en el fluido. Otras posibles dispersiones son discontinuidades internas presentes en, o partículas situadas en, ventanas **26** y o las paredes de la cubeta **14**. Los medios **28** para ocultar la luz evitan que cualquier luz de iluminación directa alcance el detector **18** de luz, referido de ahora en adelante por imágenes de puntos.

15 **Dinámica de una imagen de puntos**

Las imágenes de puntos varían en el tiempo debido a movimiento Browniano y o motilidad bacteriana. El valor medio de la magnitud de una velocidad de las bacterias que se mueven en un movimiento Browniano está típicamente en el intervalo de unas decenas de micrómetros por segundo ($\mu\text{m/s}$) próximo a $1 \mu\text{m/s}$. Una longitud típica de un intervalo de tiempo en que tales bacterias "olvidan" su dirección es aproximadamente 10 segundos. Las bacterias móviles pueden nadar sustancialmente linealmente a una velocidad que es significativamente mayor y está más allá del intervalo de movimiento Browniano. El movimiento de las bacterias móviles se interrumpe de manera característica por periodos de reposo en que las bacterias se dan la vuelta y cambian aleatoriamente su dirección de movimiento. Además, las bacterias quimiotácticas móviles pueden moverse hacia concentraciones mayores de atrectores y evitar concentraciones mayores de repelentes por sensibilidad a cambios temporales en concentraciones quimio-efectoras. (Una explicación ejemplar de motilidad de las bacterias y quimiotaxis se proporciona en: "Motile behavior of bacteria", H. C. Berg, Phys. Today, (enero de 2.000), <http://www.aip.org.pt/jan00/berg.html>.) Las bacterias móviles también se pueden mover a lo largo de un gradiente de temperaturas en lo que se conoce como termotaxis.

Características del sistema

30 Ahora se hace referencia a la **Fig. 2** que muestra esquemáticamente el sistema **40**. La luz emitida de una fuente **42** de luz coherente, tal como una fuente de luz, pasa por un colimador **44** y el rayo colimado entra en la cubeta **46**. La luz dispersada por partículas en una cubeta **46** se enfoca mediante lentes **48** simples o compuestas convergentes para formar imágenes por la cara de la disposición **50** del detector de luz. Los medios **52** para ocultar la luz bloquean el rayo de iluminación. La unidad **54** receptora controla el detector **50**, recibe, acondiciona y digitaliza señales inducidas por la luz dispersada y las almacena temporalmente. El procesamiento y la unidad **56** de control proporciona el control del procedimiento de ensayo, recibiendo datos y comandos del operario, encendiendo la fuente **42** de luz y la unidad **54** receptora, leyendo las señales almacenadas temporalmente en una **54** receptora y llevando a cabo tratamiento de señales y datos. Los resultados de los ensayos y los mensajes a un operario se muestran en una pantalla del operario, no mostrada. Las claves de entrada dedicadas unidas a procesamiento y la unidad **56** de control, no mostrado, proporcionan datos de entrada y o comandos al sistema. El procesamiento opcional y la unidad **56** de control transmite datos y resultados de ensayo y recibe datos y comandos de un ordenador remoto. El colimador **44** consta de una lente **58** simple o compuesta y uno o más diagramas **60** que contienen una abertura.

45 Se hace referencia a las **Figs 3A y 3B** que muestran vistas de secciones longitudinales de una cubeta para determinar la susceptibilidad de las bacterias a agentes antibióticos según dos realizaciones del método de la presente invención, respectivamente. Se disponen medios **70** para ocultar la luz en la superficie interna de la ventana **72** de la cubeta **74**. El diafragma **76** cuya abertura es coaxial con medios **70** de oscurecimiento se dispone internamente adyacente a la ventana **78**. La cubeta **90** es especialmente adecuada para ensayos de investigación en que se presenta quimiotaxis. Un medio de oscurecimiento y un diafragma con una abertura se disponen internamente dentro de la cubeta **90** como se describió anteriormente. El compartimento **92** para contener un quimio-efector adecuado que sea un atractor o un agente repelente conocido está confinado entre el divisor **94** y la pared lateral **96** de la cubeta **90**. El divisor **94** tiene una pared lateral **96** enfrentada a la pared porosa y una cubierta móvil enfrentándose a una unidad **98** de flujo luminoso, no mostradas ninguna de las dos. La cubierta móvil cuando se pone evita cualquier transferencia de material contenido en el compartimento **92** en la unidad de flujo luminoso **98**. la pared porosa está firmemente unida a la cubeta **90**, proporcionando transferencia del reactivo químico contenido en el compartimento **92** y disolviéndose en, o mezclándose con, el fluido contenido en la unidad de flujo luminoso **98**. Regular la temperatura de una o más paredes laterales opuestas de la cubeta **74** se efectúa induciendo un gradiente de temperaturas por la muestra de fluidos proporcionando un movimiento termotáctico.

Las cubetas tales como la cubeta **74** o **90** están montadas típicamente junto con un alojamiento externo que incluye medios de alineación que proporcionan alineación a la cubeta con el eje óptico del sistema. Tal alojamiento tiene una entrada para el compartimento **92** de carga con un reactivo químico adecuado y otra unidad de flujo luminoso **96** de carga o la unidad de flujo luminoso de la cubeta **74** con un fluido filtrado y o un agente antibiótico. Opcionalmente, se proporciona un alojamiento de la cubeta con un filtro que tiene poros que no son más pequeños que los tamaños de las bacterias.

Los componentes de una cubeta se hacen de materiales tales como resinas de plástico utilizadas típicamente para fabricar envases desechables para líquidos. Tales materiales que son insolubles en los fluidos examinados y son pasivos desde el punto de vista químico a los reactivos químicos y o el agente antibiótico utilizado durante el ensayo. Las ventanas son transparentes en un intervalo de longitudes de onda que contienen la longitud de onda o longitudes de onda de la fuente de luz. Las ventanas están hechas, por ejemplo, de plástico usado típicamente para fabricar lentes ópticas, vidrio o cuarzo. La homogeneidad de índices de refracción de la ventana, es decir las variaciones en el índice de refracción dentro de la ventana, no excede de 0,0001. El valor de la raíz cuadrada media de la rugosidad superficial de las ventanas no excede de 1 manómetro. Son preferibles ventanas con una cualidad óptica de sus superficies definidas por un número de raya/marca de 40/20 o menor. Según la invención, las ventanas hechas de plástico o vidrio cuya anchura no excede de 0,5 milímetros es un ejemplo viable. La homogeneidad óptica del volumen de la ventana y o su rugosidad superficial hace impacto en la relación señal a ruido de una intensidad medida de la luz dispersada y a su vez la sensibilidad del sistema.

Cubetas tales como la cubeta **74** se emplean típicamente para investigar bacterias que no son móviles y se refieren de ahora en adelante como cubetas del primer tipo. Las cubetas con un compartimento para contener repelentes o atrayentes tales como la cubeta **90** se refieren de ahora en adelante como cubetas del segundo tipo. Se describen más características de las cubetas en el número de publicación de la solicitud internacional de las cuales es WO 06018839 A2 incorporada en la presente memoria como referencia.

El método de la presente invención

Normalmente se emplea una cubeta del primer tipo para recuento de bacterias y determinación de susceptibilidad bacteriana a los antibióticos. Ahora se hace referencia a la **Fig. 4** que muestra un organigrama de un procedimiento de recuento de bacterias y determinación de su susceptibilidad a los antibióticos según una realización preferida de la presente invención. Tal procedimiento incluye las siguientes etapas: una etapa **108** de iniciación en que el sistema y el programa de ensayo se inician; una etapa **110** de preparación en que se filtran muestras del fluido y se cargan en las cubetas de ensayo; una etapa **112** de iniciación de ensayo en que se introduce una cubeta de ensayo en el sistema y se detectan las bacterias y se recuentan; en la etapa **114** se introduce manualmente un agente antibiótico en la cubeta de ensayo; en la etapa **116** se realizan repetidamente mediciones de dispersión de la luz y se procesan; en la etapa **118** el sistema comprueba si los ensayos referidos a las muestras actuales de fluidos están completados; en la etapa **120** el sistema comprueba si se tiene que empezar el ensayo del siguiente agente antibiótico; en la etapa **121** el sistema comprueba si se ha completado el ensayo del agente antibiótico actual; en la etapa **122** se ensaya la cubeta de control relacionada con la muestra actual de fluidos y el sistema comprueba en la **124** si hay más muestras de fluidos esperando a ser ensayadas; el procedimiento termina en la etapa **126**.

El procedimiento empieza en la etapa **108** encendiendo de manera manual la unidad de procesamiento y control por la que se activa el sistema. Los datos de entrada del operario relacionados con el plan de los ensayos y con las muestras, tales como la identidad del fluido examinado y el número total de muestras que se tiene que N_f . La unidad de procesamiento y control inician automáticamente el programa de operación de ensayo y el mensaje al operario para proporcionar datos relevantes. Una cola del agente antibiótico según una lista actualizada manualmente de agentes antibióticos que son adecuados para el fluido examinado se almacena en una memoria de la unidad de procesamiento y control. Al final de esta etapa de iniciación el sistema está (STD BY) y espera más comandos. Mientras tanto el operario continúa manualmente en una etapa **110** de preparación (PREP) en que realiza las siguientes actividades: (a) filtrar de manera mecánica una muestra de fluido (b) llenar respectivamente con porciones del fluido filtrado una serie de cubetas. Este número excede del número de agentes antibióticos que se tienen que investigar al menos por uno sirve de control. Las cubetas restantes son las cubetas de ensayo cada una de las cuales se dedica a uno de los agentes antibióticos. Alternativamente, tales porciones del fluido bruto se presurizan por un filtro instalado en el alojamiento de las cubetas para llenarlas. En la etapa **112** de iniciación del ensayo (TINIT) una cubeta de ensayo que contiene un fluido filtrado se introduce de manera manual y se alinea con el sistema. Siguiendo un comando de "inicio" del manual el sistema activa automáticamente la fuente de luz (cuando se examina la primera cubeta de ensayo de la primera muestra de fluidos) y se ponen en marcha los relojes para medir el tiempo; y recibe repetidamente para un primer intervalo T_1 de tiempo predefinido una serie de imágenes de puntos discretas a una velocidad de repetición predefinida CPS₁. Después el sistema proporciona un mensaje al operario para introducir una dosis del primer agente en la cola actual de agentes antibióticos en esta cubeta examinada. Mientras tanto las imágenes de puntos recibidas son procesadas de manera automática para "recuento de bacterias" como se describe además más adelante. Los resultados del procesamiento se almacenan en una memoria de la unidad de procesamiento y control. Entonces el sistema se detiene automáticamente y espera un primer comando de "continuar" para iniciar la etapa **116**.

El operario que recibe el mensaje continúa en paralelo a la etapa **114** en que introduce manualmente una dosis calibrada adecuadamente de agente antibiótico en la cubeta examinada actualmente. El operario ordena al sistema que continúe la etapa **116** para realizar mediciones de dispersión repetidas (RSM).

5 El sistema recibe imágenes de puntos discretas a lo largo del mismo intervalo T_1 de tiempo y a la misma velocidad CPS_1 . estas imágenes de puntos son procesadas para determinar las susceptibilidad bacteriana a los antibióticos como se describe además más adelante y los resultados se almacenan de acuerdo con esto. En la etapa **118** el sistema compara el valor de T , que es el tiempo transcurrido puesto que se ha introducido el tiempo como un comando de "inicio" en un segundo intervalo T_2 de tiempo. T_2 iguala un tercer intervalo T_3 de tiempo, multiplicado por el número de agentes antibióticos que se tienen que ensayar en el procedimiento actual. En un caso en que este tiempo transcurrido T es más pequeño que T_2 el sistema va a la etapa **120** en que compara el valor de T con el tercer intervalo de tiempo predefinido T_3 Si T es menor que T_3 el programa continúa a la etapa **121** en que compran el valor de TT con T_3 . TT designa el tiempo transcurrido o desde el momento en que se entró el último comando "continuar" o desde el final del último intervalo T_1 de tiempo en que se recibió sucesivamente una serie de imágenes de puntos discretas. En un caso en que TT es más corto que T_3 el sistema espera un momento y va de nuevo a la etapa **118**. De otro modo, el sistema vuelve a la etapa **116**. En un caso en que T excede T_3 el operario recibe el mensaje de ir a la etapa **114** y cambiar la cubeta de ensayo actual por la siguiente y continuar ensayando el siguiente agente antibiótico. Entonces el programa espera un comando de "continuar" en la etapa **116**. En un caso de que T no sea menor T_2 el sistema envía el mensaje al operario de cambiar entre la cubeta de ensayo medida en este momento y la respectiva cubeta de control e introducir un comando de "recuento de control" cuando se complete dicho cambio. El sistema procesa las mediciones de dispersión y determina los agentes antibióticos a que son susceptibles las bacterias como se describe además más adelante. Entonces el sistema espera el comando de "recuento de control". Después de este comando el sistema recibe automáticamente imágenes de puntos discretas a lo largo del mismo intervalo T_1 de tiempo y a la misma velocidad de repetición CPS_1 y procesa estas imágenes para un "recuento bacteriano de control" como se describe además más adelante y almacena los resultados en una memoria de la unidad de procesamiento y control.

Los resultados del ensayo incluyendo recuento de bacterias y el agente o agentes antibióticos a los que las bacterias son susceptibles se almacenan en la unidad de procesamiento y control y también se muestran al operario. En casos excepcionales, tales como los casos en que las discrepancias entre el compuesto intermedio y o los resultados finales que sean mayores que un umbral predefinido, se envía mensaje al operario para repetir parcial o completamente el procedimiento de ensayo de acuerdo con esto. Entonces el programa vuelve automáticamente a la etapa 110. De otro modo, el programa continúa a la etapa 124 en que el sistema comprueba si el número N de ensayos completados con éxito es más pequeño que el número total de muestras de fluido N_T . En un caso en que haya más muestras esperando ser ensayadas el sistema envía mensaje al operario para continuar partiendo de la etapa 110. Mientras tanto el sistema espera un comando de "empezar" para cambiar a la etapa 112. De otro modo el proceso se completa en la etapa 126 después de que se transmitan opcionalmente los datos completos a un ordenador remoto.

Procesamiento de señales y datos

La señal de fondo originada por partículas suspendidas en la muestra de fluido que son mayores que las de bacterias se excluyen por filtrado mecánico según el método de la presente invención. Sin embargo, hay fuentes y dispersores de luz distintos de las bacterias que pueden contribuir a una señal de fondo estacionaria. Tales señales son originadas típicamente por partículas estacionarias presentes dentro del espacio iluminado, impurezas de la fuente de luz, defectos en, y o partículas que contaminan, los componentes ópticos. Por lo tanto se computa una representación gráfica de diferencia para excluir fondo estacionario según una realización preferida de la presente invención. La intensidad medida en cada píxel de una imagen de puntos se sustrae de la intensidad medida en el mismo píxel de una imagen de puntos precedente para formar una representación gráfica de diferencia. La representación gráfica de diferencia es una imagen que tiene el mismo número y disposición de los píxeles a partir de una imagen de puntos, cuyas intensidades igualan los valores absolutos de las respectivas diferencias. Por lo tanto una representación gráfica de diferencia sólo muestra los componentes dependiendo del tiempo de la intensidad de luz dispersada por el fluido examinado.

50 Se promedia una serie de tales representaciones gráficas de diferencia en el tiempo y o en una región en una o dos dimensiones de ángulos de dispersión para formar un derivado promediado de la concentración de dispersores en el tiempo. Obviamente, las representaciones gráficas de diferencia y los derivados promediados son más suaves que las imágenes de puntos y la velocidad en que cambian en el tiempo principalmente depende de la velocidad en que cambia la concentración de dispersores no estacionarios. Típicamente el intervalo dinámico de representaciones gráficas y derivados promediados es más pequeño que el intervalo dinámico de las respectivas imágenes de puntos y su relación señal a ruido es mejor.

Para detectar y recontar las bacterias según una realización preferida de la presente invención primero se asocia un perfil de dispersión a un derivado promediado computado para las imágenes de puntos más tempranas recibidas cuando se examina una cubeta de ensayo. Tal asociación se consigue por ejemplo por una técnica de ajuste

numérico común. Alternativamente, un número de las imágenes de puntos más tempranas recibidas para una cubeta de ensayo se promedia de manera similar en el tiempo y o en una región angular de una o dos dimensiones. se asocia un perfil de dispersión a tal es imágenes de puntos promediadas empleando ajuste numérico común de curvas o superficies tridimensionales. Después se compara el perfil de dispersión asociado con perfiles de dispersión estándar almacenados en el sistema. La concentración de bacterias en el fluido examinado iguala la concentración del perfil de dispersión estándar que mejor se ajusta al perfil de dispersión asociado.

Para determinar la susceptibilidad de las bacterias a un agente antibiótico, se compara un valor promedio de al menos dos derivados promediados computados primero para una cubeta de ensayo, inmediatamente después de la introducción de un agente antibiótico, con un promedio del mismo número de derivados promediados computados para imágenes de puntos recibidas unos minutos más tarde, preferiblemente después de más de 5 minutos. Se determina el agente antibiótico para el que la diferencia entre estos derivados promediados es mayor.

En un recuento de control el ensayo según la invención incluye las etapas de detección de bacterias y determinación de su concentración. El ensayo se realiza considerando el tiempo transcurrido desde el examen de la primera cubeta de ensayo, como se describió anteriormente.

Se preparan perfiles de dispersión calibrados según la invención por perfiles de dispersión promediados de manera estadística medidos o computados para muestras calibradas de fluidos que contienen, y muestras sin, bacterias. Los perfiles de dispersión estándar incluyen perfiles de dispersión calibrados y combinaciones lineales de perfiles calibrados. Los perfiles de dispersión calibrados y o perfiles de dispersión estándar se almacenan previamente en el sistema. Más características de los perfiles calibrados y perfiles estándar así como una descripción más detallada de técnicas de ajuste se describen en la solicitud de patente WO 06018839 A2.

Ejemplo 1

Se realizó un análisis simulado de imágenes de puntos. Se preparó un modelo sintético de orina en que esferas de 2 - 4 μm de diámetro con la misma constante dieléctrica que las de las bacterias representan bacterias. Las partículas se distribuyen aleatoriamente en un medio uniforme que corresponde a una disolución acuosa de sal. Esferas aleatoriamente distribuidas cuyo radio es menor que un micrómetro y con una correspondiente constante dieléctrica representan partículas de sal. La orina sintética está contenida en un cilindro que tiene un diámetro de 0,5 milímetros (mm) y una altura de 55 mm. Este cilindro conforma un volumen de separación entre la abertura del diafragma **76** y un medio **70** para ocultar la luz dentro de la cubeta **74** mostrado en la **Fig. 3A** a la que se hace referencia de nuevo. Las partículas se iluminan de manera coherente (espacialmente y temporalmente) tal como por medio de diodo láser. La intensidad de luz dispersada medida en un punto por la cara del detector de luz se calcula empleando un trazador de rayos coherente en que la intensidad en la cara de la partícula de dispersión conforma la distribución angular de dispersión según la teoría de Mie. [H. C. van de Hulst. "Light scattering by small particles", editorial John Wiley & Sons, NY, 1.957].

Ahora se hace referencia a la **Fig. 5** que muestra una imagen de puntos calculada tal como es recibida por un cuadrante de una disposición del detector planar. La intensidad de la luz dispersada como se muestra en la **Fig. 5** disminuye con el ángulo de dispersión conformal con la distribución angular de dispersión según la teoría de Mie. La frecuencia espacial de los puntos aumenta con el ángulo de dispersión a medida que un número mayor de partículas, que se distribuyen aleatoriamente, contribuye al patrón de interferencia de los puntos.

Ejemplo 2

Se realiza un análisis de la dinámica de una imagen de puntos simulada empleando los mismos modelos físicos y aproximaciones que se describe en el EJEMPLO 1 anterior. Ahora se hace referencia a la **Fig. 6** que muestra comportamientos temporales ejemplares de la intensidad de la luz dispersada calculada en un punto de la cara del detector de luz. Este punto está espaciado 1 mm aparte del eje óptico del sistema. Las partículas suspendidas en la orina sintética se mueven en direcciones distribuidas uniformemente a velocidades con magnitudes distribuidas normalmente. La representación gráfica **130** muestra un perfil de intensidad – tiempo simulado en que el valor medio de la magnitud de las velocidades es 0,25 $\mu\text{m/s}$. La representación gráfica **132** muestra otro perfil de intensidad – tiempo simulado en que el valor medio de la magnitud de las velocidades es 5 $\mu\text{m/s}$. La intensidad de la señal recibida por el detector de luz en este punto se mide en unidades arbitrarias (U. A.). El tiempo se da en segundos (S). La escala de la intensidad de la señal es lineal y la Representación gráfica **132** se desplaza aparte de la representación gráfica 130 (para fines gráficos). Las partículas que se mueven a velocidades mayores ocasionan que un segmento de la imagen de puntos resultante cambie y oscile a una velocidad mayor que un segmento similar inducido por partículas más lentas. Mientras las partículas fijadas espacialmente dan como resultado una imagen de puntos estacionaria.

Ahora se hace referencia a la **Fig. 7** que muestra distribuciones de frecuencia ejemplares de la magnitud dependiente del tiempo de una señal recibida en el mismo punto que en la **Fig. 6**. Las partículas se mueven en el fluido a velocidades con direcciones distribuidas de manera uniforme y magnitudes distribuidas normalmente. Las

representaciones gráficas **140 - 146** muestran las distribuciones de frecuencia que corresponden a valores medios de 0,25, 0,50, 2,5 y 7,5 $\mu\text{m/s}$ respectivamente. Las frecuencias se miden en Hertz (Hz) y las intensidades de las señales medidas en U. A. se representan gráficamente empleando escala logarítmica. Por lo tanto las partículas que se mueven activamente, tales como bacterias móviles cuyas velocidades son considerablemente mayores que las velocidades típicamente asociadas al movimiento Browniano, se pueden investigar por un sistema de la invención. Además, de acuerdo con el método de la presente invención un tiempo de exposición preferible en que se muestrea una imagen de puntos en tales mediciones de dispersión es considerablemente menor que un ciclo de tiempo típico resultante de la distribución de frecuencia asociada con el movimiento Browniano.

Ejemplo 3

Un equipo ejemplar que muestra las características del método y el sistema de la invención relacionado con la dinámica de la luz dispersada de fluidos que contienen bacterias se describe a continuación. Se toman dos muestras de la misma muestra de orina, que están exentas de bacterias. Se introduce una cantidad calibrada de E-coli en una de estas muestras, de manera que la concentración bacteriana en la muestra es 10^6 unidades formadoras de colonias por mililitro (CFU/ml). Se introduce una cantidad de partículas pf de un tamaño de 2 μm en la otra muestra de orina, de manera que la concentración de las partículas iguale la concentración bacteriana de la primera muestra. Estas partículas se hacen de poli(metacrilato de metilo) (PMMA). Las dos muestras se filtran de manera mecánica para excluir partículas mayores que 5 μm . Se examinan las muestras con un sistema para recuento de bacterias de la invención cuya fuente de luz consiste en un diodo láser de 650 nanómetros (nm) con una potencia de 0,2 milivatios (mw) y un diámetro del haz de 0,5 mm. Un sensor CMOS sirve como detector de la luz. Las muestras de fluido se cargan en cubetas del primer tipo tales como las cubetas **74** mostradas en la **Fig. 3A** a las que se hace referencia de nuevo. Las dimensiones del espaciamiento del volumen iluminado de fluido entre la abertura del diafragma **76** y los medios **70** que ocultan la luz son los mismos que se describieron anteriormente.

Ahora se hace referencia a las **Figs 8A - 8C**. En la **Fig. 8A** se muestran las intensidades de las señales de luz dispersada por la muestra incluyendo E-coli. Las señales recibidas por un segmento de una fila de píxeles dispuestos por la cara del detector de luz; se muestrean periódicamente a una velocidad de 300 Hz a lo largo de un intervalo de tiempo de un segundo. En la **Fig. 8B** se muestran las intensidades de las señales de luz dispersada por la muestra incluyendo partículas de PMMA. La señal es recibida por el mismo segmento de píxeles y se muestrea de manera similar y se representa gráficamente como en el caso mostrado en **Fig. 8A**. La magnitud de la intensidad medida se representa por el color de las representaciones gráficas que oscilan del negro para intensidad cero a blanco para la intensidad máxima medida. Cualquier punto a lo largo de una línea que es paralela al eje **148** corresponde al mismo momento del tiempo, mientras que cualquier línea paralela al eje **149** corresponde al mismo ángulo de dispersión o el mismo píxel en el segmento de la fila de píxeles.

Una serie de líneas casi horizontales cuyo color cambia periódicamente a una velocidad moderada se muestra en la **Fig. 8B**. Tal comportamiento temporal corresponde a una distribución de frecuencia sustancialmente estrecha de la intensidad dependiente del tiempo de la luz dispersada. Tal comportamiento es típico en los casos en que las partículas tales como las partículas de PMMA se mueven en un movimiento Browniano. Las bacterias E-coli son móviles y son capaces de moverse a velocidades significativamente mayores. Por lo tanto, la correspondiente distribución de la frecuencia es considerablemente más amplia en que mayores frecuencias tienen una contribución considerable en hacer parecer la **Fig. 8A** ruidosa y puntiaguda.

Los perfiles intensidad – tiempo relacionados con estas dos muestras se muestran en la **Fig. 8C**. Las intensidades de una señal recibidas en un píxel ejemplar (que es uno de los píxeles asociados a la generación de la **Fig. 8A**), e miden en unidades arbitrarias. La escala de intensidad es lineal y el tiempo se mide en segundos (S). La representación gráfica **150** corresponde a la muestra que incluye E-coli mientras la representación gráfica **152** a la muestra que incluye partículas de PMMA. La representación gráfica **150** se desplaza aparte de la representación gráfica **152** (por fines gráficos). Las frecuencias considerablemente mayores inducidas por la motilidad bacteriana contribuyen significativamente al comportamiento temporal de la representación gráfica **150**. Mientras las frecuencias considerablemente bajas en el intervalo de unos Hertz inducidas por el movimiento Browniano de las partículas de PMMA proporcionan la dependencia del tiempo moderada de la representación gráfica **152**. Ayudado por tales representaciones gráficas de la intensidad como en las **Figs 8A - 8C** un operador puede seleccionar un tiempo de exposición y una velocidad de muestreo en que se tienen que recibir las imágenes de puntos.

Ejemplo 4

Se describe a continuación un experimento que demuestra características de un método para procesamiento de datos según una realización preferida de la presente invención. Se prepara una muestra calibrada ejemplar de orina que E-coli. El sistema empleado en este experimento se describe en el ejemplo 3 anterior. Después del procedimiento descrito en la etapa **110** y siguientes mostrado en la **Fig. 4** a la que se hace referencia de nuevo, se hacen las siguientes actividades. Primero una muestra tomada de esta muestra se filtra de manera mecánica para excluir partículas cuyos tamaños exceden de 5 μm . Después se llena con una porción del fluido filtrado la primera cubeta de ensayo, que es una cubeta del primer tipo. Se pone la cubeta y se alinea y se hacen mediciones de

dispersión de luz para detectar y recontar bacterias.

Se hace referencia ahora a las **Figs 9A - 9C**. En la **Fig. 9A** se muestran respectivamente dos perfiles de dispersión calibrados ejemplares de una serie de perfiles calibrados y los perfiles de dispersión medidos e igualados de esta muestra de orina. La curva **156** representa el perfil de dispersión calibrado de orina no infectada. La curva **158** representa uno de los perfiles de dispersión calibrados de orina que contiene bacterias a un nivel de concentración bacteriana específico. La curva **159** representa el perfil de dispersión igualado a la muestra examinada. Los círculos representan valores del perfil de dispersión asociado como se mide. La línea continua representa la combinación lineal mejor ajustada de perfiles de dispersión calibrados que representan orina que contiene bacterias a una concentración de 10^5 CFU/ml. Un nivel considerablemente alto de igualación se demuestra por un intervalo significativo de ángulos de dispersión. El nivel detectado de concentración bacteriana en esta muestra examinada se desvió del nivel de referencia por un porcentaje.

En esta fase se introduce una dosis de gentamicina de manera que su concentración en la cubeta de ensayo iguale el 1%. En las **Figs 9B y 9C** se muestran respectivamente dos representaciones gráficas de diferencias computadas siguiendo la introducción del agente antibiótico en esta cubeta de ensayo. Se emplean dos imágenes de puntos recibidas sucesivamente en dos momentos diferentes de tiempo separadas por al menos 20 milisegundos (ms) para cada representación gráfica de diferencia. Las representaciones gráficas de diferencia se computan sustrayendo el primero de cada par de estas imágenes de puntos del segundo. En la **Fig. 9B** se muestra una representación gráfica de diferencia derivó inmediatamente siguiendo a la introducción de los antibióticos, mientras la **Fig. 9C** muestra una representación gráfica de diferencia derivada 30 minutos más tarde. Aunque los niveles de las señales en ambas representaciones gráficas de diferencia es relativamente baja, se ven claramente los puntos en **Fig. 9B** mientras la **Fig. 9C** muestra un nivel considerablemente más suave. Una reducción significativa en la concentración de dispersores no estacionarios ha tenido lugar como resultado de la introducción de un agente antibiótico adecuado. Se promedian representaciones gráficas de diferencia en el tiempo a lo largo de un intervalo de tiempo preespecificado y o en los ángulos de dispersión por un intervalo angular de una o dos dimensiones preespecificado según la presente invención, para proporcionar un derivado promedio de la concentración de dispersores en el tiempo. El comportamiento temporal de derivado promediado asociado con esta muestra que contiene E-coli se muestra como referencia a **Fig. 9D**. En la **Fig. 9D** se muestran valores del derivado promediado normalizado por su valor máximo representado frente al tiempo medido en minutos (MIN). Se demuestra una reducción significativa (de unas decenas por ciento) en los valores del derivado promediado unos minutos antes de la introducción de los antibióticos.

Ejemplo 5

Se realiza un análisis de la contribución de la quimiotaxis y o termotaxis a la dinámica de una imagen de puntos simulada. Se emplearon los mismos modelos y la aproximación física como se describen en el EJEMPLO 1 anterior. El detector de luz modelo es un sensor CMOS bidimensional. El movimiento Browniano se modela por las velocidades de partícula con direcciones distribuidas uniformemente y las magnitudes distribuidas normalmente con un valor medio de $0,5 \mu\text{m/s}$. Se modelan movimientos quimiotácticos o termotácticos por una velocidad de las partículas uniforme de $5 \mu\text{m/s}$ perpendicular al haz láser.

Ahora se hace referencia a las **Figs 10A - 10B**. En la **Fig. 10A** se muestra un perfil de intensidad – ángulo de dispersión – tiempo tridimensional a lo largo de un segmento de una fila píxeles. La intensidad de la luz dispersada medida en cada píxel se representa por una escala de colores de negro y blanco; en que el negro representa intensidad cero y blanco representa la intensidad máxima medida. El tiempo de exposición es menor que 10 milisegundos y la velocidad de repetición del muestreo es 100 Hz. La longitud del segmento de la fila de píxeles empleados para simular estos perfiles es 0,15 mm. La longitud del intervalo de tiempo a lo largo del cual se muestran las intensidades simuladas es 2 s. Se miden las intensidades mostradas a lo largo de una línea que es paralela al eje **160** en el mismo píxel. Las intensidades a lo largo de una línea paralela al eje **162** se miden en el mismo momento del tiempo.

En la **Fig. 10B** un perfil de intensidad – ángulo de dispersión – tiempo inducido por partículas que se mueven en un movimiento Browniano y que tienen también el mismo componente de velocidad constante de $5 \mu\text{m/s}$. Es distinguible un componente promediado de un movimiento colectivo unidireccional que exceda de $2 \mu\text{m/s}$ y es diferente de velocidades típicamente asociadas con el movimiento Browniano. Por lo tanto, tal análisis de imágenes de puntos se puede usar también para estudiar la dinámica de las bacterias por medio del método de la invención.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para recuento de bacterias suspendidas en un fluido, en que una porción de dicho fluido se filtra para excluir partículas mayores que dichas bacterias y una muestra de la porción filtrada se pone en una cubeta que tiene al menos una ventana iluminada con un haz de luz coherente y colimado, comprendiendo el método las etapas de:
- i. medir repetidamente a una velocidad de repetición predefinida la intensidad de luz dispersada por la muestra a al menos dos ángulos diferentes de dispersión,
- 10 ii. calcular representaciones gráficas de diferencia de las mediciones de intensidad de la luz a cada uno de los diferentes ángulos de dispersión a los que se mide la intensidad de la luz, comprendiendo cada representación gráfica de diferencia los valores absolutos de diferencias entre niveles de intensidad de luz medidos en dos momentos de tiempo o diferentes al mismo ángulo de dispersión y
- iii. igualar cada una de dichas representaciones gráficas de diferencia con una curva de calibración para proporcionar una estimación de la concentración de las bacterias en la muestra.
- 15 **2.** Un método según la reivindicación 1, en el que las mediciones se realizan a una pluralidad de ángulos de dispersión para establecer un perfil de dispersión para la muestra.
- 3.** Un método según la reivindicación 1, que comprende además calcular una derivada promedio con respecto al tiempo de la concentración estimada de bacterias.
- 4.** Un método según la reivindicación 1, que comprende además introducir un agente antibiótico en dicha muestra de fluido filtrado previamente al comienzo de la medición de la intensidad de la luz.
- 20 **5.** Un método según la reivindicación 4, que comprende además la etapa de esperar durante al menos un minuto después de introducir el agente antibiótico previamente al comienzo de la medición de la intensidad de la luz.
- 6.** Un método según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de introducir un quimioefector en dicha muestra de fluido filtrado previamente a dicha medición.
- 25 **7.** Un método según la reivindicación 1, que comprende además inducir un gradiente de temperatura por dicha muestra de fluido filtrado previamente al comienzo de la medición de la intensidad de la luz.
- 8.** Un método según la reivindicación 1, en el que al menos dicha ventana se caracteriza por una característica óptica seleccionada de un grupo de características ópticas que consiste en transparencia dentro de un intervalo de longitudes de onda que contiene una longitud de onda de dicha luz de iluminación, homogeneidad del índice de refracción que es mejor que 0,0001, el valor de la raíz cuadrada media de la rugosidad superficial de una cara de al menos dicha ventana no excede de 1 nanómetro, la calidad de una cara de al menos dicha ventana definida por una serie de rayas/marcas no excede 40/20 y cualquier combinación de las mismas.
- 30 **9.** Un método según la reivindicación 1, en el que la anchura de al menos dicha ventana no excede de 0,5 milímetros.

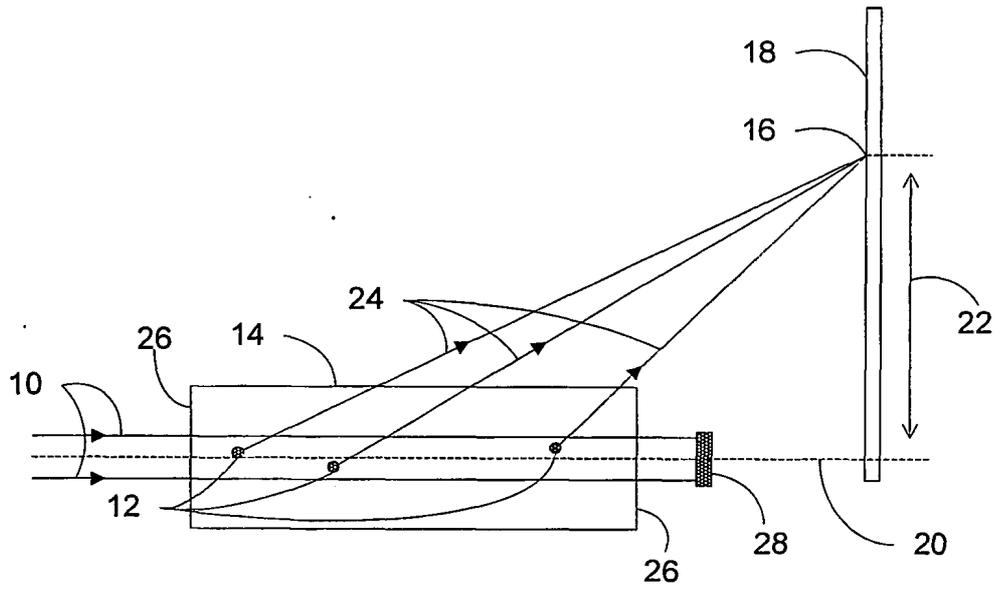


Fig. 1

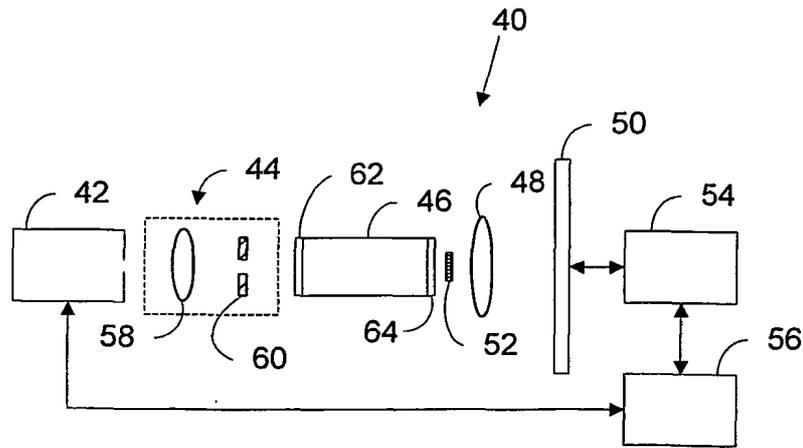


Fig. 2

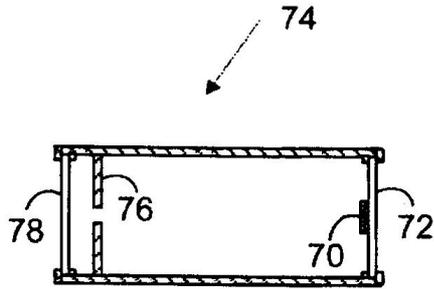


Fig. 3A

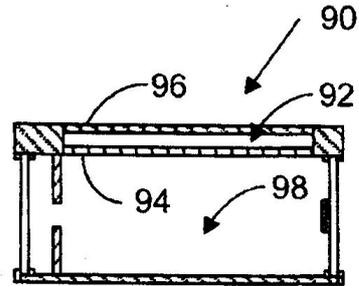


Fig. 3B

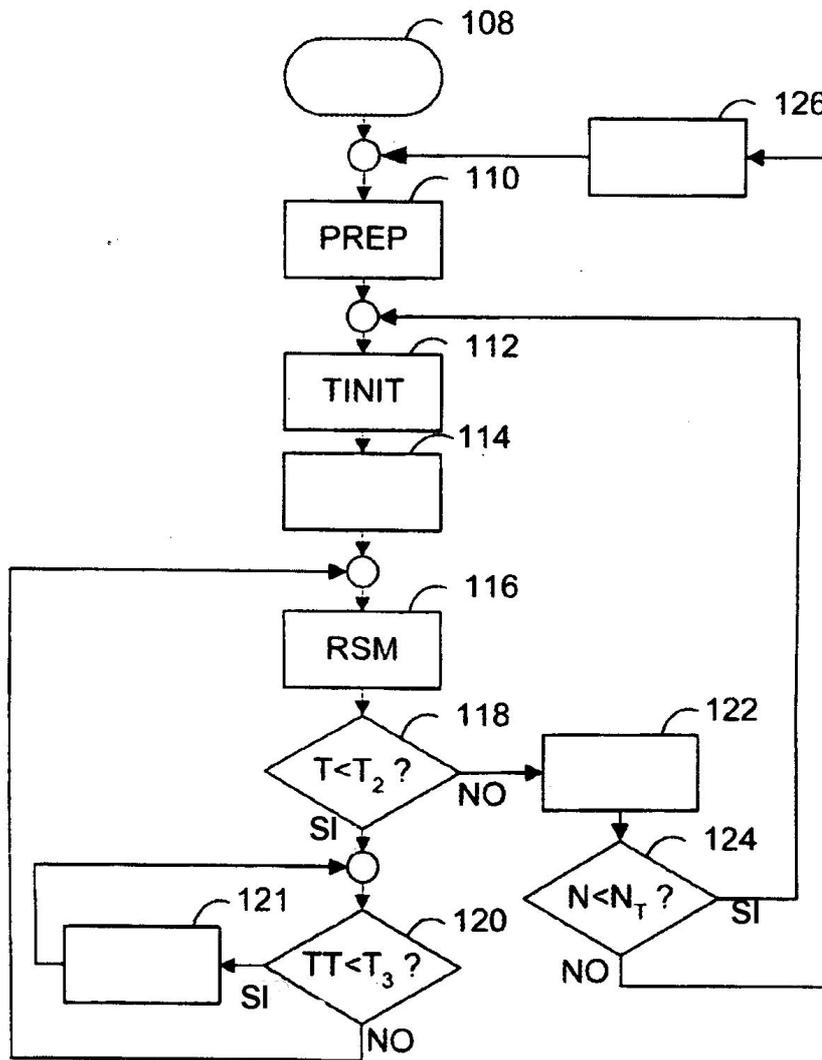


Fig. 4

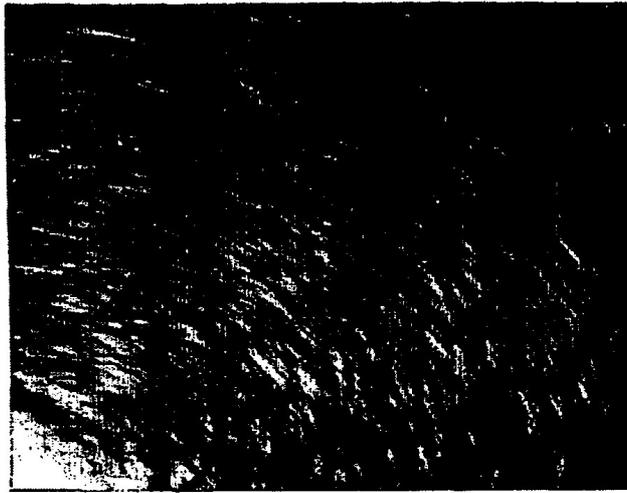


Fig. 5

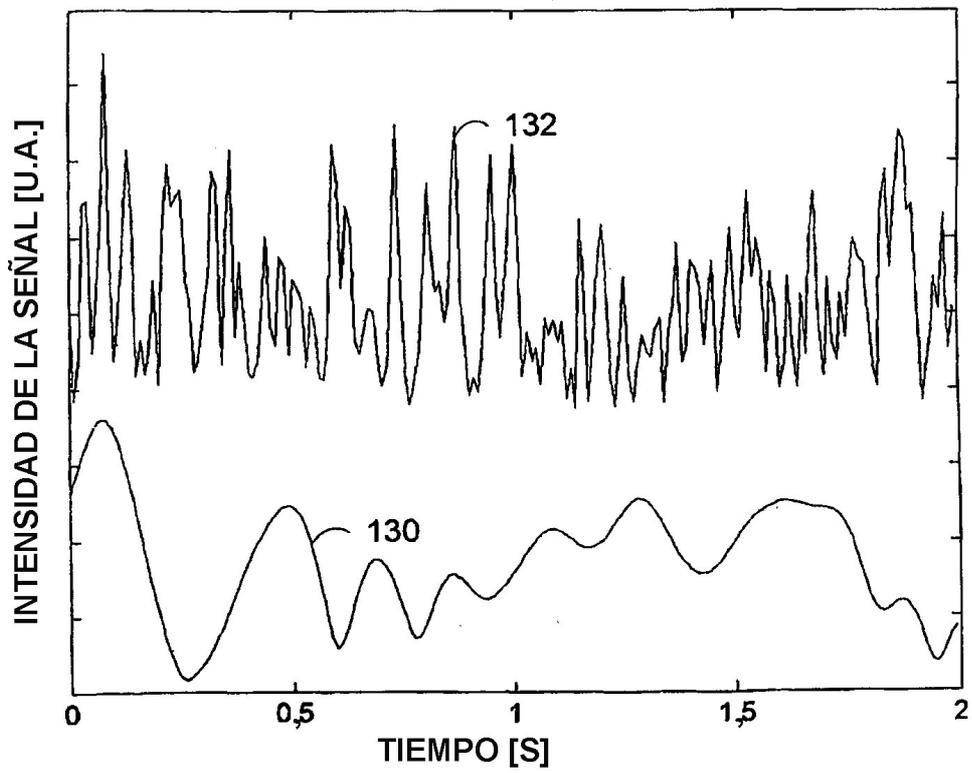


Fig. 6

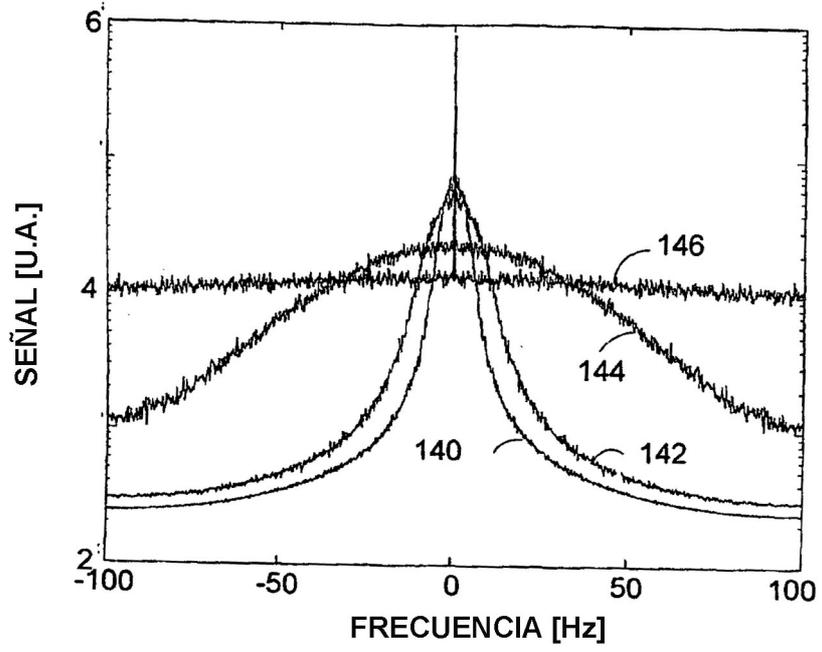


Fig. 7

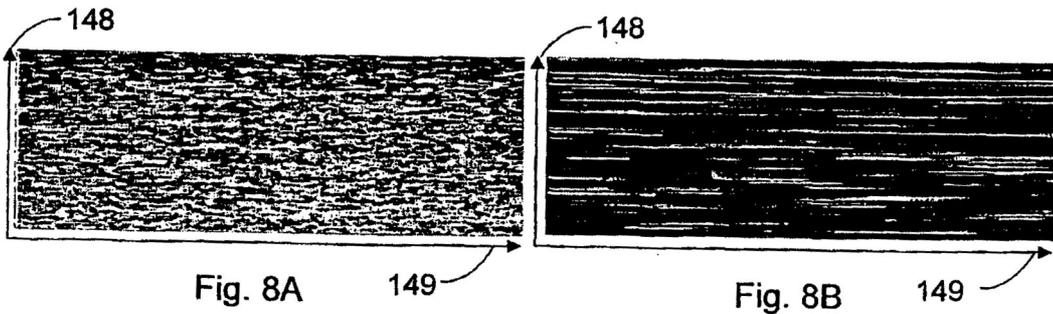


Fig. 8A

Fig. 8B

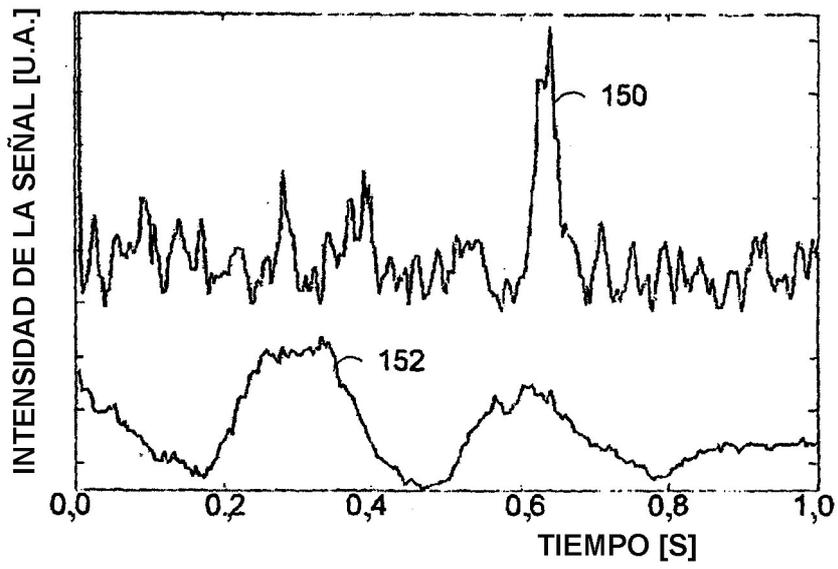


Fig. 8C

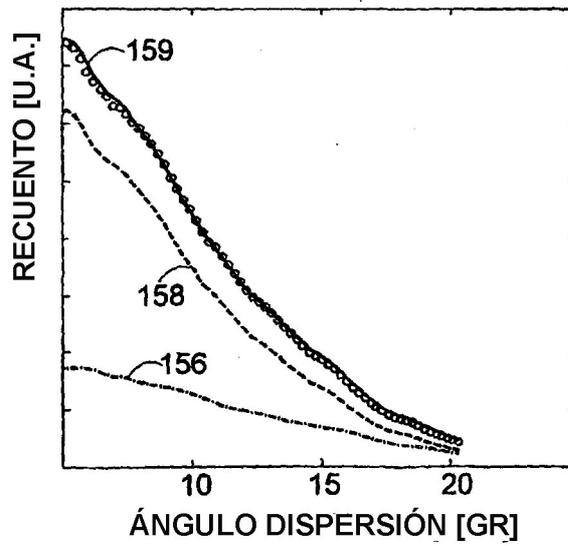


Fig. 9A

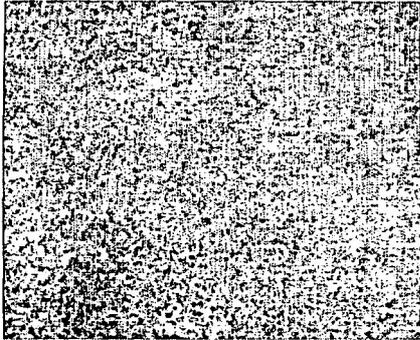


Fig. 9B

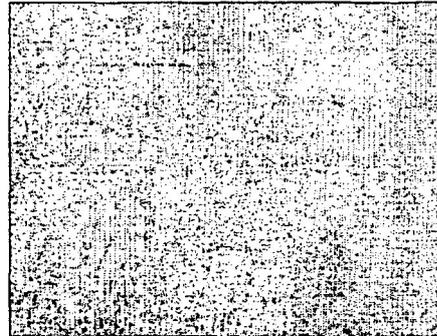


Fig. 9C

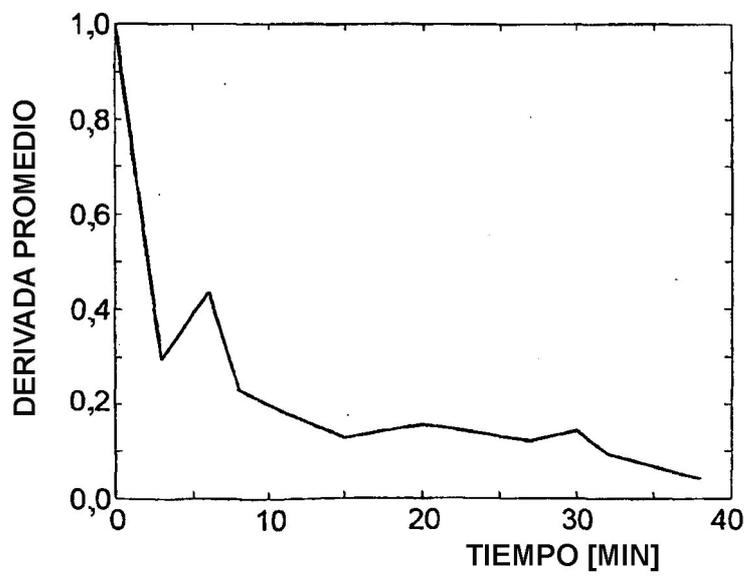


Fig. 9D

