

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 341**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/18 (2006.01)
G01J 3/46 (2006.01)
G01N 31/22 (2006.01)
G01N 21/86 (2006.01)
B01L 7/00 (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)
G01N 21/80 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2007 E 11160287 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2013 EP 2336350**

54 Título: **Combinación de un dispositivo lector y una incubadora**

30 Prioridad:

08.02.2006 EP 06101411
25.04.2006 EP 06113088

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2014

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es:

STARK, JACOBUS;
LANGEVELD, PIETER CORNELIS;
GROEN, BASTIAAN;
DE GRAAF, TIM y
PLUGGE, WILLEM

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 443 341 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

Combinación de un dispositivo lector y una incubadora

Campo del invento

- 5 El presente invento se refiere a un nuevo sistema de ensayo mejorado y a un nuevo método para la determinación rápida de la presencia o ausencia de analitos en una muestra usando un sencillo equipo constituido por un dispositivo lector y un ordenador, combinado con un equipo de calentamiento.

Antecedentes del invento

- 10 Los métodos de ensayo (sistemas de ensayo) para la detección de analitos en unas muestras son ampliamente conocidos en la especialidad. Unos ejemplos particulares de sistemas de ensayo son los de aquellos en los que el analito se ha de detectar tiene un específico espectro de colores, rayos IR o rayos UV y por lo tanto puede ser detectado por medio de un dispositivo lector, que comprende una celda fotoeléctrica, un escáner, cualquier tipo de cámara y, desde luego, por medios visuales. Si las características espectrales del analito en cuestión no son
15 suficientes para una detección adecuada, con frecuencia es posible usar unos métodos indirectos. Por ejemplo, están disponibles unos métodos, según los cuales la presencia del analito desencadena un proceso secundario, que luego da como resultado la formación de un producto o suceso que tiene una característica espectral específica. Éste puede ser un producto coloreado, pero también puede ser un cambio en el valor del pH, en el potencial redox, en la temperatura y en fenómenos similares, que a su vez desencadena a una molécula indicadora para cambiar el
20 espectro de colores, de rayos IR, de redox o de rayos UV. Se emplean en la especialidad muchos tipos de procesos secundarios para diversas aplicaciones. Por ejemplo, el documento de solicitud de patente de los EE.UU US 2004/018552 describe un dispositivo analizador microbiológico automático para determinar tanto la identidad de un microorganismo como la concentración de un antibiótico, que es efectivo para la inhibición del crecimiento del microorganismo.

- 25 Un ejemplo es una reacción química del analito con una molécula fluorescente o coloreada, que da como resultado un producto sin fluorescencia ni color o con una fluorescencia o un color diferente, o a la inversa.

- Otro ejemplo es una inhibición de un proceso (bio) químico por el analito, según la que la presencia del analito es medida indirectamente como resultado de la ausencia (o presencia) del efecto de ese proceso (bio) químico. Esto último puede ser ilustrado, por ejemplo, por unos sistemas de ensayo microbiológicos para la detección de analitos,
30 particularmente de residuos de antibióticos y de agentes quimioterapéuticos, en unos fluidos tales como leche, jugo de carne, suero, orina, agua (residual) y similares. Unos ejemplos de dichos ensayos han sido descritos en los documentos de patente canadiense CA 2056581, de patente alemana DE 3613794, de patentes europeas EP 0005891, EP 0285792, EP 0611001, de patente británica GB A 1467439 y de patente de los EE.UU US 4.946.777. Estas descripciones tratan todas de ellas de unos sistemas de ensayo fáciles de usar, que hacen uso
35 de un organismo de ensayo y que darán un resultado por el cambio indicado por una molécula indicadora, por ejemplo un cambio del color de un indicador del pH y/o de redox, que se ha añadido al sistema de ensayo. Un cambio en el indicador indica la presencia de un organismo de ensayo que está creciendo. El principio consiste en que, cuando está presente un analito en un fluido en una concentración suficiente para inhibir el crecimiento del organismo de ensayo, el color del indicador seguirá siendo el mismo. En contraste, cuando no se produce ninguna
40 inhibición, el crecimiento del organismo de ensayo está acompañado por la formación de un ácido o de unos metabolitos reducidos o por otros fenómenos, que inducirán una señal indicadora. Los ensayos conocidos, más arriba mencionados, incluyen un medio de ensayo, tal como un medio de agar, inoculado con un apropiado organismo de ensayo, de manera preferible una cepa de *Bacillus*, *Escherichia* o *Streptococcus*, y un indicador del pH y/o un indicador de redox. El apropiado organismo de ensayo y el indicador, y opcionalmente unos tampones,
45 nutrientes, agentes tensioactivos y similares, se introducen dentro de un gel o simplemente se mantienen en solución. Normalmente, se escogen unas condiciones, de tal manera que los organismos de ensayo permanecen vivos, pero no se pueden multiplicar a causa de la falta de un requisito esencial de crecimiento (este puede ser un nutriente, un valor específico del pH o de la temperatura, o cualquier otro parámetro esencial). En el documento de solicitud de patente internacional WO 2005/118837, por ejemplo, se describe un sistema de ensayo microbiológico
50 en el que se añade un oligosacárido al medio de ensayo.

- Unos sistemas de ensayo, que requieren un régimen de temperatura más o menos estricto, para que los resultados que han de ser generados formen de una manera confiable y exacta una clase especial de métodos entre los que más arriba se han mencionado. Estos tipos de métodos requieren un equipo de incubación con el fin de mantener al sistema de ensayo a una temperatura o un perfil de temperaturas que previamente se ha determinado, durante un
55 período de tiempo dado. Usualmente, el resultado de dicho ensayo es determinado después de esto usando un dispositivo lector equipado para detectar el suceso que indica la presencia del analito. Un ejemplo de dicho sistema de ensayo se describe en el documento WO 03/033728, que trata de un método para detectar la presencia de un analito (tal como una β -lactama) en una muestra (tal como de productos alimenticios, p.ej. carne o leche, o de fluidos corporales, p.ej. sangre u orina) después de una incubación a 64°C por determinación de los valores de colores de la

muestra, asociados con el modelo de colores L^*a^*b , usando un escáner clásico acoplado a un ordenador. Esta última tecnología de lectura fue descrita también en el documento EP 953 149.

Una grave desventaja de estos métodos de la técnica anterior consiste en que solamente es posible realizar unas operaciones de lectura después de una incubación. Como resultado de esto, unos métodos de diagnóstico tales como unos ensayos microbiológicos para la detección de unos residuos antimicrobianos solamente dan un resultado negativo o positivo (es decir meramente indican si la concentración del analito está o no por encima o por debajo de un cierto valor de umbral). En el caso de un resultado positivo obtenido con estos ensayos denominados de escrutinio, la muestra se ha de examinar adicionalmente para obtener una confirmación usando un segundo método de diagnóstico. En la mayor parte de los casos, dichos métodos de confirmación, p.ej. usando una HPLC (cromatografía de fase líquida de alto rendimiento) o una espectrometría de masas, son extremadamente costosos y se necesita un largo período de tiempo antes de que se conozcan los resultados. Por lo tanto, sería ventajosa la lectura de los resultados del ensayo durante el ensayo de escrutinio propiamente dicho, puesto que esto proporcionaría el acceso a una información más detallada, que podría mejorar a unos parámetros tales como la duración del ensayo, el tipo del analito o la concentración del analito.

No obstante, la lectura de una información durante un ensayo y la simultánea incubación de dicho sistema de ensayo es conocida en unos métodos que se basan en la presencia de una fuente de luz situada en un extremo del sistema de ensayo y en la recogida de unas señales luminosas en el otro extremo del sistema de ensayo, un ejemplo de lo cual son los bien conocidos dispositivos lectores de ELISA. Este principio, desafortunadamente, tiene tres desventajas principales. En primer lugar, en unos sistemas de ensayo en los que la muestra es colocada sobre un substrato y la reacción requerida tiene lugar dentro del substrato, la naturaleza y la cantidad de la muestra perturbarán la medición cuando la luz u otro tipo de radiación se desplace a través tanto de la muestra como del substrato. En segundo lugar, el equipo usualmente empleado para dichas mediciones está dedicado y diseñado en la mayor parte de los casos para un personal entrenado y a ser usado en el entorno de un laboratorio. En tercer lugar, los principios de la técnica anterior están diseñados para medir solamente una longitud de onda particular. Por lo tanto, existe una necesidad de un equipo y de unos métodos que no padezcan de estas desventajas.

Sumario del invento

Es un objeto del presente invento proporcionar una disposición de detección para detectar la presencia de un analito en una muestra, comprendiendo la disposición de detección:

- a) un procesador,
 - b) una memoria,
 - c) un presentador visual,
 - d) un dispositivo de medición del color, y
 - e) una incubadora que comprende un dispositivo de calentamiento y una abertura para sostener a una muestra, en donde el dispositivo de calentamiento está colocado dentro del dispositivo de medición del color,
- en donde la memoria, el presentador visual y el dispositivo de medición del color se disponen para comunicarse con el procesador, el dispositivo de medición del color está dispuesto para generar unas señales luminosas, para enviar dichas señales luminosas a dicha muestra, para recibir unas señales luminosas de retorno desde la muestra, para convertir las señales luminosas de retorno en unas señales de colores y para enviar las señales de colores al procesador, el procesador se hace funcionar mediante unas instrucciones almacenadas en la memoria y este procesador está configurado para realizar las etapas **d** del método descrito seguidamente.

Además, es un objeto del presente invento proporcionar un método para detectar la presencia o ausencia de un analito en un fluido mediante un análisis de datos de imágenes procedentes de un sistema de ensayo que genera un resultado de imagen sobre un medio de ensayo, comprendiendo el método las etapas de:

- (a) incubar una muestra del fluido conjuntamente con el sistema de ensayo a una temperatura o a un perfil de temperaturas que se ha ajustado previamente,
- (b) obtener el resultado de imagen en el medio de ensayo,
- (c) reproducir en imágenes el resultado de imagen con un dispositivo de adquisición de imágenes para generar datos de imágenes digitales que corresponden al resultado de imagen,
- (d) usando unos medios de tratamiento de datos, calcular para cada sistema de ensayo un valor de un parámetro compuesto **Z** basado en los datos de imágenes digitales de acuerdo con la ecuación:

$$Z = \sum_{i=1}^n w_i x_i$$

en donde x_i es una señal de color i y w_i es un factor de ponderación correspondiente e i es un índice que varía entre 1 y n , y n es un número entero igual al número de señales de colores, caracterizado por que la etapa **a** se lleva a cabo simultáneamente con las etapas **b** y **c**, y tan pronto como el requerido número de sistemas de ensayo (**Nc**) tiene un valor de **Z** (**Zr**) más bajo que un valor de **Z** previamente determinado (**Zth**), se determina la presencia o ausencia de un analito en una muestra determinando en cada sistema de ensayo individual si el valor de **Z** del

sistema de ensayo (**Zs**) es más alto, igual o más bajo que un valor de Z de umbral (**Z de corte**) o un valor de **Z** de una muestra de referencia con una cantidad conocida del analito que se ha detectar.

Descripción detallada del invento

5 Los términos y las abreviaturas que se dan seguidamente, se usan a lo largo de esta descripción y se definen como sigue.

El término “medio de ensayo” se refiere a una composición tal como una solución, un material sólido o, de manera preferible, en la forma de un sol o un gel, que comprende por ejemplo un agente de gelificación. Unos apropiados ejemplos de agentes de gelificación son un agar, ácido alginico y unas sales del mismo, carragenano, una gelatina, un hidroxipropil-guar y derivados del mismo, goma de algarroba (en inglés Carob gum), algas del género Eucheuma tratadas, y similares. Sin embargo, una persona experta en la especialidad comprenderá que otros tipos de medios de ensayo sólidos pueden estar basados en unos materiales de soporte, tales como materiales cerámicos, algodón, vidrio, partículas metálicas, papel y unos polímeros en cualquier configuración o forma, silicatos, esponjas, lana y similares. Usualmente, un medio de ensayo contiene uno o más indicadores; sin embargo, estos compuestos pueden también ser añadidos más tarde cuando el ensayo se esté realizando. El medio de ensayo puede comprender uno o más tipos de organismos de ensayo o de enzimas como agentes de detección y nutrientes. Opcionalmente, el medio de ensayo puede contener también uno/a o más tampones, estabilizadores, sustancias que cambian la sensibilidad para ciertos analitos de una manera positiva o negativa, y/o agentes aumentadores de la viscosidad. Ejemplos de unas sustancias que cambian la sensibilidad para ciertos analitos son unos antifolatos tales como ormetoprima, tetroxoprima y trimetoprima, que mejoran la sensibilidad del organismo de ensayo hacia unos compuestos con el grupo sulfa o sales de ácido oxálico o de ácido fluorhídrico, que mejoran la sensibilidad hacia la tetraciclina. Unos ejemplos de agentes aumentadores de la viscosidad son metilsilanol pectinato de ascorbilo, un carbómero, una carboximetil celulosa, alcohol cetearílico, alcohol cetílico, ésteres cetílicos, cocamida DEA, una cera emulsionante, glucosa, una hidroxietil celulosa, una hidroxipropilmetil celulosa, lauramida DEA, linoleamida DEA, silicato de magnesio y aluminio, maltodextrinas, PEG-8 diestearato, una poli(acrilamida), un poli(alcohol vinílico), un copolímero de PVP/hexadeceno, cloruro de sodio, sulfato de sodio, soja-amidopropil betaína, una goma de xantano y similares. El medio de ensayo puede estar contenido dentro de cualquier tipo de recipiente; unos recipientes frecuentemente usados son unos tubos, unas placas de microtitulación y unas cubetas de Petri.

El término “CFU” es una abreviatura de Colony Forming Units (= unidades formadoras de colonias) y se refiere al número de microorganismos, esporas de microorganismos, esporas parcialmente germinadas de microorganismos o células vegetativas capaces de producir colonias de microorganismos.

El término “dispositivo lector” se refiere a un dispositivo capaz de capturar imágenes en color u otras imágenes espectrales y de traducir estas imágenes en señales analógicas o digitales, tal como un escáner, una cámara fotográfica digital o una cámara de vídeo, un aparato conocido como “web cam” o similares.

El término “fluido” se refiere a una sustancia (en forma de un líquido, no de un gas) que tiende a fluir o acomodarse al contorno de su recipiente.

El término “agente de gelificación” se refiere a un compuesto que ayuda a cambiar una mezcla para dar o tomar la forma de un gel.

El término “indicador” se refiere a una sustancia que se usa para medir (por ejemplo por cambio del color o de la fluorescencia) la condición de un medio de ensayo con respecto a la presencia de un material particular (por ejemplo, un ácido, una base, agentes oxidantes o reductores). Por ejemplo, el término “indicador” se puede referir a uno o más compuestos que son conocidos como indicadores del pH, pero también a uno o más compuestos que son conocidos como indicadores de redox. También, el término “indicador” se puede referir a unas mezclas de dos o más diferentes tipos de indicadores, tal como una combinación de un indicador del pH y de un indicador de redox. En general, cuando se usan dos o más indicadores, estos indicadores están cooperando para aumentar el efecto indicador de cada uno de los indicadores cuando se toma por sí sólo.

El término “sensibilidad” se refiere al grado de receptividad de un sistema dado para percibir un cierto estado. Más particularmente, en el presente caso “sensibilidad” se refiere al grado por el cual se pueden determinar unas concentraciones de analitos en una muestra.

El término “espora” se refiere a un primitivo cuerpo durmiente (latente) o reproductivo, usualmente unicelular, con frecuencia resistente al medio ambiente, que ha sido producido por unos microorganismos y que es capaz de desarrollarse para dar un nuevo microorganismo individual.

El termino “perfil de temperaturas” se refiere a una gama de valores de la temperatura en función del tiempo. Ésta puede ser una gama lineal, una gama hiperbólica, una gama exponencial, una gama polinómica pero también cualquier gama que sea apropiada para una aplicación específica y que no necesariamente sea descrita por una

simple función matemática. Una temperatura previamente ajustada es una especie del género “perfil de temperaturas” puesto que es un valor de la temperatura que se ha mantenido igual a lo largo del tiempo.

5 El término “umbral” se refiere al valor de la concentración, por encima del cual un analito dado ha de ser considerado como presente (valor positivo) y por debajo del cual dicho analito ha de ser considerado como ausente (valor negativo). Generalmente, un valor de umbral para unos analitos particulares en unas muestras particulares está dado por autoridades locales, regionales o interregionales pero también puede ser ajustado previamente para ciertas finalidades de investigación. Alternativamente, un valor de umbral puede ser una derivada de una fórmula, tal como una pendiente.

10 El término “transparente” se refiere a cualquier material que permita que la luz se desplace a través de ese material. Idealmente un material transparente no retiene ninguna proporción de la luz que se envía hacia él, pero puesto que no es conocido dicho material, el término “transparente” se refiere particularmente a unos materiales que permiten que la luz se desplace a su través con mínimas pérdidas. Las mínimas pérdidas pueden estar en la región situada por debajo de $50 \text{ \%} \cdot \text{mm}^{-1}$, de manera preferible por debajo de $20 \text{ \%} \cdot \text{mm}^{-1}$, de manera más preferible por debajo de $10 \text{ \%} \cdot \text{mm}^{-1}$, de manera todavía más preferible por debajo de $5 \text{ \%} \cdot \text{mm}^{-1}$, de manera sumamente preferible por debajo de $1 \text{ \%} \cdot \text{mm}^{-1}$.

15 En un primer aspecto del presente invento, se proporciona una disposición de detección destinada a detectar la presencia y la concentración de un analito en una muestra, que comprende un procesador, una memoria, un presentador visual, un dispositivo de comunicación tal como un puerto COM o un puerto USB y un dispositivo de medición del espectro, estando dispuesta/os dicha memoria, dicho presentador visual y dicho dispositivo de medición para comunicarse con dicho procesador y estando dispuesta/os para generar unas señales luminosas, para enviar dichas señales luminosas a dicha muestra, para recibir unas señales luminosas desde dicha muestra, para convertir dichas señales luminosas en unas señales de colores y para enviar estas señales de colores al procesador, en donde están presentes unos medios para mantener constante una temperatura o un perfil de temperaturas de dicha muestra. Dichos medios pueden ser una incubadora que comprende un dispositivo de calentamiento y una abertura para sostener a una muestra. O bien el dispositivo de medición está colocado dentro del dispositivo de calentamiento o el dispositivo de calentamiento está colocado dentro del dispositivo de medición. Aunque la disposición de detección puede comprender la generación de señales luminosas en una fuente seguida por la detección de una señal luminosa en una fuente opuesta a dicha primera fuente, en una realización preferida, la disposición de detección evita los problemas que están asociados con el desplazamiento de la luz a través de la muestra y del sustrato, puesto que ella está basada en el principio de la reflexión de la luz. Por lo tanto, usando la reflexión de la luz, por ejemplo ya no se requiere retirar la muestra desde el sustrato antes de la irradiación, lo cual a su vez tiene la ventaja de que se puede usar una parte más ancha del espectro luminoso (es decir que incluye también los rayos infrarrojos). Más aún, lo antedicho se puede realizar usando un equipo fácilmente accesible y relativamente barato, tal como una cámara digital, un escáner, una “web-cam” o un aparato similar.

20 En una primera forma de realización del invento, dichos medios para mantener constante una temperatura o un perfil de temperaturas de una muestra y un medio de ensayo son un dispositivo que comprende una o más aberturas para sostener al medio de ensayo y/o a las muestras. Las muestras y/o el medio de ensayo se pueden introducir directamente en las aberturas, pero alternativamente también pueden estar presentes en unos recipientes de los que por lo menos el fondo es transparente. El dispositivo tiene un lado de fondo transparente, por lo menos en aquellos lugares en los que se colocan la muestra y/o el medio de ensayo. El mantenimiento de la temperatura se realiza construyendo por lo menos una parte del dispositivo a base de un material que se calienta cuando se le aplica una corriente eléctrica o, alternativamente, construyendo por lo menos una parte del dispositivo a base de un material a través del que se puede hacer circular un fluido con una temperatura previamente ajustada. Como un ejemplo, dichos medios para mantener constante una temperatura o un perfil de temperaturas de la muestra y/o del sistema de ensayo son una placa transparente, hecha por ejemplo de vidrio o de cualquier clase de material plástico. La placa transparente está revestida con un material que puede ser calentado, por ejemplo por aplicación de una corriente eléctrica. Ventajosamente, dicho material es transparente o semi-transparente. En el último de los casos, el material permitirá que la luz se desplace a su través cuando se aplique en una capa suficientemente delgada que tiene de manera preferible un espesor que fluctúa entre $0,01$ y $200 \text{ }\mu\text{m}$, que de manera más preferible fluctúa entre $0,1$ y $50 \text{ }\mu\text{m}$, que de manera sumamente preferible fluctúa entre 1 y $20 \text{ }\mu\text{m}$, y que de manera aún más sumamente preferible fluctúa entre 5 y $15 \text{ }\mu\text{m}$. El dióxido de titanio es un material que es particularmente apropiado para obtener el deseado efecto, pero también se pueden usar otros materiales conocidos en la especialidad. El tamaño de las partículas fluctúa de manera preferible entre $0,1$ y 100 nm , de manera más preferible entre 1 y 50 nm , de manera sumamente preferible entre 10 y 30 nm . Con el fin de calentar al material y por lo tanto a la placa que soporta las muestras que se han de analizar, unos medios para aplicar la corriente eléctrica están sujetos a la placa. Dichos medios pueden ser un conjunto de electrodos sujetos a la placa y puestos en contacto con el material. Los electrodos pueden estar hechos de cualquier material que permita el transporte de la corriente eléctrica, la sujeción de los electrodos puede efectuarse con una cola capaz de transportar la corriente eléctrica. Tales electrodos y colas se conocen bien por una persona experta en la especialidad. Opcionalmente, la temperatura se mide por medio de un sensor de la temperatura, que similarmente está sujeto a la placa y conectado con el procesador. Opcionalmente, también los electrodos están conectados con el procesador y se dan instrucciones al procesador para mantener a la

temperatura de la placa en un valor o perfil previamente ajustado por aplicación de la requerida corriente eléctrica a los electrodos. Las muestras y/o el medio de ensayo se pueden introducir directamente en las aberturas del dispositivo de calentamiento, pero alternativamente pueden estar presentes también en unos recipientes de los que por lo menos el fondo es transparente. El dispositivo tiene un lado de fondo transparente, por lo menos en los sitios en donde se colocan la muestra y/o el medio de ensayo. El mantenimiento de la temperatura se realiza construyendo por lo menos una parte del dispositivo a base de un material que se calienta cuando se le aplica una corriente eléctrica.

En otra forma de realización del invento, dichos medios para mantener constante una temperatura o un perfil de temperaturas de una muestra y de un medio de ensayo son un dispositivo que comprende una o más aberturas para sostener al medio de ensayo y/o a las muestras. Están sujetas a dicho dispositivo unas pistas de calor, hechas por ejemplo a base de unos metales tales como aluminio, cobre, oro, plomo, estaño y similares, que permiten generar una entrada de calor específica para unos gradientes homogéneos de temperaturas. Con el fin de aumentar la exactitud del gradiente de temperaturas a lo largo del dispositivo se incluyen opcionalmente uno o más sensores y/o controladores de la temperatura para ajustar la entrada de corriente eléctrica. En un ejemplo, dichos sensores de temperatura están integrados eléctricamente en una placa impresa y están en contacto térmico con dicho dispositivo que está hecho de un material conductor del calor, tal como un metal como aluminio, cobre o hierro. La temperatura es controlada por un controlador Proporcional Integral Derivativo (PID, acrónimo de Proportional Integral Derivative) o por cualquier otro tipo de controlador o una combinación de los mismos. Para aumentar la velocidad de detección y la reproducibilidad, el dispositivo de calentamiento puede ser calentado previamente a una temperatura más alta.

En las Figuras y las leyendas para ellas se da un ejemplo de la disposición de detección (Figura 1) y del dispositivo de calentamiento (Figura 2) del presente invento. Aunque no se pretende que estas Figuras limiten el alcance del invento, ellas permitirán a una persona experta en la especialidad reproducir el invento.

En un segundo aspecto del invento, se proporciona un método para determinar la presencia o ausencia de un analito en un fluido por análisis de unos datos de imágenes procedentes de un sistema de ensayo que genera un resultado de imagen sobre un medio de ensayo. Más específicamente, dicho sistema de ensayo, conjuntamente con una muestra del fluido que se ha de analizar, requiere ser incubado a una temperatura o un perfil de temperaturas que previamente se ha ajustado. Las temperaturas o los perfiles de temperaturas dependen de la naturaleza del sistema de ensayo. Por ejemplo, en unos sistemas de ensayo de inhibición microbiológica, los microorganismos requieren usualmente una temperatura que fluctúa entre 25 y 45°C, de manera preferible entre 30 y 40°C, de manera más preferible entre 35 y 39°C. Sin embargo, otros microorganismos tales como unos microorganismos termófilos (es decir *Bacillus stearothermophilus* y otros) requieren unas temperaturas bastante diferentes para su crecimiento óptimo, es decir que fluctúan entre 40 y 75°C, de manera preferible entre 50 y 70°C, de manera más preferible entre 60 y 68°C y de manera sumamente preferible entre 63 y 66°C. Ventajosamente, el método del presente invento proporciona una incubación simultánea del sistema de ensayo, obteniéndose un resultado de imagen sobre un medio de ensayo y reproduciéndose en imágenes el resultado de imagen con un dispositivo de adquisición de imágenes para generar unos datos de imágenes analógicas y/o digitales que corresponden al resultado de imagen. También de manera simultánea, se pueden usar unos medios de tratamiento de datos para aplicar los datos de imágenes digitales, una relación almacenada entre el resultado de la imagen y unos datos de calibración del ensayo, tales como una tarjeta de colores normalizados, con el fin de generar un resultado cuantificado para dicho ensayo. Alternativamente, se pueden usar múltiples mediciones basadas en unas diferencias de colores en el curso del tiempo para obtener dicho resultado cuantificado. Esta última alternativa tiene la ventaja de que se puede evitar una calibración.

En una primera forma de realización del segundo aspecto del invento, se mantiene una temperatura o un perfil de temperaturas que se ha ajustado previamente mediante unos medios para mantener constante una temperatura o un perfil de temperaturas como se ha bosquejado en el primer aspecto del invento. Ventajosamente, dichos medios son calentados a la misma temperatura en cualquier punto de dichos medios. De manera preferible, las diferencias en la temperatura entre puntos individuales de dichos medios no son de más que 10°C, de manera preferible no son de más que 5°C, de manera todavía más preferible no son de más que 2°C y de manera sumamente preferible no son de más que 1°C.

En una segunda forma de realización, los resultados de imágenes se obtienen de una manera continua o a intervalos regulares (es decir por lo menos dos veces y el intervalo de tiempo entre dos mediciones consecutivas es de 0,00001 a 200 minutos) o a intervalos irregulares con el fin de establecer cualesquiera cambios lo antes que sea posible. De manera preferible, dicho intervalo de tiempo está situado entre 0,1 min y 160 min, de manera más preferible entre 0,5 min y 120 min, y de manera sumamente preferible entre 1 min y 10 min. La medición de los valores de colores en función del tiempo ofrece varias ventajas sustanciales.

En primer lugar, muchos de los sistemas de ensayo usados en la especialidad padecen la desventaja de reducir la durabilidad. Como resultado de esto, una duración fija del ensayo conduce inevitablemente a una más baja exactitud. La razón de esto es que cuanto más antiguo sea un sistema de ensayo dado, más largo tiempo se necesitará para obtener un cierto resultado. El establecimiento de la duración requerida del ensayo por medio del

tratamiento de una muestra en blanco puede evitar esto, aunque ésta es una metodología complicada que todavía carece de una exactitud optima. Sin embargo, por obtención de los resultados en función del tiempo, esta desventaja es evitada ahora puesto que el momento de tiempo exacto en el que cambia un parámetro de color dado se puede medir ahora con exactitud durante el ensayo. Consiguientemente, usando el método del presente invento, la vida en almacenamiento del sistema de ensayo, aunque todavía es un importante parámetro para la idoneidad de un sistema de ensayo por sí mismo, ya no es decisiva para la exactitud del sistema de ensayo.

En segundo lugar, tomando unas mediciones tempranamente durante un ensayo, aumenta la sensibilidad del sistema de ensayo. Por ejemplo, en unos sistemas de ensayo de inhibición microbiológica, la inhibición del crecimiento de los microorganismos se realiza a unas concentraciones del analito más bajas que después durante el ensayo, cuando comienza a disminuir el efecto inhibitorio de los analitos. Ventajosamente, dependiendo del tipo de analito, los resultados de los ensayos de inhibición microbiana se pueden obtener en unos cortos periodos de tiempo que hasta ahora no tienen precedentes, a saber dentro de 120 minutos, dentro de 90 minutos o incluso dentro de 60 o 30 minutos.

En tercer lugar, en vez de aumentar la sensibilidad por medición tempranamente durante un ensayo, el método del presente invento permite acelerar aun más los periodos de tiempo de análisis en sistemas de ensayo de inhibición microbiana por aumento de la cantidad de los microorganismos. Mientras que en los métodos de la técnica anterior, este enfoque conduciría a disminuir la sensibilidad, una medición en función del tiempo, como se realiza en el presente invento, hace posible contrarrestar la disminución en la sensibilidad por acortamiento de la duración del ensayo. Como un ejemplo, los sistemas de ensayo de inhibición microbiana de la técnica anterior emplean usualmente unas concentraciones de los microorganismos que fluctúan entre 10^4 y 10^9 CFU.ml⁻¹, mientras que en el presente invento estas concentraciones pueden ser aumentadas, sin ninguna pérdida de sensibilidad, en un múltiplo de desde dos veces hasta incluso de 1.000 veces. Por lo tanto unos sistemas de ensayo apropiados y rápidos se pueden conseguir usando unas concentraciones de microorganismos hasta de 10^9 , 5×10^9 , 10^{10} , 5×10^{10} , 10^{11} o incluso 10^{12} CFU.ml⁻¹, proporcionando unas duraciones de los ensayos que fluctúan entre 5 y 120 min, de manera preferible entre 30 y 100 min, de manera más preferible entre 45 y 90 min.

En cuarto lugar, el método del presente invento permite la fácil incorporación de más de un valor de umbral, por ejemplo con el fin de satisfacer múltiples requisitos (gubernamentales). Por ejemplo un valor de umbral puede ser asociado con la pendiente de una relación del valor de color en función del tiempo (es decir la segunda derivada) y similarmente múltiples valores de umbral pueden ser asociados con múltiples valores de la pendiente. Esto permite medir múltiples sensibilidades y/o múltiples analitos.

En una tercera forma de realización, se puede usar una disposición de detección que comprenda un procesador, una memoria, un presentador visual y un dispositivo de medición del color, estando dispuesta/os dicha memoria, dicho presentador visual y dicho dispositivo de medición del color para comunicarse con dicho procesador generando unas señales luminosas con dicho dispositivo de medición del color, enviando dichas señales luminosas a dicha muestra, recibiendo unas señales luminosas reflejadas de retorno procedentes de dicha muestra, convirtiendo dichas señales luminosas reflejadas en unas señales de colores y enviando dichas señales de colores a dicho procesador. Opcionalmente, dichas señales de colores son manipuladas con el fin de conseguir una mejor separación entre los componentes de colores que interesan.

Un ejemplo es la adaptación del parámetro de color que interesa por medio de una fórmula matemática, tal como por ejemplo las que se presentan en unos programas de manipulación fotográfica que son conocidos por una persona experta en la especialidad. Se ha mostrado que el uso de dichos programas de manipulación fotográfica da como resultado una marcada diferencia en los parámetros de colores, permitiendo de esta manera una discriminación más fácil entre diversas muestras. Este fenómeno da como resultado una interpretación más temprana del sistema de ensayo en cuestión, haciendo de esta manera al sistema de ensayo significativamente más rápido que los sistemas de ensayo de la técnica anterior.

Otro ejemplo de una forma matemática es el cálculo del valor de un parámetro compuesto con la ayuda de dicho procesador. Dicho parámetro puede ser un parámetro **Z** de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Z = \sum_{i=1}^n w_i \cdot x_i$$

en donde x_i es una señal de color i y w_i es un factor de ponderación correspondiente e i es un índice que varía entre 1 y n , y n es un número entero igual al número de señales de colores. Con el fin de establecer los cambios que se están haciendo en el ensayo, se puede realizar la siguiente secuencia de etapas:

- 1) medir el valor de **Z** para cada muestra y determinar el tiempo t_1 en el que dicho valor de **Z** es igual a un valor Z_1 y el tiempo t_2 en el que dicho valor de **Z** es igual a un valor Z_2 ;

- 2) calcular por medio de dicho procesador la diferencia Δt entre dicho tiempo t_1 y dicho tiempo t_2 de acuerdo con la fórmula $\Delta t = t_2 - t_1$.

Un apropiado modelo de color para su uso en el presente invento es el modelo $L*a*b$ y dicha ecuación es:

$$Z = w_1.L + w_2.a + w_3.b$$

Unos ejemplos típicos de apropiados valores de Z_1 y Z_2 están situados entre 30 y -30 con la condición de que Z_1 ha de ser mayor que o igual a Z_2 . Además, la anterior secuencia puede ser expandida calculando si Δt es mayor que Δt_{ref} y, si esta condición se cumple, asignando un resultado positivo del ensayo que indica que la concentración de dicho analito es más alta que una concentración A y, si esta condición no se cumple, asignando un resultado negativo del ensayo que indica que la concentración de dicho analito es más baja que una concentración B , en donde la concentración A es más pequeña que la concentración B .

En un ejemplo sumamente preferido, la disposición de detección del presente invento se usa de acuerdo con el esquema bosquejado en la Figura 4. El proceso de generar señales luminosas con el fin de obtener unos datos de ensayos se da con detalle en la leyenda para la Figura 4.

En una cuarta forma de realización, se pueden emplear múltiples muestras, una de las cuales puede comprender una muestra de referencia con una cantidad conocida (tal como una cantidad de umbral) del analito que se ha de detectar. Por lo tanto, por lo menos dos muestras de diferentes fluidos se ponen en contacto con un medio de ensayo que comprende un microorganismo de ensayo y un indicador, se incuban y se vigilan simultáneamente, y en donde el valor Z_1 es ajustado por dicho procesador para que sea igual al valor de Z más bajo de cualquiera de las muestras, con la condición de que dicho valor de Z más bajo ha de estar por lo menos un 10 % y no más de un 50 % por debajo del valor de Z más alto de cualquier muestra medida, y en donde el valor Z_2 es ajustado por el procesador para que sea igual al valor de Z más bajo de las muestras, con la condición de que dicho valor de Z más bajo ha de estar por lo menos un 90 % y no más de un 200 % por debajo del valor de Z más alto de cualquiera de las muestras medidas.

En una quinta forma de realización, se proporciona un método en el que el Z_1 antes mencionado es igual a Z_2 , y Z_t es el valor registrado de Z en el momento t , y cuyo método comprende además calcular por medio de dicho procesador unos parámetros de una expresión matemática que pone en relación a Z_t con t , comparar los valores de los parámetros con los de una muestra testigo en la que se conoce la concentración de dicho analito, y generar una señal que indica que la concentración de dicho analito en dicha muestra es más alta que o igual a o más baja que la concentración de dicho analito en la muestra testigo. Opcionalmente, los parámetros de una expresión matemática que pone en relación a Z_t con t en dicha muestra testigo son ajustados previamente en un programa de ordenador y/o son obtenibles por dicho procesador a partir de un procesador remoto por medio de una red.

En una sexta forma de realización, se proporciona un método para determinar la presencia o ausencia de un analito en un fluido por análisis de los datos de imágenes procedentes de un sistema de ensayo que genera un resultado de imagen en un medio de ensayo. Dichos resultados de imágenes se obtienen de una manera continua a intervalos regulares y se comparan con unos datos de referencia almacenados. Estos datos de referencia almacenados consisten p.ej. en unas curvas de cambio espectral de diversos analitos conocidos en diferentes concentraciones. Una comparación de los datos almacenados y obtenidos proporciona subsiguientemente una información adicional que concierne al tipo de analito y a la concentración de este analito en la muestra. Sorprendentemente, se ha encontrado que el método del presente invento tiene la ventaja adicional de que se pueden detectar simultáneamente tanto diversos tipos de analitos así como la concentración de los analitos en la muestra. Por lo tanto, midiendo unas curvas de cambio espectral de unos analitos conocidos y almacenando estas curvas en un procesador, los resultados de los ensayos específicos pueden ser acoplados con los datos almacenados usando un "método del mejor acoplamiento" y consiguientemente se pueden deducir el tipo y la concentración del analito. Usando el enfoque de esta forma de realización, se puede hacer una diferenciación entre dos o más diferentes tipos de analitos, tales como por ejemplo antibióticos de β -lactama y compuestos con el grupo sulfa, tal como, por ejemplo, entre penicilina y sulfadiazina.

Leyenda para las Figuras

La Figura 1 es una vista desde arriba de un ejemplo de la disposición de detección e incubación del presente invento. **A** es una sección que comprende un dispositivo **B** de medición del color, por ejemplo un escáner, unos medios **C** para mantener constante una temperatura o un perfil de temperaturas de la muestra, tales como un dispositivo de calentamiento que comprende unos sensores de la temperatura, y un dispositivo de comunicación **D**. **E** es un ordenador (personal), que comprende un dispositivo de comunicación **D**, un algoritmo **F** para la determinación del valor de Z , uno o más controladores **G** de la temperatura y un programa lógico software para comunicarse con el (los) usuario(s) y/o un equipo externo **H**.

La Figura 2 es un detalle de los medios **C** y **G** descritos en la Figura 1 que comprenden un generador **I** de puntos de ajuste de la temperatura, un controlador (por ejemplo PID) **J**, un elemento calentador **K**, una ménsula de ensayo **L** y un sensor **M** de la temperatura. Para aumentar la exactitud de la temperatura, los medios desde **J** hasta llegar a, e incluyendo a **M**, pueden ser construidos varias veces.

5 La Figura 3 es una vista desde arriba en sección transversal de un ejemplo de un dispositivo calentador y de una ménsula de ensayo como se describe en la Figura 2 que comprende un panel de vidrio **N**, un elemento calentador **O**, una ménsula **P**, un sistema de ensayo **Q**, un segundo calentador **R** y un material de aislamiento **S**.

La Figura 4 es una vista desde arriba de la secuencia de etapas que se han de llevar a cabo usando la disposición de detección e incubación del presente invento.

- 10 - En **T1**, después de cada medición, se describe la imagen procedente del dispositivo **B** de medición del color como un conjunto de píxeles. Cada píxel contiene tres señales de colores: Rojo, Verde y Azul (RGB, acrónimo de Red, Green, Blue). El color de un píxel puede ser expresado como una función de RGB pero se pueden usar además otros espacios de colores, por ejemplo Cian, Magenta, Amarillo y Clave (CMYK acrónimo de Cyan, Magenta, Yellow, Key), XYZ y Matiz, Saturación y Valor (HSV acrónimo de Hue, Saturation, Value). La situación exacta del sistema de ensayo se determina usando una tecnología que es bien conocida por una persona experta en la especialidad, por ejemplo tal como se ha descrito en el documento WO 2003/034341. A continuación, se toma una muestra representativa de una zona del sistema de ensayo y da como resultado una matriz de $n \times m$ píxeles (n y m están situados de manera preferible en el intervalo de 1-1.000, de manera más preferible entre 3 y 100, dependiendo del tamaño del sistema de ensayo; unos apropiados ejemplos de $n \times m$ son 20×40 , 100×100 , 60×40 , 20×20 , de manera sumamente preferible 9×9). Otras posibilidades de configuración para determinar una muestra representativa son la circular, la ovalada o un conjunto libre de píxeles. El resultado final de **T1** es un conjunto de píxeles para cada ensayo; cada conjunto contiene unos datos en RGB que representan la información del color y de la luminancia de los píxeles seleccionados.
- 15 - En **T2**, todos los datos de un ensayo son transferidos a una combinación representativa de información en RGB. Ejemplos de unos métodos apropiados son calcular la media o la mediana.
- 20 - En **T3**, dependiendo del dispositivo y del conjunto de medición óptica, se puede calibrar una información del color. Se pueden aplicar unos métodos de calibración ya conocidos, tales como los que usan unas tarjetas de referencia de colores. Un ciclo de calibración de como resultado un perfil de calibración (**Pr**) que es introducido en un algoritmo de corrección. En el actual ejemplo se usa un perfil de ICC (acrónimo de Intraclass Correlation Coefficient = coeficiente de correlación dentro de una clase). Se pueden usar además otros métodos de calibración. El resultado de **T3** es un conjunto de señales de colores corregidas en RGB para el sistema de ensayo que se ha de medir.
- 25 - En **T4**, el dato en RGB es convertido al espacio de color Lab usando unos métodos conocidos.
- 30 - **F** es el algoritmo mencionado dentro de la Figura 1 para calcular el valor de **Z**:

$$Z = w_1.L + w_2.a + w_3.b$$
- 35 - **T5** es una adaptación opcional de los valores de **Z** individuales de los sistemas de ensayo basándose en la posición del sistema de ensayo y en el valor de **Z**.
- 40 - Opcionalmente, en **T6**, para cada sistema de ensayo se pueden tomar y alisar sucesivas muestras, por ejemplo para excluir los valores situados más allá del límite y para la reducción del ruido. El alisamiento se puede conseguir por unos medios conocidos tales como mover el promedio o calcular la mediana a partir de un cierto número de muestras.
- 45 - Opcionalmente, en **T7**, con el fin de reducir aun más el ruido, un ajuste de curvas puede ser aplicado a consecutivas muestras. Ejemplos de curvas aplicables son las de los tipos polinómico, exponencial y logarítmico. Una curva preferida es una curva de un polinomio de segundo grado.
- 50 - Opcionalmente, en **T8**, con el fin de compensar unos posibles efectos desfavorables del sistema de ensayo, debidos por ejemplo a las condiciones de almacenamiento, se puede usar una etapa de normalización. Inicialmente, el valor de compensación **Zs** es 0, después de m mediciones el valor de corrección **Zs** puede ser calculado de la siguiente manera:

$$\sum_{i=1}^{60} \sum_{j=1}^{96} Z_{ij} / (60 * 96)$$

en donde **j** es el número de sistemas de ensayo, **i** es el número de muestras sobre las que la placa está normalizada. El índice **i** fluctúa entre 1 y 120, de manera preferible entre 10 y 90, de manera sumamente preferible entre 40 y 60 (el valor 60 es dado como un ejemplo en la fórmula).

55 - La función **T9** consiste en determinar cuando por lo menos el requerido número de sistemas de ensayo (**Nc**) muestra un resultado negativo (**Zr < Zth** y **Zth < Z de corte**). Tan pronto como se alcance este criterio, los resultados (positivos o negativos) de cada sistema de ensayo individual pueden ser determinados por **T10**.

- En T10, cuando se indica por T9 se pueden determinar los resultados finales **Zu** de cada sistema de ensayo **Zr**. El resultado es positivo si **Zr ≥ Z de corte** y negativo en otro caso distinto. Cuando se aplican dos diferentes valores de corte, se puede obtener además un resultado adicional indicado como dudoso.

5 La conversión de los valores en RGB a Lab y Z incluyendo el tratamiento final para dar el resultado final **Zu**, no se limita a la secuencia que más arriba se ha descrito. Una forma alternativa los valores e n RGB o Lab puede ser usada directamente para determinar el resultado final.

10 La Figura 5 muestra las diferencias en los perfiles de colores (expresados como valor de **Z**, en el eje de las **y**) para penicilina G (5A, panel izquierdo) y sulfadiazina (5B, panel derecho) como una función de la duración del ensayo (eje de las **x**, en minutos). Las curvas en la Figura 5A se refieren a unas muestras que contienen, partiendo del gráfico más bajo hasta el gráfico más alto, 0, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2, 1,6, 2, 2,4, 2,8 y 3,2 ppb (partes por mil millones) de penicilina G. Las curvas en la Figura 5B se refieren a unas muestras que contienen, partiendo del gráfico más bajo hasta el gráfico más alto, 0, 20, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 200, 300 y 400 ppb de sulfadiazina. Se usó la siguiente ecuación: $Z = 0,35.a - 0,65.b$.

15 Las Figuras 6-12 muestran las diferencias en los perfiles de colores (expresados como valor de **Z**, en el eje de las **y**) para los siete antibióticos que se mencionan en la tabla siguiente. El valor de **Z** se muestra como una función de la duración del ensayo (eje de las **x**, en minutos). Las curvas en estas Figuras se refieren a unas muestras que contienen los antibióticos en concentraciones crecientes (en ppb, véase la tabla). Tal como se bosqueja en la descripción detallada, se usó la siguiente ecuación: $Z = 0,35.a - 0,65.b$.

Número de la figura	Antibiótico	Símbolo del gráfico (concentración en ppb)					
		●	○	X	◆	■	▲
6	Penicilina G	0	1	2	3	4	
7	Sulfadiazina	0	25	50	100	150	200
8	Amoxicilina	0	2	3	4	5	
9	Ceftiofur	0	50	100	150	250	
10	Cloxacilina	0	15	30	60	120	
11	Oxitetraciclina	0	100	200	300	400	
12	Eritromicina	0	25	50	100	250	

20

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Determinación de los valores de colores de un sistema de ensayo de inhibición microbiana comercialmente disponible para dos diferentes antibióticos

25

30 Usando la tecnología de escrutinio que se bosqueja en el segundo aspecto del invento, se determinaron los valores de colores en un sistema de ensayo de inhibición microbiana comercialmente disponible (DSM DelvoTest®) para una gama de concentraciones de penicilina G y sulfadiazina usando la función compuesta $Z = w_L.L + w_a.a + w_b.b$. Las muestras se mantuvieron a 64°C usando una placa de vidrio revestido con dióxido de titanio (obtenida de Mansolar, www.mansolar.nl), que esta equipada con un sensor de la temperatura, que está conectado con un procesador y con dos electrodos. Los electrodos se conectaron a una fuente de suministro de energía de 12 V que fue impulsada por el procesador. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 5, que muestra que las curvas para la penicilina G y la sulfadiazina difieren sustancialmente en su configuración. Relacionando estas configuraciones con unas curvas almacenadas en la memoria del procesador, se pueden distinguir diversos analitos (en el presente caso penicilina G frente a sulfadiazina). A continuación de esto, la Figura 5 describe también, por ejemplo para sulfadiazina, que una diferencia entre una muestra con 0 ppb y una muestra con 20 ppb se puede observar ya después de 110 min, mientras que los métodos de la técnica anterior hubieran necesitado por lo menos 150 min cuando una muestra exenta de analito llega a la región de Z = desde -5 hasta -10 (en donde el color cambia a amarillo).

40

Ejemplo 2

Determinación de los valores de colores de un sistema de ensayo de inhibición microbiana comercialmente disponible usando unos programas de manipulación fotográfica

45

Usando la tecnología de escrutinio que se bosqueja en el segundo aspecto del invento, se determinaron los valores de colores en un sistema de ensayo de inhibición microbiana comercialmente disponible (DSM DelvoTest®), para una gama de concentraciones de penicilina G, sulfadiazina y oxitetraciclina por un análisis que usa unos Elementos de Adobe como el programa de manipulación fotográfica, del siguiente modo. La imagen obtenida a partir del

escáner se almacenó como un archivo .jpg y se abrió en Elementos de Adobe. Usando el marcador de punto oscuro se asignó un ensayo positivo y usando el marcador de punto claro se asignó un ensayo negativo. Subsiguientemente, el valor del matiz se ajustó a un valor más alto que 0 (de manera preferible a 10-30) y la saturación se ajustó también a un valor más alto que 0 (de manera preferible a 100). Seguidamente se determinaron los valores de colores usando la fórmula $Z = 0,35.a - 0,65.b$. A partir de la tabla siguiente queda claro que, usando el programa de manipulación fotográfica, se podría conseguir una duración del ensayo de 45 min con unas sensibilidades de 3 ppb de penicilina G, de 200 ppb de sulfadiazina y de 200 ppb de oxitetraciclina.

Usando la manipulación fotográfica	Duración del ensayo (min)	Penicilina G (ppb)	Sulfadiazina (ppb)	Oxitetraciclina (ppb)
No	52	> 6	> 300	> 500
Si	45	3	200	200

Ejemplo 3

Determinación de los valores de colores de un sistema de ensayo de inhibición microbiana comercialmente disponible para dos diferentes antibióticos

Usando la tecnología de exploración (mostrada en las Figuras 1-3) y bosquejada en el segundo aspecto del invento, se determinaron los valores de colores en un sistema de ensayo de inhibición microbiana comercialmente disponible, DSM DelvoTest®, para una gama de concentraciones de penicilina G, sulfadiazina, ceftiofur, amoxicilina, cloxacilina, oxitetraciclina y eritromicina usando la función compuesta $Z = w_L.L + w_a.a + w_b.b$.

Antibiótico	Ejemplo de Sensibilidad 3 (en ppb, después de 105 min)	Sensibilidad de DelvoTest® SP-NT (en ppb, después de 150 min)
Penicilina G	2	1-2
Sulfadiazina	50	25-50
Amoxicilina	3	2-3
Ceftiofur	100	25-50
Cloxacilina	15	20
Oxitetraciclina	200	250-500
Eritromicina	100	40-80

Las muestras se mantuvieron a 64°C usando una placa con agujeros. Las pistas de calor son divididas sobre la placa, lo que permite generar una entrada de calor específica relacionada con la posición, para unos gradientes homogéneos de temperaturas. Con el fin de aumentar la exactitud del gradiente de temperaturas sobre la placa, se usaron unos sensores y unos controladores de la temperatura para ajustar la entrada de corriente eléctrica. La temperatura se controló por medio de un PID. Para aumentar la velocidad de detección y la reproducibilidad, el dispositivo de calentamiento fue calentado previamente a una temperatura de 80°C. Los resultados de estos experimentos se muestran en las Figuras 6-12 y en la tabla anterior, mostrando que para dichos antibióticos los límites de detección requeridos son obtenibles en el transcurso de 105 minutos, mientras que los métodos de la técnica anterior, tales como el DelvoTest® SP-NT, hubieran necesitado por lo menos 150 min, cuando una muestra exenta de analito llega a la región de $Z =$ desde -5 hasta -12 (donde el color cambia a amarillo)

REIVINDICACIONES

1. Disposición de detección para detectar la presencia de un analito en una muestra, comprendiendo la disposición de detección:
 5 a) un procesador,
 b) una memoria,
 c) un presentador visual,
 d) un dispositivo de medición del color, y
 e) una incubadora que comprende un dispositivo de calentamiento y una abertura para sostener una muestra, en donde el dispositivo de calentamiento está colocado dentro del dispositivo de medición del color,
 10 en donde la memoria, el presentador visual y el dispositivo de medición del color están dispuesta/os para comunicarse con el procesador, el dispositivo de medición del color está dispuesto para generar unas señales luminosas, enviar dichas señales luminosas a dicha muestra, recibir unas señales luminosas de retorno procedentes de la muestra, convertir las señales luminosas de retorno en unas señales de colores y enviar las señales de colores al procesador, el procesador se hace funcionar mediante unas instrucciones almacenadas en la memoria y el procesador está configurado para realizar las etapas **d** del método de la reivindicación 4.
 15

2. Disposición de detección de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que la muestra está presente en un recipiente del que por lo menos el fondo es transparente.

3. Disposición de detección de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, caracterizada por que el dispositivo de medición del color es un escáner o una cámara digital.

20 4. Un método para determinar la presencia o ausencia de un analito en un fluido por análisis de unos datos de imágenes procedentes de un sistema de ensayo que genera un resultado de imagen en un medio de ensayo, comprendiendo el método las etapas de:
 (a) incubar una muestra del fluido conjuntamente con el sistema de ensayo a una temperatura o un perfil de temperaturas que se ha ajustado previamente,
 25 (b) obtener el resultado de imagen sobre el medio de ensayo,
 (c) reproducir en imágenes el resultado de imagen con un dispositivo de adquisición de imágenes con el fin de generar unos datos de imágenes digitales que corresponden al resultado de imagen,
 (d) usar unos medios de tratamiento de datos, que calculan para cada sistema de ensayo un valor de un parámetro compuesto **Z** basado en los datos de imágenes digitales de acuerdo con la ecuación:

$$Z = \sum_{i=1}^n w_i \cdot x_i$$

30 en donde x_i es una señal de color i y w_i es un factor de ponderación correspondiente e i es un índice que varía entre 1 y n , y n es un número entero igual al número de señales de colores, caracterizado por que la etapa **a** se lleva a cabo simultáneamente con las etapas **b** y **c**, y tan pronto como el requerido número de sistemas de ensayo (**Nc**) tiene un valor de **Z** (**Zr**) más bajo que un valor de **Z** previamente determinado (**Zth**), se determina la presencia o ausencia de un analito en una muestra determinando en cada sistema de ensayo individual si el valor de **Z** del sistema de ensayo (**Zs**) es más alto, igual o más bajo que un valor de **Z** de umbral (**Z de corte**) o un valor de **Z** de una muestra de referencia con una cantidad conocida del analito que se ha detectar.
 35

40 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado por que la temperatura o el perfil de temperaturas que se ha ajustado previamente se mantiene por una incubadora que comprende un dispositivo de calentamiento y una abertura para sostener una muestra.

6. Un método de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5, en el que se obtienen múltiples imágenes de un modo continuo o a intervalos regulares en el tiempo.

45 7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 hasta 6, que comprende además una manipulación fotográfica.

8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 hasta 7, en donde se realizan las siguientes etapas:
 a) medir el valor de un parámetro compuesto **Z** para cada muestra y determinar el tiempo t_1 en el que dicho valor de **Z** es igual a un valor Z_1 y el tiempo t_2 en el que dicho valor de **Z** es igual a un valor Z_2 ;
 50 b) calcular por medio de dicho procesador la diferencia Δt entre dicho tiempo t_1 y dicho tiempo t_2 de acuerdo con la fórmula $\Delta t = t_2 - t_1$.

ES 2 443 341 T3

9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 hasta 8, caracterizado por que el resultado del ensayo es proporcionado en menos de 120 minutos.
10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 hasta 9, caracterizado por que el medio de ensayo comprende un agente de gelificación, un indicador y un microorganismo.
- 5 11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado por que el medio de ensayo comprende además uno/a o más tampones, estabilizadores, sustancias que cambian la sensibilidad para ciertos analitos de un modo positivo o negativo y/o agentes aumentadores de la viscosidad.
12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 hasta 11, caracterizado por que la temperatura en la etapa a) fluctúa entre 63 y 66°C.
- 10 13. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 hasta 12, caracterizado por que el medio de ensayo está contenido en un tubo, una placa de microtitulación o una cubeta de Petri.

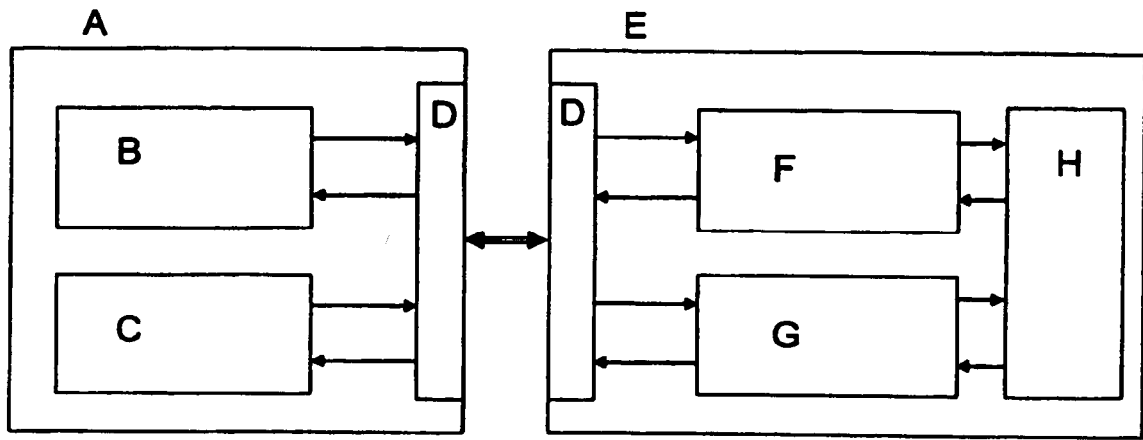


Figura 1

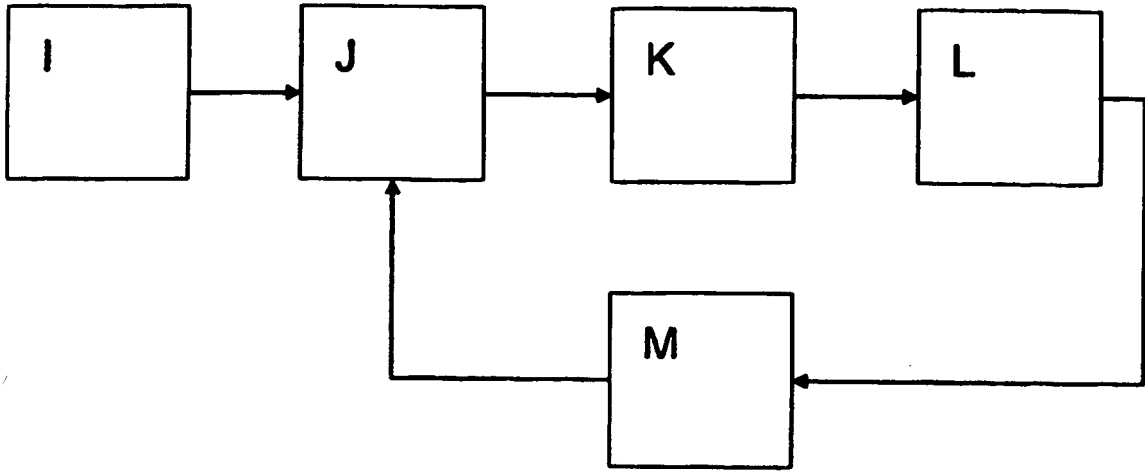


Figura 2

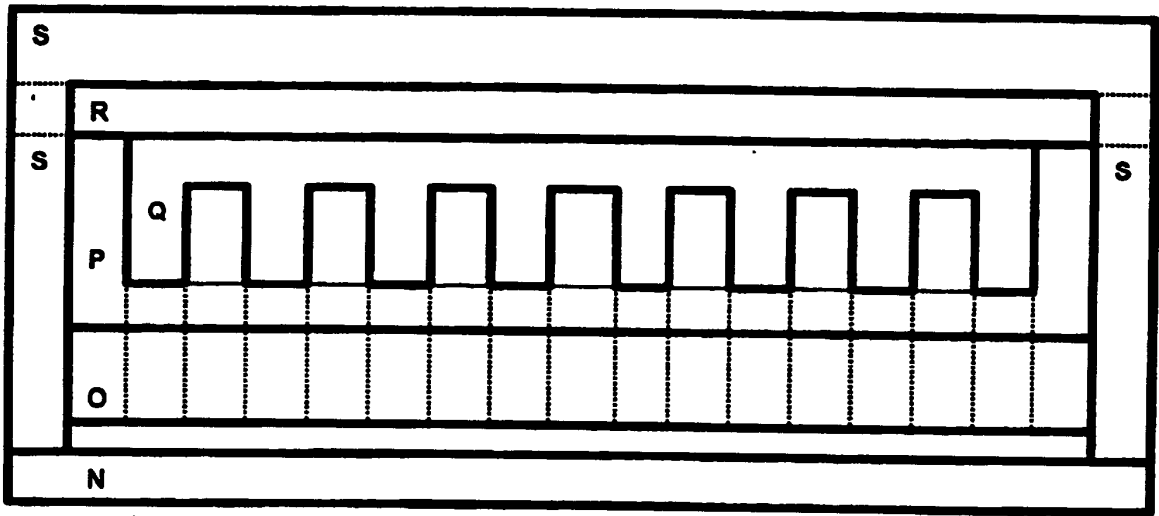


Figura 3

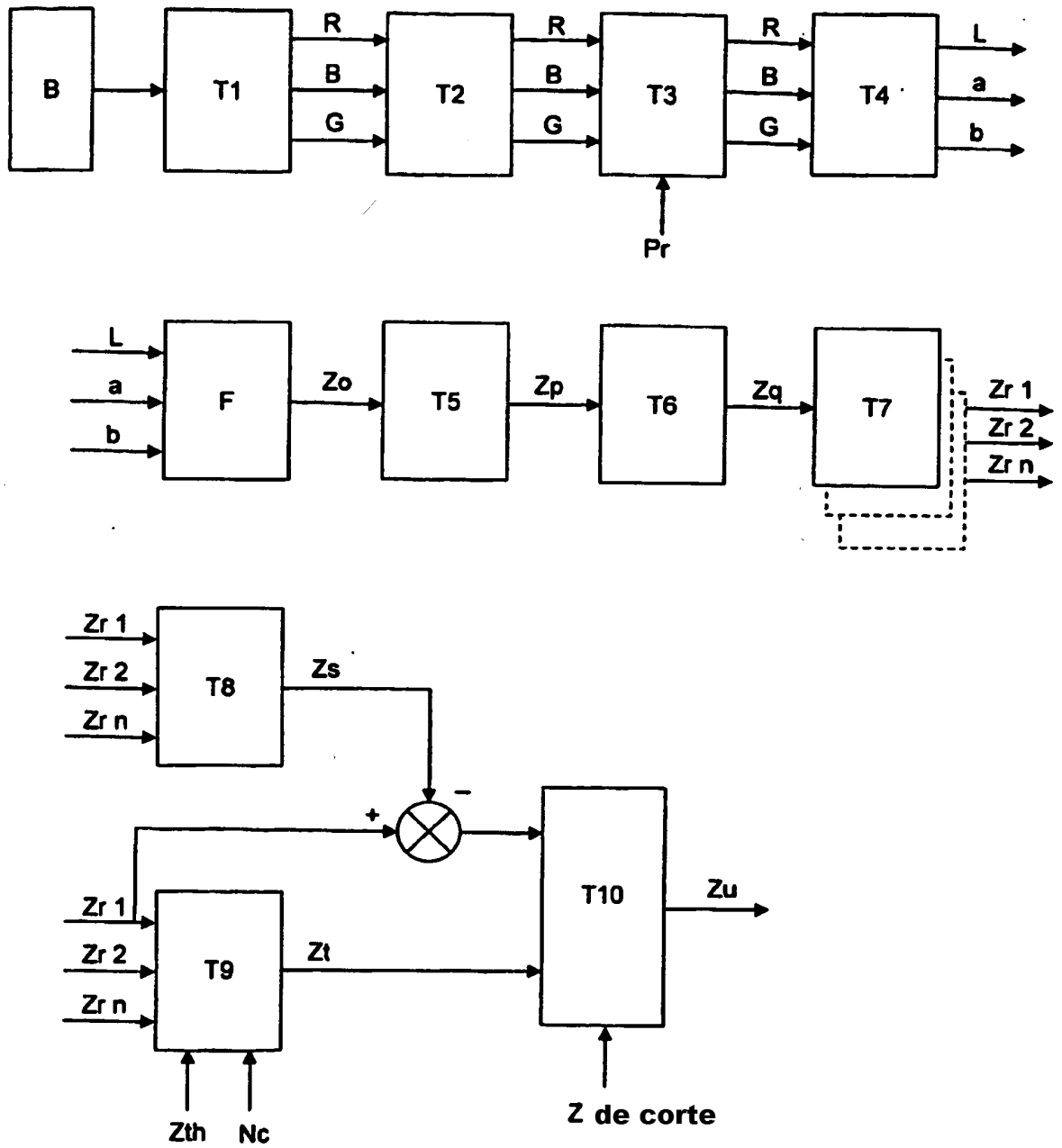


Figura 4

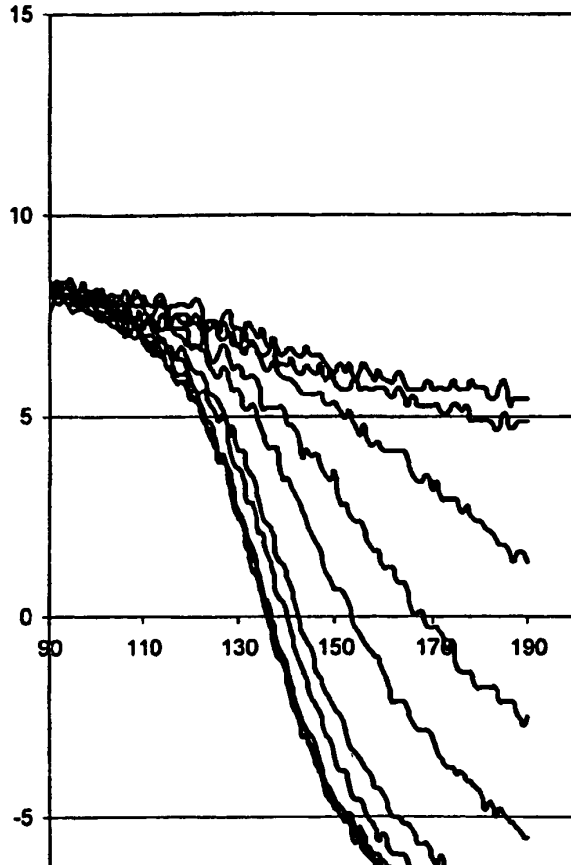


Figura 5A

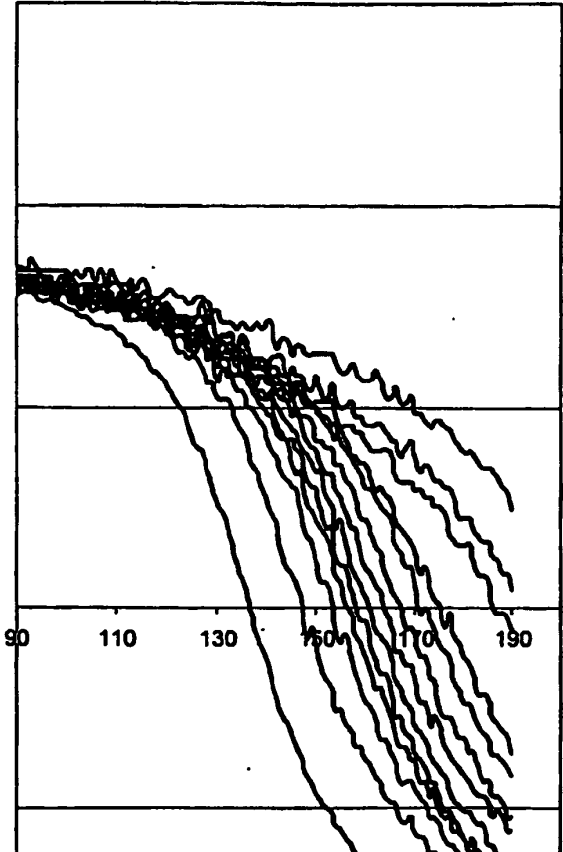


Figura 5B

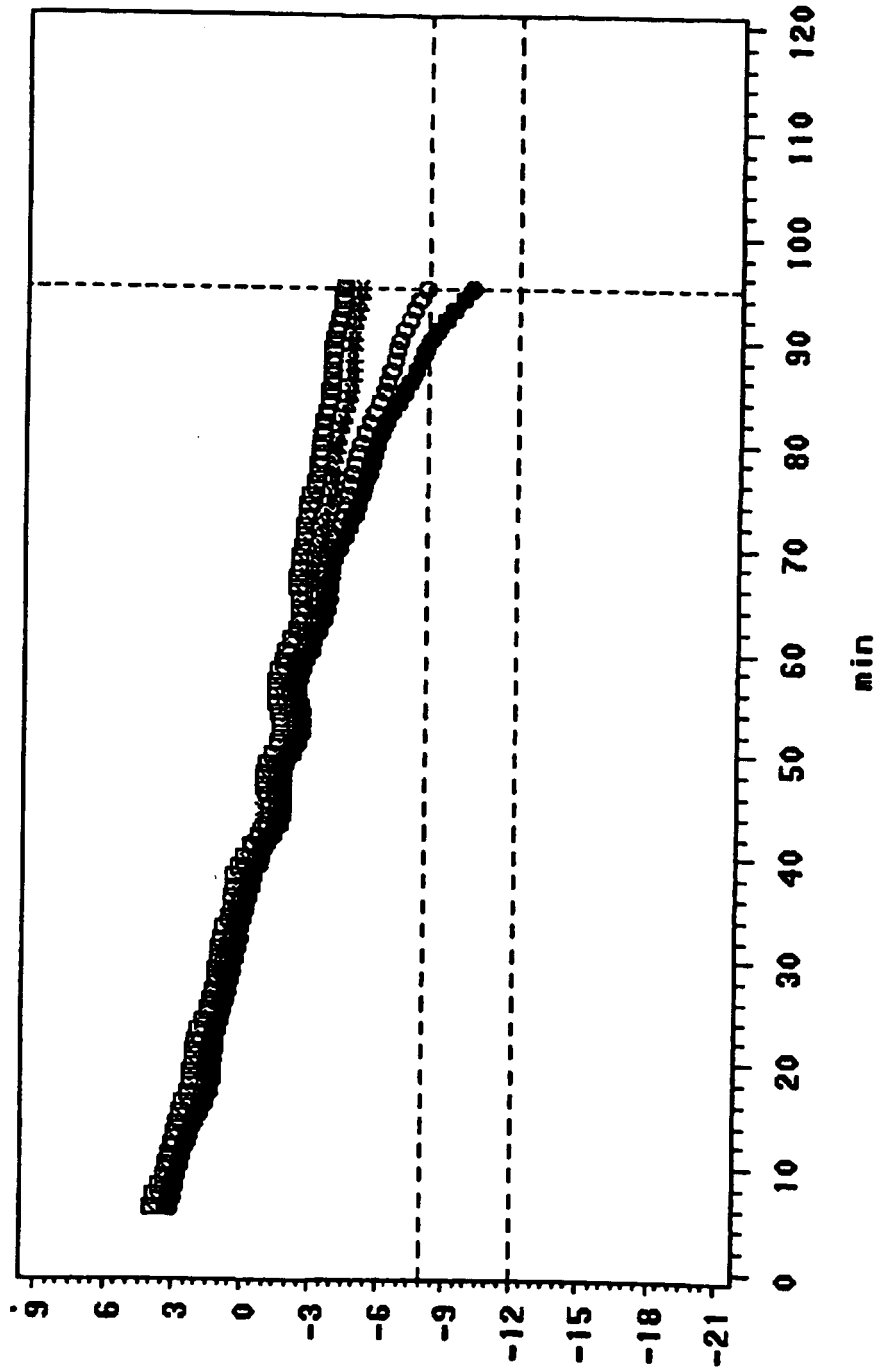


Figura 6

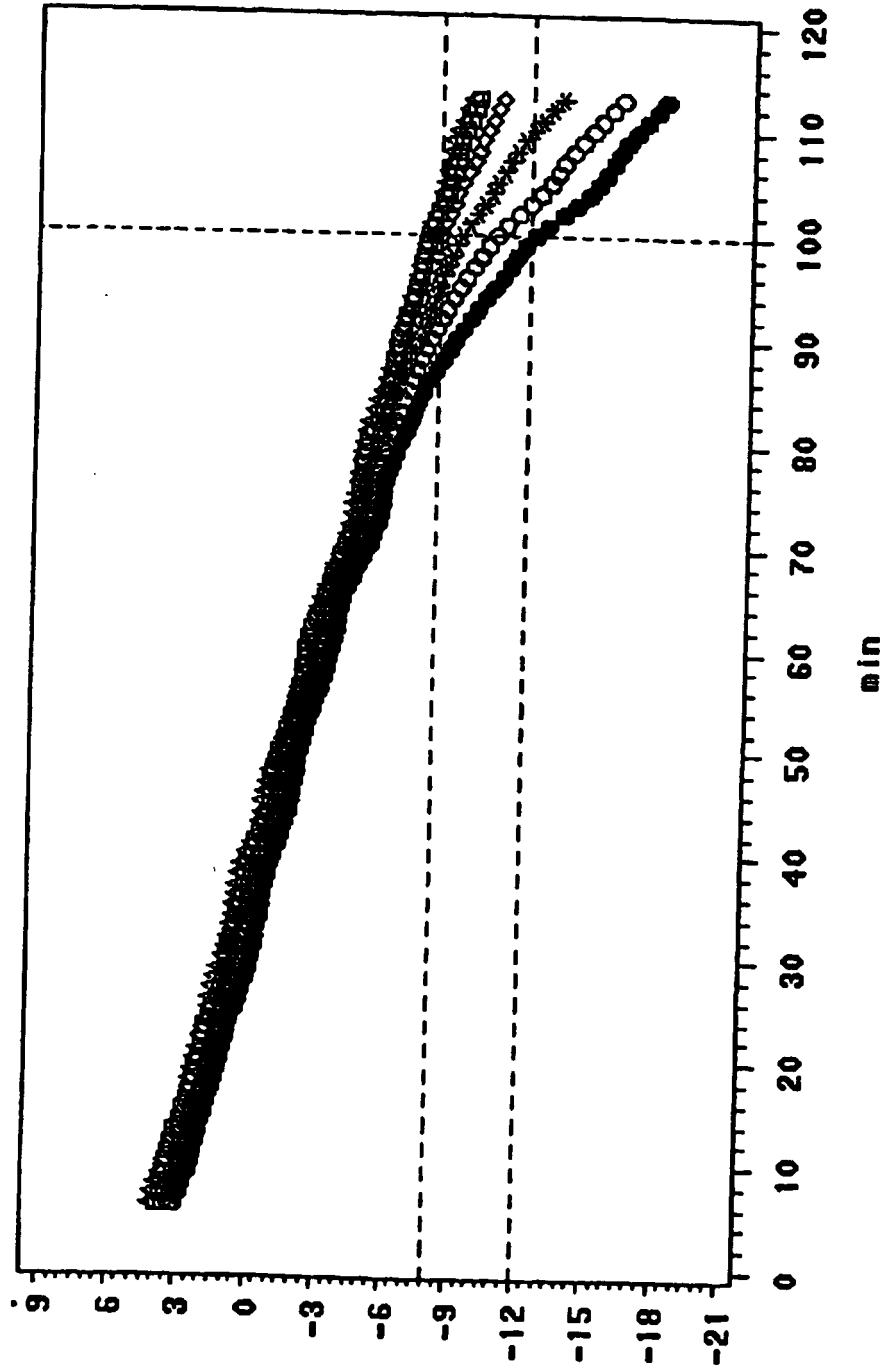


Figura 7

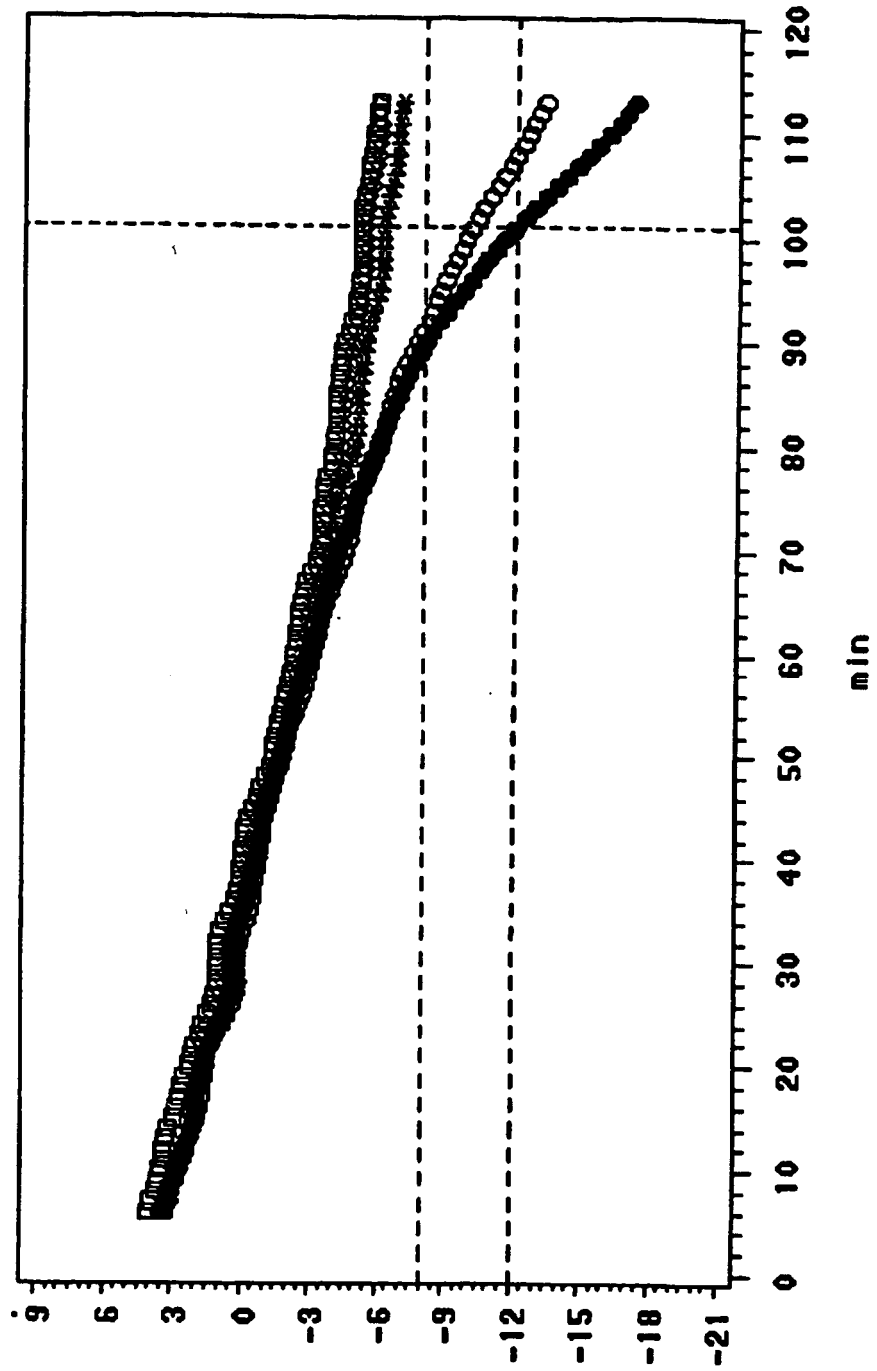


Figura 8

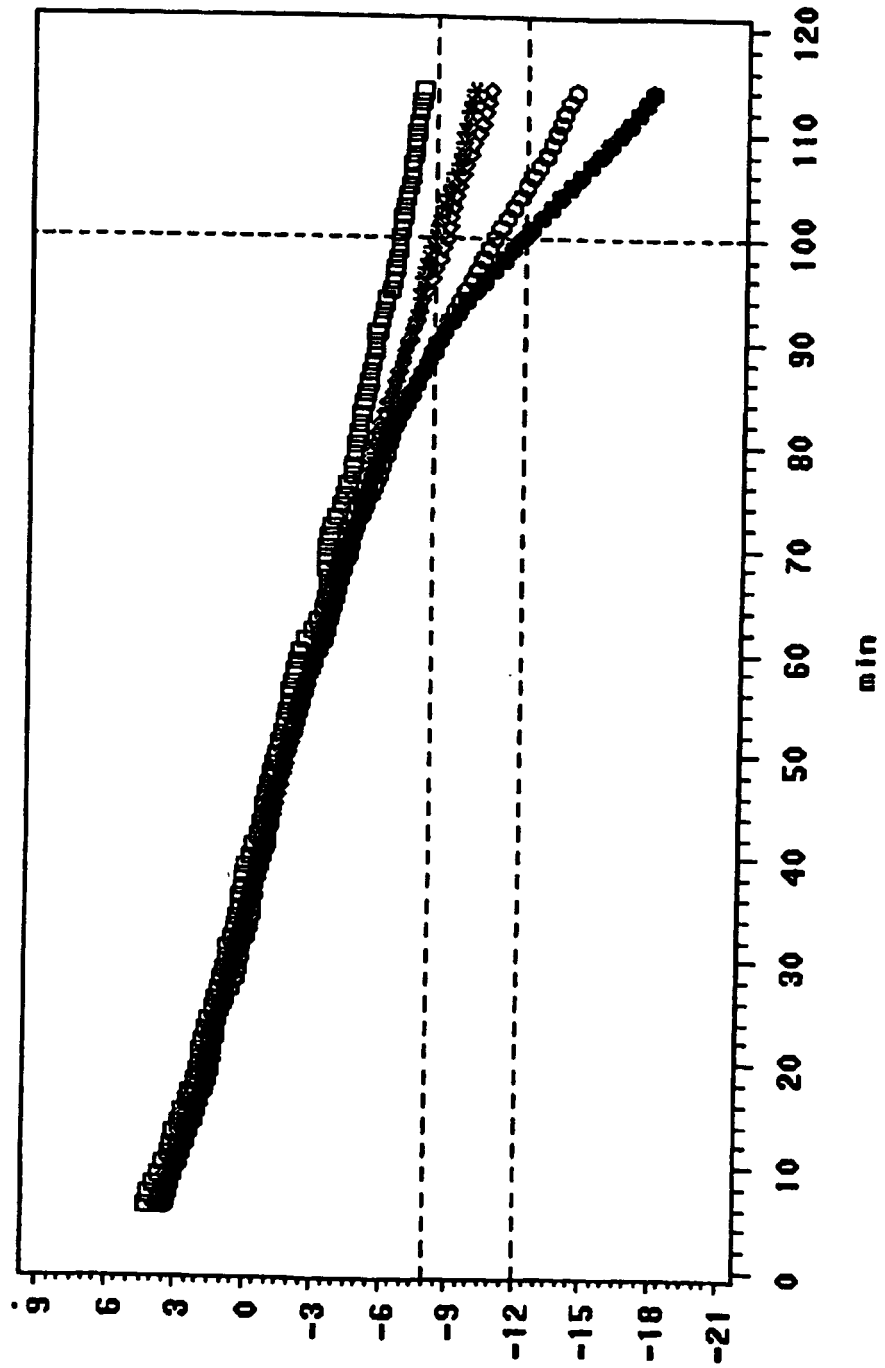


Figura 9

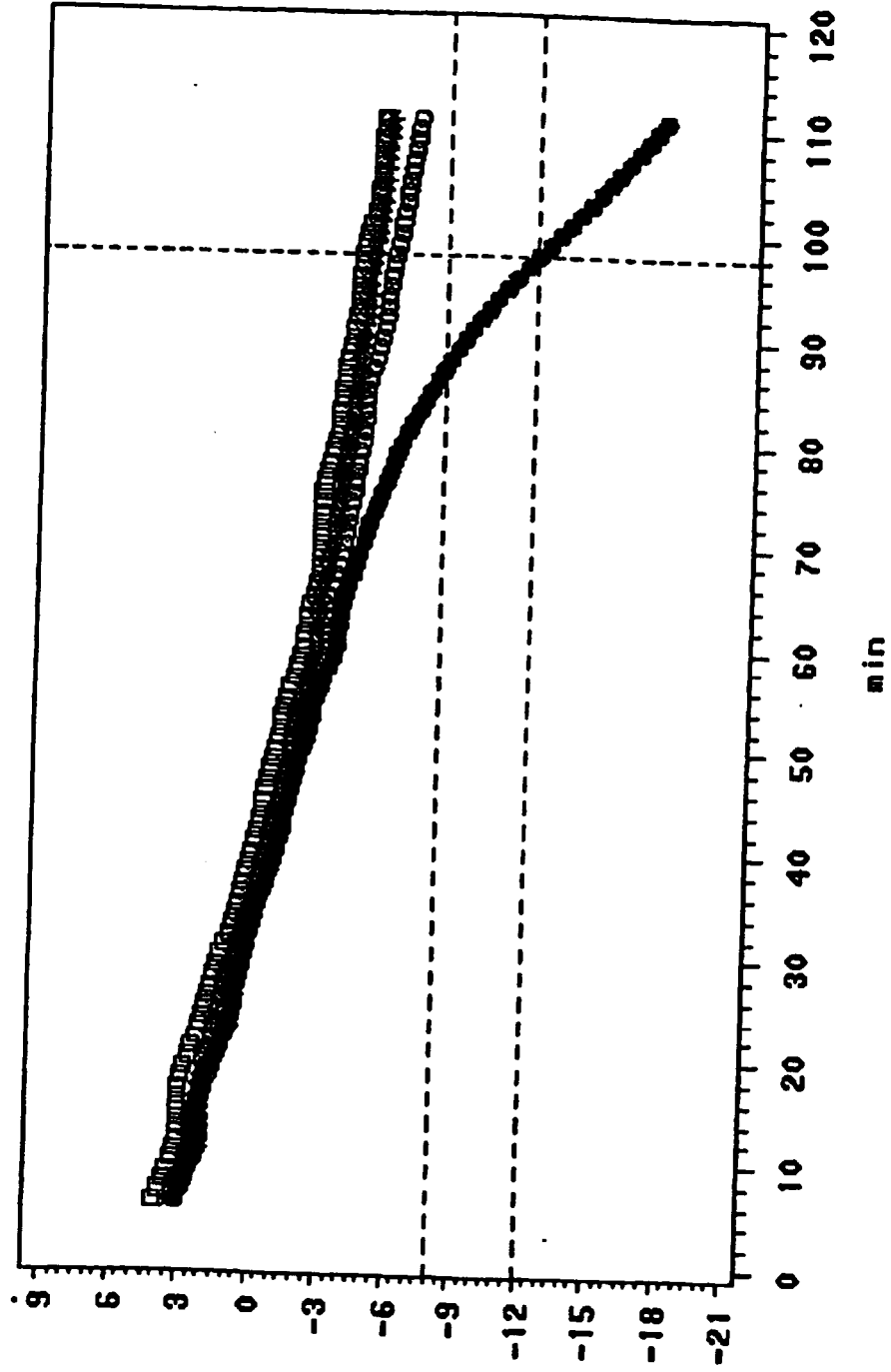


Figura 10

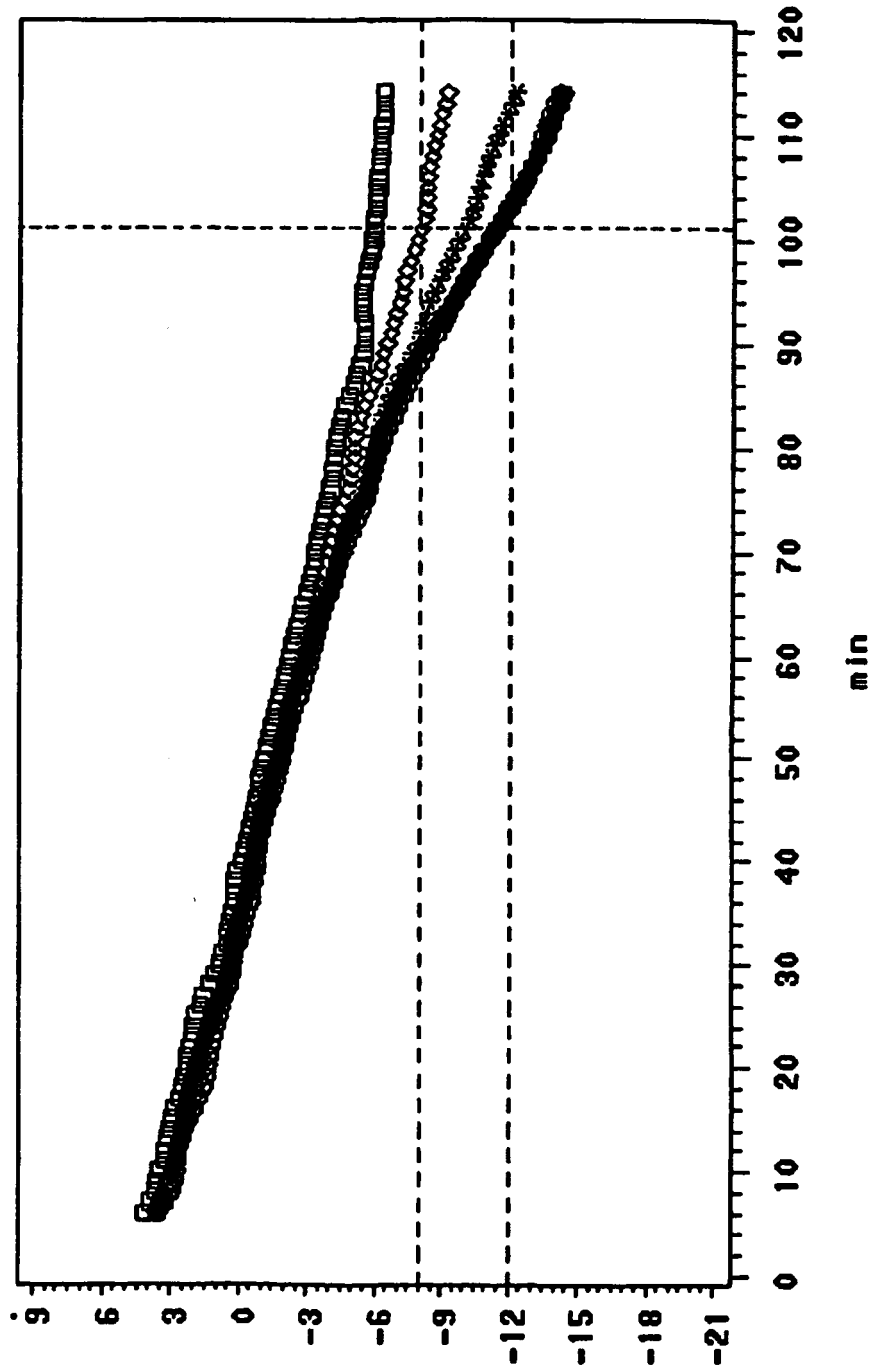


Figura 11

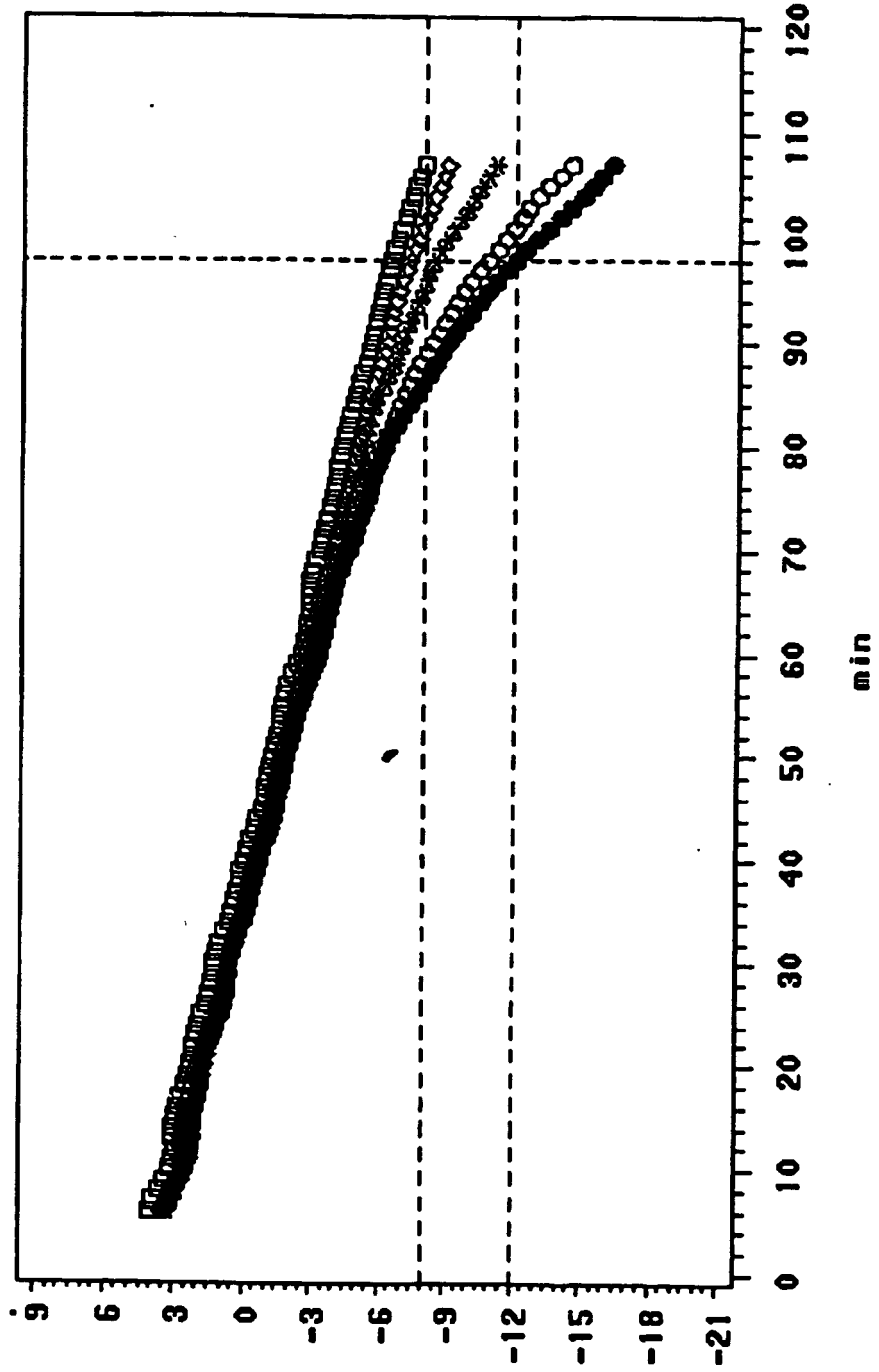


Figura 12