

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 783**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2008 E 08779567 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2250281**

54 Título: **Sistemas y métodos para la identificación presuntiva de tipos de microorganismos en un cultivo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.07.2015

73 Titular/es:

**BECTON DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
One Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417-1880, US**

72 Inventor/es:

BEATY, PATRICK SHAWN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 541 783 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

Sistemas y métodos para la identificación presuntiva de tipos de microorganismos en un cultivo

1 Campo de la invención

Se describen sistemas y métodos mejorados para la identificación de un tipo de microorganismo en un cultivo.

5 2 Antecedentes de la invención

La detección rápida y fiable de microorganismos en un cultivo, tal como un cultivo de sangre, es una de las funciones más importantes del laboratorio de microbiología clínica. Actualmente, la presencia de agentes biológicamente activos, tales como bacterias en el fluido corporal de un paciente, y especialmente en la sangre, se determina utilizando viales de cultivo. Una pequeña cantidad de fluido corporal del paciente se inyecta a través de un septo de goma de cerramiento a un vial estéril que contiene un medio de cultivo y el vial se incuba a continuación y se controla el crecimiento de microorganismos.

La inspección visual común del vial de cultivo implica en ese caso el control de la turbidez o la observación de eventuales cambios de color de la suspensión líquida dentro del vial. También se pueden utilizar métodos con aparatos conocidos para detectar cambios en el contenido de dióxido de carbono de los recipientes de cultivo, que es un subproducto metabólico del crecimiento bacteriano. El control del contenido de dióxido de carbono se puede lograr por medio de métodos bien establecidos en la técnica.

En algunos casos, se utiliza un aparato de detección de microorganismos de infrarrojos no invasivo en el que se utilizan viales especiales que tiene ventanas de transmisión de infrarrojos. En algunos casos, los viales de vidrio son transferidos a un espectrómetro infrarrojo mediante un brazo manipulador automatizado y se miden a través del vial de vidrio. En algunos casos, se disponen sensores químicos en el interior del vial. Estos sensores responden a cambios en la concentración de dióxido de carbono en la fase líquida cambiando su color o cambiando su intensidad de fluorescencia. Estas técnicas se basan en mediciones de la intensidad de luz y requieren filtrado espectral en las señales de excitación y/o emisión.

Como se desprende de lo anterior, están disponibles varios sistemas de cultivo y enfoques diferentes para los laboratorios. Por ejemplo, los sistemas radiométricos y no radiométricos BACTEC[®] (Becton Dickenson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Maryland) se utilizan a menudo para esta tarea. El aparato BACTEC[®] 9240, por ejemplo, tiene capacidad para 240 recipientes de cultivo y sirve como incubadora, agitador, y sistema de detección. Cada recipiente contiene un sensor de CO₂ fluorescente, y los sensores se supervisan de forma continua (p. ej., cada diez minutos). Los cultivos son reconocidos como positivos por algoritmos informáticos para la detección de crecimiento basándose en un ritmo creciente del cambio, así como aumento sostenido de producción de CO₂ más que por el uso del umbral del índice de crecimiento o de valores delta. El BACTEC[®] 9240 es completamente automático una vez que se han cargado los recipientes.

Un inconveniente con estos enfoques de detección de microorganismos es que no siempre se detecta el tipo de microorganismo en dichos cultivos. Lo que se necesita en cada uno de los sistemas anteriormente identificados es una forma para determinar no invasiva y automáticamente qué tipo de microorganismo está en un cultivo.

La Publicación de Patente de los Estados Unidos Núm. 2002/0155424 de Pitner et al. describe un método de identificación/tipificación de microorganismos que emplea un procedimiento de normalización. En Pitner *et al.* la fluorescencia sirve como detector de oxígeno, con una disminución de la fluorescencia asociada con un aumento de oxígeno.

La Patente Europea Núm. 0697460 describe el uso de una fuente de luz de intensidad modulada para iluminar los materiales sensores químicos. El componente de fluorescencia se divide en sus componentes de alta frecuencia y DC. La razón de estos componentes se utiliza para medir la respuesta de los materiales de los sensores a diferentes parámetros químicos.

3 Compendio de la invención

Para satisfacer las necesidades identificadas en la técnica anterior, se proporcionan sistemas, métodos y aparato para la identificación presuntiva de organismos de cualquier sistema de cultivo diseñado para el cultivo de una muestra de la presencia de microorganismos de un tipo desconocido, con el uso previsto de determinar la presencia o la presencia y la identificación del tipo de microorganismo.

Ventajosamente, utilizando los sistemas, métodos y aparato de la presente invención novedosos, se puede programar un sistema de incubación, tal como el sistema de cultivo de sangre BACTEC[®], para determinar el tipo de microorganismo en un cultivo antes de llevar a cabo los ensayos manuales, tales como una tinción de Gram o un subcultivo. De hecho, en algunos casos, los sistemas, métodos y aparato novedosos de la presente invención pueden obviar cualquier necesidad de realizar una prueba Gram o un subcultivo con el fin de identificar el tipo de microorganismo que está infectando un cultivo.

En resumen, se utilizan parámetros novedosos descritos en la presente memoria, tales como una tasa metabólica máxima y un grado de crecimiento, para determinar el tipo de microorganismos que está infectando un cultivo. Se ha descubierto inesperadamente que cada tipo de microorganismo (p. ej., cada especie de microorganismo) adopta valores únicos para estos parámetros novedosos. Basándose en este descubrimiento inesperado, el tipo de microorganismo que infecta una muestra biológica puede ser determinado directamente mediante una incubadora automática antes de llevar a cabo los ensayos manuales, tal como una tinción de Gram o un subcultivo, por un técnico de laboratorio. De hecho, en algunos casos ya no son necesarios tales ensayos manuales para determinar el tipo de microorganismo que infecta un cultivo.

En la presente invención, se calculan los valores para los parámetros novedosos descritos en la presente memoria de cada muestra biológica que ha sido infectada por un microorganismo de tipo conocido y se utilizan para rellenar una tabla de consulta opcional o para entrenar a un clasificador u otra forma de ecuación que se pueda utilizar para determinar la identidad de los tipos de microorganismos. Típicamente, la tabla de consulta se construye utilizando microorganismos de especies conocidas. Los valores de cada uno de los tipos de microorganismos (p. ej., especies de microorganismos) que potencialmente podrían infectar una muestra biológica desconocida se calculan y se utilizan para rellenar la tabla de consulta. Ventajosamente, debido a los parámetros novedosos, tales como una tasa metabólica máxima y un grado de crecimiento, se calculan utilizando parámetros observables que ya se registran en laboratorios convencionales que trabajan con muestras biológicas, tal tabla de consulta puede ser montada sin ningún requisito para el funcionamiento de experimentos adicionales. Por ejemplo, en muchos laboratorios, a lo largo del tiempo, se identifican varias muestras infectadas utilizando tinciones Gram y/o subcultivos convencionales. Además, en tales laboratorios, los datos de la curva de crecimiento que rastrea el metabolismo como una función del tiempo han sido registrados para tales muestras. De hecho, son a menudo tales datos de la curva de crecimiento los que conducen a la determinación de que tales muestras fueron infectadas por microorganismos. Para estas muestras infectadas, los parámetros novedosos se pueden calcular a partir de los datos de la curva de crecimiento, emparejar con el tipo de microorganismo de las tinciones Gram y/o subcultivos, y utilizar para rellenar una tabla de consulta. A continuación, se puede determinar el tipo de microorganismo que infecta un nuevo cultivo (uno desconocido) mediante el cálculo de los valores de los parámetros novedosos para el nuevo cultivo y, por ejemplo, comparándolos con los valores de la tabla de consulta para un tipo de microorganismo dado.

Si bien se proporcionan numerosos valores ilustrativos para los parámetros novedosos descritos en la presente memoria en los datos presentados en la presente memoria para muchos tipos de microorganismos diferentes para un medio dado, se debe apreciar que estos valores para los parámetros novedosos para cualquier tipo de microorganismo dado pueden cambiar cuando se altera el medio utilizado para apoyar el crecimiento del cultivo. Por lo tanto, para cualquier tabla de consulta dada, se debe tener cuidado de asegurarse de que el medio biológico utilizado para determinar la curva de crecimiento del cultivo desconocido sea el mismo o similar al medio biológico utilizado para determinar la curva de crecimiento de las muestras conocidas utilizadas para poblar la tabla de consulta. Además, es posible que los valores de los parámetros novedosos puedan variar cuando se use una incubadora diferente. Por lo tanto, preferentemente, también se usa la misma incubadora utilizada para generar datos usados para rellenar la tabla de consulta para el cultivo desconocido. Por otra parte, se pueden construir varias tablas de consulta diferentes, donde cada tabla de consulta es para un tipo de medio y/o incubadora diferentes.

En la presente memoria se describen valores ilustrativos para los parámetros novedosos, tales como la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento, a partir de varios tipos de microorganismos diferentes para un medio de crecimiento dado. Los datos muestran que cada tipo de microorganismo tiene un valor único y característico diferente para los parámetros novedosos descritos en la presente memoria. Por otra parte, los valores de los parámetros novedosos se calculan a partir de los datos de crecimiento que se registraron anteriormente para las muestras y por lo tanto no se requiere experimentación adicional para calcular los valores presentados en la presente memoria. Como se mencionó anteriormente, los valores descritos en la presente memoria para los parámetros novedosos pueden desplazarse cuando se utilizan medios diferentes. Sin embargo, como demuestran claramente los datos descritos en la presente memoria, para un medio dado, los valores para los parámetros novedosos serán diferentes para cada tipo de microorganismo y por lo tanto pueden ser usados como una base para identificar el tipo de microorganismo en una muestra desconocida que se había identificado presuntivamente que estaba infectada con un tipo de microorganismo. Como tales, los sistemas y métodos de la presente invención pueden proporcionar varias aplicaciones útiles en microbiología y campos relacionados, y encuentran una aplicación concreta en los procedimientos de ensayos de esterilidad en cultivo celular.

En un aspecto, la presente invención utiliza las diferencias en la tasa de crecimiento y el grado de crecimiento para proporcionar información sobre el tipo de microorganismo presente y el crecimiento en un cultivo que puede dar como resultado o contribuir a la identificación del tipo de microorganismo. Este aspecto de la presente invención utiliza una transformación de datos que se puede aplicar a datos metabólicos o de crecimiento celular de una manera que proporcione valores para parámetros para el tipo de microorganismo presente en el cultivo. Este aspecto de la presente invención se puede utilizar para determinar la identidad del tipo de microorganismo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de identificación de un tipo de microorganismo en un cultivo en un recipiente. En el método, se calcula un valor relativo de normalización para cada respectiva medición en una pluralidad de mediciones de un estado biológico del cultivo en el recipiente entre (i) la respectiva medición y

(ii) un estado biológico inicial del cultivo tomado en un punto temporal inicial, formando de ese modo una pluralidad de valores relativos de normalización.

La pluralidad de valores relativos de normalización puede dividirse, sobre una base temporal, en intervalos fijos predeterminados de puntos temporales entre el primer punto temporal y el segundo punto temporal. Por ejemplo, un primer intervalo fijo predeterminado puede incluir los primeros diez valores relativos de normalización, un segundo intervalo fijo predeterminado puede incluir los siguientes diez valores relativos de normalización, y así sucesivamente hasta que se alcanza el segundo punto temporal. Para cada uno de estos respectivos intervalos fijos predeterminados de los puntos temporales entre el primer punto temporal y el segundo punto temporal, se determina una primera derivada de los valores relativos de normalización en el respectivo intervalo fijo predeterminado, formando de ese modo una pluralidad de valores de transformación de tasas.

Existe un valor de transformación de tasas para cada intervalo fijo predeterminado de puntos temporales. Se puede considerar que la pluralidad de valores de transformación de tasas comprende una pluralidad de conjuntos de valores de transformación de tasas. Cada respectivo conjunto de valores de transformación de tasas es para un conjunto diferente de puntos temporales contiguos entre el primer punto temporal y el segundo punto temporal. Por ejemplo, el primer conjunto de valores de transformación de tasas pueden ser los siete primeros valores de transformación de tasas en la pluralidad de valores de transformación de tasas, el segundo conjunto de valores de transformación de tasas puede ser los siguientes siete valores de transformación de tasas en la pluralidad de valores de transformación de tasas y así sucesivamente. Para cada respectivo conjunto de valores de transformación de tasas en la pluralidad de conjuntos de valores de transformación de tasas, se calcula un valor de transformación relativo medio como una medida de la tendencia central de cada uno de los valores de transformación de tasas en el respectivo conjunto de valores de transformación de tasas. De esta manera, se calcula una pluralidad de valores de transformación relativos medios.

Se determinan la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento a partir de la pluralidad de valores relativos de normalización y la pluralidad de valores de transformación relativos medios. En algunas realizaciones, la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento se comparan con una tabla de consulta opcional que coincide con la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento de un tipo de microorganismo, determinando de ese modo el tipo de microorganismo en el cultivo en el recipiente. En algunas realizaciones, la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento se utilizan en una ecuación u otra forma de clasificador entrenado para determinar el tipo de microorganismo en el cultivo en el recipiente.

En algunas realizaciones, se da salida a una identificación del tipo de microorganismo en el cultivo en el recipiente a un dispositivo de interfaz de usuario, un monitor, un medio de almacenamiento legible por ordenador, una memoria legible por ordenador, o un sistema informático local o remoto. En algunas realizaciones se muestra una identificación del tipo de microorganismo en el cultivo.

En algunas realizaciones, el primer punto temporal es de cinco o más minutos después del punto temporal inicial y el segundo punto temporal es de treinta o más horas después del punto temporal inicial. En algunas realizaciones, el primer punto temporal se encuentra entre 0,5 horas y 3 horas después del punto temporal inicial y el segundo punto temporal se encuentra entre 4,5 horas y veinte horas después de la punto temporal inicial. En algunas realizaciones, la medida de la tendencia central de los valores de transformación de tasas en un primer conjunto de valores de transformación de tasas en la pluralidad de conjuntos de valores de transformación de tasas comprende una media geométrica, una media aritmética, una mediana, o una moda de cada uno de los valores de transformación de tasas en el primer conjunto de valores de transformación de tasas.

En algunas realizaciones, las mediciones en la pluralidad de mediciones del estado biológico del cultivo son cada una tomadas del cultivo a un intervalo de tiempo periódico entre el primer punto temporal y el segundo punto temporal. En algunas realizaciones, el intervalo de tiempo periódico es una cantidad de tiempo entre un minuto y veinte minutos, entre cinco minutos y quince minutos, o entre 0,5 minutos y 120 minutos.

En algunas realizaciones, el estado biológico inicial del cultivo se determina por una producción de fluorescencia de un sensor que está en contacto con el cultivo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la cantidad de producción de fluorescencia del sensor resulta afectada por la concentración de CO₂, la concentración de O₂ o el pH.

En algunas realizaciones, entre 10 y 50.000 mediciones, entre 100 y 10.000 mediciones, o entre 150 y 5.000 mediciones del estado biológico del cultivo en el recipiente están en la pluralidad de mediciones del estado biológico del cultivo. En algunas realizaciones, cada respectivo intervalo fijo predeterminado de puntos temporales comprende o consiste en cada uno de los valores de transformación de tasas para puntos temporales en una ventana temporal entre el primer punto temporal y el segundo punto temporal, donde la ventana temporal es un periodo de tiempo que se encuentra entre veinte minutos y diez horas, veinte minutos y dos horas y treinta minutos y noventa minutos.

En algunas realizaciones, cada conjunto de valores de transformación de tasas en la pluralidad de valores de transformación de tasas comprende o consiste entre cuatro y veinte, entre cinco y quince, o entre 2 y 100 valores de transformación de tasas contiguos. En algunas realizaciones, hay entre cinco y quinientos o entre veinte y cien valores de transformación relativos medios en la pluralidad de valores de transformación relativos medios. En

algunas realizaciones, un volumen del cultivo se encuentra entre 1 ml y 40 ml, entre 2 ml y 10 ml, menos de 100 ml, o más de 100 ml.

5 En algunas realizaciones, el recipiente comprende una composición sensora en comunicación de fluido con el cultivo, donde la composición sensora comprende un compuesto luminiscente que muestra un cambio en la propiedad luminiscente, cuando se irradia con luz que contiene longitudes de onda que hacen que dicho compuesto luminiscente emita luz, tras la exposición a oxígeno, y donde la presencia de la composición sensora no es destructiva para el cultivo y en el que el estado biológico inicial del cultivo se mide por el método de (i) irradiar la composición sensora con luz que contiene longitudes de onda que hacen que el compuesto luminiscente emita luz y (ii) observar la intensidad de la luz luminiscente del compuesto luminiscente mientras se irradia la composición sensora con la luz. En algunas realizaciones, el compuesto luminiscente está contenido dentro de una matriz que es relativamente impermeable al agua y a solutos no gaseosos, pero que tiene una alta permeabilidad al oxígeno. En algunas realizaciones, la matriz comprende caucho o plástico.

15 En algunas realizaciones, se considera que la tasa metabólica máxima es un valor de transformación relativo medio máximo en la pluralidad de valores de transformación relativos medios. En algunas realizaciones, el grado de crecimiento se determina por medio de la ecuación:

$$NR_{\text{después_crecimiento}} - NR_{\text{crecimiento_mínimo}}$$

20 donde $NR_{\text{después_crecimiento}}$ es un valor relativo de normalización en la pluralidad de valores relativos de normalización que se utilizó en el cálculo de (i) el primer valor de transformación relativo medio después del valor de transformación relativo medio máximo, (ii) el valor de transformación relativo medio máximo, o (iii) el primer valor de transformación relativo medio anterior al valor de transformación relativo medio máximo en la pluralidad de valores de transformación relativos medios, y $NR_{\text{crecimiento_mínimo}}$ es un valor relativo de normalización en la pluralidad de valores relativos de normalización que se utilizó en el cálculo del primer valor relativo medio de transformación para alcanzar un valor umbral. En algunas realizaciones, el valor umbral es un valor entre 5 y 100 o entre 25 y 75.

En algunas realizaciones, el grado de crecimiento se determina por medio de la ecuación:

$$25 \quad ART_{\text{máx}} * (\text{tiempo}_{ART_{\text{máx}}} - \text{tiempo}_{\text{inicial}})$$

30 donde $ART_{\text{máx}}$ es un valor de transformación relativo medio máximo en la pluralidad de valores de transformación relativos medios, $\text{tiempo}_{ART_{\text{máx}}}$ es una duración de tiempo entre (a) el punto temporal inicial y (b) un punto temporal cuando se midió el valor relativo de normalización en la pluralidad de valores relativos de normalización que se utilizó en el cálculo de (i) el primer valor de transformación relativo medio después del valor de transformación relativo medio máximo, (ii) el valor de transformación relativo medio máximo, o (iii) el primer valor de transformación relativo medio anterior al valor de transformación relativo medio máximo en la pluralidad de valores de transformación relativos medios, y el $\text{tiempo}_{\text{inicial}}$ es una duración de tiempo entre (i) el punto temporal inicial y (ii) un punto temporal cuando se midió el valor de normalización relativo en la pluralidad de valores de normalización relativos que se utilizó en el cálculo del primer valor de transformación relativo medio para alcanzar un valor umbral. En algunas realizaciones, el valor umbral es un valor entre 5 y 100 o entre 25 y 75.

En algunas realizaciones, el grado de crecimiento se determina por medio de la ecuación:

$$[ART_{\text{máx}} * (\text{tiempo}_{ART_{\text{máx}}} - \text{tiempo}_{\text{inicial}})] / \text{tiempo}_{\text{inicial}}$$

40 donde $ART_{\text{máx}}$ es un valor de transformación relativo medio máximo en la pluralidad de valores de transformación relativos medios, el $\text{tiempo}_{ART_{\text{máx}}}$ es una duración de tiempo entre (a) el punto temporal inicial y (b) un punto temporal cuando se midió el valor relativo de normalización en la pluralidad de valores relativos de normalización que se utilizó en el cálculo de (i) el primer valor de transformación relativo medio después del valor de transformación relativo medio máximo, (ii) el valor de transformación relativo medio máximo, o (iii) el primer valor de transformación relativo medio anterior al valor de transformación relativo medio máximo en la pluralidad de valores de transformación relativos medios, y el $\text{tiempo}_{\text{inicial}}$ es una duración de tiempo entre (i) el punto temporal inicial y (ii) un punto temporal cuando se midió el valor relativo de normalización en la pluralidad de valores relativos de normalización que se utilizó en el cálculo del primer valor de transformación relativo medio al alcanzar un valor umbral.

50 En algunas realizaciones, la etapa de determinación identifica el tipo de microorganismo en el cultivo en el recipiente como (i) una bacteria de la familia Enterobacteriaceae o (ii) una bacteria no de la familia Enterobacteriaceae basándose en la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento. En algunas realizaciones, la etapa de determinación identifica el tipo de microorganismo como bacterias basándose en la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento. En algunas realizaciones, la etapa de determinación identifica el tipo de microorganismo como (i) Enterobacteriaceae, (ii) Staphylococcaceae, (iii) Streptococcus, o (iv) Acinetobacter basándose en la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento. En algunas realizaciones, la etapa de determinación identifica el tipo de microorganismo como un único género de la familia Enterobacteriaceae seleccionado del grupo que consiste en *Alishewanella*, *Alterococcus*, *Aquamonas*, *Aranicola*, *Arsenophonus*, *Azotivirga*, *Blochmannia*, *Brenneria*, *Buchnera*, *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Dickeya*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Ewingella*,

Griimontella, Hafnia, Klebsiella, Kluyvera, Leclercia, Leminorella, Moellerella, Morganella, Obesumbacterium, Pantoea, Pectobacterium, Candidatus Phlomobacter, Photorhabdus, Plesiomonas, Pragia, Proteus, Providencia, Rahnella, Raoultella, Salmonella, Samsonia, Serratia, Shigella, Sodalis, Tatumella, Trabuksiella, Wigglesworthia, Xenorhabdus, Yersinia, y Yokenella.

- 5 En algunas realizaciones, la etapa de determinación identifica el tipo de microorganismo como una sola especie de Staphylococcaceae seleccionada del grupo que consiste en bacterias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus pettenkoferi*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus warneri*, y *Staphylococcus Xylosus*. En algunas realizaciones, la etapa de determinación identifica el tipo de microorganismo como una sola especie de Streptococcus seleccionados del grupo que consiste en *S. agalactiae*, *S. bovis*, *S. mutans*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. suis*, *Streptococcus viridans*, y *Streptococcus uberis*.

10 En algunas realizaciones, la etapa de determinación identifica el tipo de microorganismo como aerobio basándose de la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento. En algunas realizaciones, la etapa de determinación identifica el tipo de microorganismo anaeróbico como basándose en la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento.

15 En algunas realizaciones, el estado biológico inicial del cultivo se mide por medios colorimétricos, medios fluorométricos, medios nefelométricos, o medios infrarrojos. En algunas realizaciones, cada estado biológico en la pluralidad de mediciones del estado biológico se determina por medios colorimétricos, medios fluorométricos, medios nefelométricos, o medios infrarrojos. En algunas realizaciones, el cultivo es un cultivo de sangre de un sujeto (p. ej., un sujeto humano, un sujeto mamífero, etc.).

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona un aparato para identificar un tipo de microorganismo en un cultivo en un recipiente en el que el aparato comprende un procesador y una memoria, acoplada al procesador, para llevar a cabo cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria. En otro aspecto más, la presente invención proporciona un medio legible por ordenador que almacena un producto de programa informático para identificar un tipo de microorganismo en un cultivo en un recipiente, donde el producto de programa informático es ejecutable por un ordenador. El producto de programa informático comprende instrucciones para llevar a cabo cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria.

25 Sin embargo, otro aspecto de la presente invención proporciona un método de identificación de un tipo de microorganismo en un cultivo en un recipiente. Se obtiene una pluralidad de mediciones del estado biológico del cultivo en el recipiente, cada medición en la pluralidad de las mediciones tomadas en un punto temporal diferente entre un primer punto temporal y un segundo punto temporal. Para cada respectivo intervalo fijo predeterminado de puntos temporales entre el primer punto temporal y el segundo punto temporal, se determina una primera derivada de las mediciones del estado biológico en el respectivo intervalo fijo predeterminado de puntos temporales, formando de ese modo una pluralidad de valores de transformación de tasas, donde la pluralidad de valores de transformación de tasas comprende una pluralidad de conjuntos de valores de transformación de tasas, y donde cada respectivo conjunto de valores de transformación de tasas en la pluralidad de conjuntos de valores de transformación de tasas es para un conjunto diferente de puntos temporales contiguos entre el primer punto temporal y el segundo punto temporal. Para cada respectivo conjunto de valores de transformación de tasas en la pluralidad de conjuntos de valores de transformación de tasas, un valor de transformación relativo medio se calcula como una medida de la tendencia central de cada uno de los valores de transformación de tasas en el respectivo conjunto de valores de transformación de tasas, calculándose de ese modo una pluralidad de valores de transformación relativos medios. Se determinan una tasa metabólica máxima y un grado de crecimiento a partir de la pluralidad de valores relativos de normalización y la pluralidad de valores de transformación relativos medios. La tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento se comparan con una tabla de consulta que coincide con la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento para un tipo de microorganismo, determinándose de ese modo el tipo de microorganismo en el cultivo en el recipiente.

4 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra un aparato para identificar un tipo de microorganismo en un cultivo en un recipiente, comprendiendo el aparato un procesador y una memoria, acoplada al procesador, de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 2 ilustra un dibujo esquemático de un recipiente de cultivo y un sistema detector de CO₂ de acuerdo con una realización de la presente invención.

Las Figuras 3A y 3B ilustran un método para identificar un tipo de microorganismo en un cultivo en un recipiente de acuerdo con una realización de la presente invención.

55 La Figura 4 muestra un gráfico de los valores relativos de normalización medidos a partir de un cultivo de sangre en un recipiente de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 5 es un gráfico de los valores de transformación relativos medios a lo largo del tiempo basado en la tasa

media de cambio en los valores de transformación de tasas de la Figura 4 a lo largo del tiempo de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 6 es el gráfico de la segunda derivada de los valores relativos de normalización de la Figura 4 y muestra los cambios en la tasa de metabolismo a lo largo del tiempo de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 7 es un gráfico de la razón del grado de crecimiento / frente a la tasa metabólica máxima para cultivos de referencia que contienen microorganismos de tipo conocido.

Los números de referencia similares se refieren a las partes correspondientes en las distintas vistas de los dibujos.

5 Descripción detallada de la invención

Se proporcionan sistemas, métodos y aparatos para la identificación de un tipo de microorganismo en un cultivo. En un aspecto, se calcula un valor relativo de normalización para cada respectiva medición de un estado biológico del cultivo entre (i) la respectiva medición y (ii) un estado biológico inicial. Para cada intervalo fijo de puntos temporales, se calcula una primera derivada de los valores relativos de normalización para las mediciones del estado biológico en el intervalo de puntos temporales, formando de ese modo una pluralidad de valores de transformación de tasas. Para cada respectivo conjunto de valores de transformación de tasas en la pluralidad de valores de transformación de tasas, se calcula una medida de la tendencia central de los valores de transformación de tasas en el conjunto, formando de ese modo una pluralidad de valores de transformación relativos medios. En algunas realizaciones, una tasa metabólica máxima y un grado de crecimiento, determinados a partir de los valores relativos de normalización y los valores de transformación relativos medios, se comparan con una tabla de consulta opcional que empareja estos valores para un tipo de microorganismo.

5.1 Definiciones

El término "Acinetobacter" según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un género Gram-negativo de bacterias que pertenecen al phylum Proteobacteria. Las especies de Acinetobacter, no móviles, son oxidasa-negativas, y aparecen por pares bajo aumento.

El término "estado biológico" según se utiliza en la presente memoria se refiere a una medida de la actividad metabólica de un cultivo tal como se determina mediante, por ejemplo, la concentración de CO₂, la concentración de O₂, el pH, la tasa de cambio en la concentración de CO₂, la tasa de cambio en la concentración de O₂, o la tasa de cambio del pH en el cultivo.

El término "sangre", según se utiliza en la presente memoria, significa ya sea la sangre completa o uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o siete tipos de células cualesquiera del grupo de los tipos de células que consiste en glóbulos rojos, plaquetas, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos, y monocitos. La sangre puede ser de cualquier especie, incluyendo, pero no limitada a, seres humanos, cualquier animal de laboratorio (p. ej., rata, ratón, perro, chimpancé), o cualquier mamífero.

El término "cultivo de sangre" según se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier cantidad de sangre que se ha mezclado con medios de cultivo de sangre. Los ejemplos de los medios de cultivo incluyen, pero no se limitan a, caldo de caseína con suplemento de soja, producto digerido de caseína y soja, hemina, menadiona, bicarbonato de sodio, polianetolsulfonato de sodio, sacarosa, HCKI piridoxal, extracto de levadura, y L-cisteína. Uno o más reactivos que se pueden utilizar como medios de cultivo de sangre se encuentran, por ejemplo, en Stanier et al., 1986, The Microbial World, quinta edición, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, Nueva Jersey, páginas 10-20, 33-37 y 190-195. En algunos casos, se obtiene un cultivo de sangre cuando un sujeto tiene síntomas de una infección de la sangre o bacteriemia. La sangre se extrae de un sujeto y pone directamente en un recipiente que contiene un caldo nutritivo. En algunas realizaciones, se necesitan diez mililitros de sangre por cada recipiente.

El término "cultivo" según se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier muestra biológica de un sujeto que está ya sea en forma aislada o mezclado con uno o más reactivos que están diseñados para células de cultivo. La muestra biológica del sujeto puede ser, por ejemplo, sangre, células, un extracto celular, fluido cefalorraquídeo, plasma, suero, saliva, esputo, una muestra de tejido, una biopsia de tejido, orina, una secreción de herida, una muestra de una superficie de catéter permanente, o una muestra de heces. El sujeto puede ser un miembro de cualquier especie, incluyendo, pero no limitado a, seres humanos, cualquier animal de laboratorio (p. ej., rata, ratón, perro, chimpancé), o cualquier mamífero. Uno o más reactivos que se pueden mezclar con la muestra biológica se encuentran, por ejemplo, en Stanier et al., 1986, The Microbial World, quinta edición, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, Nueva Jersey, páginas 10-20, 33-37 y 190-195. Un hemocultivo es un ejemplo de un cultivo. En algunas realizaciones, la muestra biológica está en forma líquida y la cantidad de la muestra biológica en el cultivo está entre 1 ml y 150 ml, entre 2 ml y 100 ml, entre 0,5 ml y 90 ml, entre 0,5 ml y 75 ml, o entre 0,25 ml y 100.000 ml. En algunas realizaciones, la muestra biológica es en forma líquida y está entre 1 y 99 por ciento del volumen del cultivo, entre 5 y 80 por ciento del volumen del cultivo, entre 10 y 75 por ciento del volumen del cultivo, menos de 80 por ciento del volumen del cultivo, o más de 10 por ciento del volumen del cultivo. En algunas realizaciones, la muestra biológica está entre 1 y 99 por ciento del peso total del cultivo, entre 5 y 80 por ciento del peso total del cultivo, entre

10 y 75 por ciento del peso total del cultivo, menos de 80 por ciento del peso total del cultivo, o más de 10 por ciento del peso total del cultivo.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "Enterobacteriaceae" se refiere a una gran familia de bacterias, incluyendo *Salmonella* y *Escherichia coli*. Las Enterobacteriaceae también se denominan en la presente memoria grupo Entérico. Los estudios genéticos las colocan entre las Proteobacteria, y se les asigna su propio orden (Enterobacteriales). Los miembros de la familia Enterobacteriaceae tienen en forma de varilla, y tienen típicamente de 1 µm a 5 µm de longitud. Al igual que otras proteobacterias tienen cepas Gram-negativas, y son anaerobios facultativos, fermentan de azúcares para producir ácido láctico y otros diversos productos finales. También reducen el nitrato a nitrito. A diferencia de la mayoría de bacterias similares, las Enterobacteriaceae generalmente carecen de citocromo C oxidasa, aunque hay excepciones (p. ej., *Plesiomonas*). La mayoría tienen muchos flagelos, pero algunos géneros no son móviles. No son formadores de esporas, y con excepción de las cepas de *Shigella dysenteriae* son catalasa positivos. Muchos miembros de esta familia son una parte normal de la flora intestinal que se encuentra en los intestinos de los seres humanos y otros animales, mientras que otros se encuentran en el agua o el suelo, o son parásitos en una variedad de diferentes animales y plantas. La mayoría de los miembros de Enterobacteriaceae tienen fimbrias peritricosas de Tipo I implicadas en la adherencia de las células bacterianas a sus anfitriones. Los géneros de las Enterobacteriaceae incluyen, pero no se limitan a, *Alishewanella*, *Alterococcus*, *Aquamonas*, *Aranicola*, *Arsenophonus*, *Azotivirga*, *Blochmannia*, *Brenneria*, *Buchnera*, *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Dickeya*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia* (p. ej., *Erwinia amylovora*), *Escherichia* (p. ej., *Escherichia coli*), *Ewingella*, *Griimontella*, *Hafnia*, *Klebsiella* (p. ej., *Klebsiella pneumoniae*), *Kluyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Candidatus Phlomobacter*, *Photorhabdus* (p. ej., *luminescens Photorhabdus*), *Plesiomonas* (p. ej., *Plesiomonas shigelloides*), *Pragia*, *Proteus* (p. ej., *Proteus vulgaris*), *Providencia*, *Rahnella*, *Raoultella*, *Salmonella*, *Samsonia*, *Serratia* (p. ej., *Serratia marcescens*), *Shigella*, *Sodalis*, *Tatumella*, *Trabulsiella*, *Wigglesworthia*, *Xenorhabdus*, *Yersinia* (p. ej., *Yersinia pestis*), y *Yokenella*. Se encuentra más información acerca de enterobacterias en Stanier et al., 1986, The Microbial World, quinta edición, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, Nueva Jersey, Capítulo 5.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "instancia" se refiere a la ejecución de una etapa en un algoritmo. Algunas etapas de un algoritmo se pueden ejecutar varias veces, refiriéndose cada repetición de la etapa como una instancia de la etapa.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "microorganismo" se refiere a organismos con un diámetro de 1 mm o menos excluyendo virus.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "tipo de microorganismo" se refiere a cualquier subclasificación del reino bacterias tal como un filo, clase, orden, familia, género o especie del reino bacterias.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "porción" se refiere al menos a uno por ciento, al menos dos por ciento, al menos diez por ciento, al menos veinte por ciento, al menos treinta por ciento, al menos cincuenta por ciento, al menos setenta y cinco por ciento, al menos noventa por ciento, o al menos 99 por ciento de un conjunto. Así, en un ejemplo no limitante, al menos una porción de una pluralidad de objetos significa al menos uno por ciento, al menos dos por ciento, al menos diez por ciento, al menos veinte por ciento, al menos treinta por ciento, al menos cincuenta por ciento, como menos setenta y cinco por ciento, al menos noventa por ciento, o al menos 99 por ciento de los objetos de la pluralidad.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "Staphylococcaceae" se refiere a una familia de bacterias del orden Bacillales que incluye, pero no se limita a, las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus pettenkoferi*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus warneri*, y *Xylosus Staphylococcus*.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "Streptococcus" se refiere a un género de bacterias Gram-positivas esféricas, que pertenece a la phylum Firmicutes y al grupo de bacterias del ácido láctico. La división celular se produce a lo largo de un solo eje en estas bacterias, y de este modo crecen en cadenas o pares, de ahí el nombre - del griego streptos, que significa fácilmente doblada o torcida, como una cadena. Esto contrasta con los estafilococos, que dividen a lo largo de múltiples ejes y generan agrupaciones de células de tipo racimo. Las especies de Streptococcus incluyen, pero no se limitan a *S. agalactiae*, *S. bovis*, *S. mutans*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. suis*, *Streptococcus viridans*, y *Streptococcus uberis*.

Según se utiliza en la presente memoria, un "sujeto" es un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un primate no humano, y más preferiblemente un ser humano. Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" se utilizan indistintamente en la presente memoria.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "recipiente" se refiere a cualquier contenedor que puede albergar un cultivo tal como un cultivo de sangre. Por ejemplo, en una realización, un recipiente es un contenedor que tiene una pared lateral, una pared inferior, un extremo superior abierto para la recepción de un cultivo que va a estar contenido dentro del contenedor, donde el contenedor está formado de un material tal como vidrio, plástico transparente (p. ej., un copolímero olefínico cíclico) que tiene una transparencia suficiente para observar visualmente

la turbidez en la muestra, y donde es preferiblemente resistente al calentamiento a una temperatura de al menos 250°C. En algunas realizaciones, el contenedor tiene un espesor de pared suficiente para soportar una presión interna de al menos 1,76 kg/cm² y un cierre acoplado al extremo abierto del contenedor, donde el cultivo está sustancialmente libre de contaminación después del almacenamiento en el recipiente durante un período prolongado de tiempo en condiciones ambientales. Los contenedores ilustrativos se describen en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.432.697. En algunas realizaciones, el período de tiempo prolongado bajo condiciones ambientales es de al menos aproximadamente un año a aproximadamente 40°C. En algunas realizaciones, el recipiente comprende además un compuesto fluorescente sensor fijado a una superficie interior del recipiente que, cuando se expone a oxígeno, presenta una reducción en la intensidad de fluorescencia tras la exposición a una luz fluorescente. En algunas realizaciones, el contenedor es sustancialmente transparente a dicha luz fluorescente. En algunas realizaciones, el compuesto sensor fluorescente comprende al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en sales de tris-4,7-difenil-1,10-fenantrolina-rutenio (II), sales de tris-2,2'-bipiridil-rutenio (II), 9,10-difenil-antraceno, y mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, el recipiente es un vial de cultivo BACTEC[®] LITIC/10 Anaerobic/F para cultivo de sangre, un vial BBL[®] SEPTI-Chek[®], una botella para cultivo de sangre BBL[®] SEPTI-Chek[®], un vial Becton Dickinson BACTEC[®], un vial de cultivo Plus Aerobic/F* y Plus Anaerobic/F*, un vial de cultivo Becton Dickinson BACTEC[®] Standard/10 Aerobic/F, un vial de cultivo Becton Dickinson BACTEC[®] Myco/F Lytic, un cultivo vial Becton Dickinson BACTEC[®] PEDS PLUS[®]/F, o un vial de cultivo Becton Dickinson BACTEC[®] Standard Anaerobic/F (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey).

5.2 Aparato ilustrativo

La Figura 1 detalla un aparato 11 para identificar un tipo de microorganismos en un cultivo en un recipiente que comprende un procesador y una memoria, acoplada al procesador. En algunas realizaciones, el tipo de microorganismo identificado por el aparato 11 o cualquiera de los métodos de la presente invención es un phylum dentro del reino bacterias. En algunas realizaciones, el tipo de microorganismo identificado por el aparato 11 o cualquiera de los métodos de la presente invención es una clase dentro de un phylum dentro del reino bacterias. En algunas realizaciones, el tipo de microorganismo identificado por el aparato 11 o cualquiera de los métodos de la presente invención es un orden dentro de una clase dentro de un phylum dentro del reino bacterias. En algunas realizaciones, el tipo de microorganismo identificado por el aparato 11 o cualquiera de los métodos de la presente invención es una familia dentro de un orden dentro de una clase dentro de un phylum dentro del reino bacterias. En algunas realizaciones, el tipo de microorganismo identificado por el aparato 11 o cualquiera de los métodos de la presente invención es un género dentro de una familia dentro de un orden dentro de una clase dentro de un phylum dentro del reino bacterias. En algunas realizaciones, el tipo de microorganismo identificado por el aparato 11 o cualquiera de los métodos de la presente invención es una especie en un género dentro de una familia dentro de un orden dentro de una clase dentro de un phylum dentro del reino bacterias.

El procesador y la memoria ilustrados en la Figura 1 pueden ser, por ejemplo, parte de un sistema de cultivo de microorganismos radiométrico o no radiométrico automático o semiautomático. El aparato 11 comprende preferiblemente:

- una unidad de procesamiento central 22;
- opcionalmente, una unidad de almacenamiento no volátil principal 14, por ejemplo una unidad de disco duro, para almacenar soporte lógico y datos, la unidad de almacenamiento 14 controlada por el controlador de almacenamiento 12;
- una memoria del sistema 36, preferiblemente una memoria de acceso aleatorio (RAM) de alta velocidad, para almacenar programas de control del sistema, datos y programas de aplicación, que comprende programas y datos (opcionalmente cargados desde la unidad de almacenamiento no volátil 14); la memoria del sistema 36 también puede incluir memoria de sólo lectura (ROM);
- una interfaz de usuario 32, que comprende uno o más dispositivos de entrada (p. ej., teclado 28, ratón) y un monitor 26 u otro dispositivo de salida;
- un sensor 34 para tomar una medición de un estado biológico de un cultivo en un recipiente;
- una tarjeta de interfaz de red 20 (circuitos de comunicaciones) para la conexión al sensor 34;
- un bus interno 30 para la interconexión de los elementos antes mencionados del sistema; y
- una fuente de alimentación 24 para alimentar los elementos antes mencionados.

El funcionamiento de la unidad de procesamiento central 22 se controla principalmente por medio del sistema operativo 40. El sistema operativo 40 se puede almacenar en la memoria del sistema 36. En una implementación típica, la memoria del sistema 36 también incluye:

- un sistema de archivos 42 para controlar el acceso a los distintos archivos y estructuras de datos utilizados por la presente invención;

- un módulo de determinación del tipo de cultivo 44 para la identificación de un tipo de microorganismo en un cultivo en un recipiente;
- una estructura de datos biológicos 46 para almacenar un estado biológico inicial 48 del cultivo y una pluralidad de mediciones del estado biológico del cultivo, donde cada medición 50 en la pluralidad de mediciones se toma en un punto temporal diferente entre un primer punto temporal (inicial) y un segundo punto temporal (final);
- una tabla de consulta opcional 54 que comprende coincidencias entre (i) una pluralidad de conjuntos de valores, comprendiendo cada conjunto de valores 56 en la pluralidad de conjuntos de valores un valor de la tasa metabólica máxima 57 y un grado de crecimiento 58, y (ii) un conjunto de tipos de microorganismos, donde, para cada conjunto de valores 56 en la pluralidad de conjuntos de valores hay un tipo de microorganismo correspondiente 59 en el conjunto de tipos de microorganismos;
- conjuntos de valores de transformación de tasas 60, donde cada conjunto de valores de transformación de tasas comprende una pluralidad de valores de transformación de tasas 62, donde cada valor de transformación de tasas 62 es una primera derivada de los valores relativos de normalización asociados con un intervalo fijo predeterminado de puntos temporales;
- un valor de transformación relativo medio 66 para cada conjunto 60 de valores de transformación tasas 60; y
- una estructura de datos para almacenar una identificación de un tipo de microorganismo 68 en un cultivo en un recipiente.

Como se ilustra en la Fig. 1, el aparato 11 puede comprender datos tales como la estructura de los datos del estado biológico 46, tabla de consulta opcional 54, conjuntos de valores de transformación tasas 60, valores de transformación relativa media 66, y una identificación del tipo de microorganismo en el cultivo 68. En algunas realizaciones, la memoria 36 o el almacenamiento de datos 14 también almacena una medida de la tendencia central de los valores de transformación relativa media 66. Los datos descritos anteriormente pueden estar en cualquier forma de almacenamiento de datos incluyendo, pero no limitado a, un archivo plano, una base de datos relacional (SQL), o una base de datos de procesamiento analítico en línea (OLAP) (MDX y/o variantes de la misma). En algunas realizaciones, tales estructuras de datos se almacenan en una base de datos que comprende un esquema en estrella que no se almacena en forma de cubo, pero tiene tablas de dimensiones que definen la jerarquía. Aún más, en algunas realizaciones, tales estructuras de datos se almacenan en una base de datos que tiene jerarquía que se rompe explícitamente en la base de datos o esquema de base de datos subyacentes (p. ej., tablas de dimensión que no están dispuestas jerárquicamente). En algunas realizaciones, tales estructuras de datos se almacenan en el aparato 11. En otras realizaciones, la totalidad o una parte de estas estructuras de datos están alojados en (almacenada en) uno o más ordenadores que son direccionables por el aparato 11 a través de Internet/red que no está representada en la Figura 1. En algunas realizaciones, la totalidad o una porción de uno o más de los módulos de programa representados en el aparato 1 de la Figura 1, tales como el módulo de determinación del tipo de cultivo 44 son, de hecho, residentes en un dispositivo (p. ej., ordenador) distinto del aparato 11 que es direccionable por el aparato 11 a través de Internet/red que no está representada en la figura 1.

El aparato 11 determina la actividad metabólica de un cultivo mediante, por ejemplo, concentración de CO₂, concentración de O₂, pH, tasa de cambio de concentración de CO₂, una tasa de cambio de concentración de O₂, o tasa de cambio en el pH en el cultivo. A partir de esta determinación de la actividad metabólica, el aparato 11 puede identificar un tipo de microorganismo en el cultivo. En algunas realizaciones, el aparato 11 acomoda un número de recipientes de cultivo y sirve como incubadora, agitador, y sistema de detección. Estos componentes del aparato 11 no se representan en la Figura 1 puesto que la naturaleza de tales componentes puede variar ampliamente dependiendo de la configuración exacta del aparato 11. Por ejemplo, el número de recipientes de cultivo alojados por el aparato puede variar de un recipiente a más de 1.000 recipientes. Puede haber un sensor asociado con cada recipiente con el fin de medir el estado biológico del cultivo contenido dentro del recipiente. El sensor puede estar en cualquier ubicación del recipiente y hay una amplia gama de posibles sensores que pueden ser utilizados.

La Figura 2 ilustra un sensor ilustrativo que es capaz de medir el estado biológico de un cultivo. En la Figura 2, un sensor de CO₂ 204 está unido a la base del recipiente de cultivo 202 y recubierto con una cantidad de cultivo. El sensor de CO₂ 204 es impermeable a los iones, los componentes del medio y el cultivo, pero es libremente permeable al CO₂. El dióxido de carbono producido por las células en el cultivo se difunde al sensor 204 y se disuelve en el agua presente en la matriz de sensor, generando iones de hidrógeno. Los aumentos en la concentración de iones de hidrógeno (disminución de pH) aumentan la salida de fluorescencia del sensor 204, cambiando así la señal transmitida desde filtro de excitación 206 al filtro de emisión de 208. El aparato 11 realiza mediciones repetidas de la señal que penetra en el filtro de emisión de 208 a lo largo del tiempo y utiliza estos datos para identificar un tipo de microorganismo en el cultivo utilizando los algoritmos descritos en la presente memoria.

En algunas realizaciones, el aparato 11 es una incubadora, agitador, y detector de fluorescencia que contendrá entre 1 y 1000 recipientes de cultivo (p. ej., 96, 240 o 384 recipientes de cultivo). En algunas realizaciones, los recipientes están dispuestos en gradillas (p. ej., gradillas circulares o lineales), cada una de las cuales tiene diversas estaciones de recipientes. Por ejemplo, en una realización específica, el aparato 11 contendrá 240 recipientes de cultivo

dispuestos en seis gradillas, donde cada gradilla tiene 40 estaciones de recipientes. En algunas realizaciones, cada estación de recipientes en el aparato 11 contiene un diodo emisor de luz y un detector de fotodiodo con filtros de excitación y de emisión apropiados (p. ej., como se ilustra en la Figura 2). En algunas realizaciones, los recipientes de cultivo se balancean y se calientan a $35 \pm 1^\circ\text{C}$.

5 5.3 Métodos ilustrativos

Ahora que se ha descrito un aparato ilustrativo de acuerdo con la presente invención, se detallarán los métodos ilustrativos de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, tales métodos pueden ser implementados mediante el módulo de determinación del tipo de cultivo 44 de la Figura 1. Haciendo referencia a la etapa 302 de la Figura 3, se toma un estado biológico inicial del cultivo. Por ejemplo, en referencia a la Figura 2, en algunas realizaciones, se realiza una lectura inicial de detector 204 para determinar la concentración de CO_2 en el sensor. En realizaciones alternativas, se leen (miden) la concentración de O_2 , el pH, u otros indicios del estado biológico del cultivo iniciales en la etapa 302. En algunas realizaciones, el estado biológico inicial del cultivo se determina mediante una salida de fluorescencia de un sensor (p. ej., sensor 204) que está en contacto con el cultivo. En algunas realizaciones, la cantidad de salida de fluorescencia del sensor se ve afectada por la concentración CO_2 de la manera descrita anteriormente junto con la Figura 2. En algunas realizaciones, la cantidad de salida de fluorescencia del sensor se ve afectada por la concentración de O_2 , el pH, o algún otro indicio del estado metabólico conocido en la técnica. En general, cualquier característica física observable que sea indicativa de la tasa metabólica del cultivo se puede medir y almacenar como estado inicial. En algunas realizaciones, ésta característica física observable es la acumulación de productos moleculares (siendo un ejemplo los lipopolisacáridos con las bacterias Gram negativas), cambios físicos/químicos no moleculares en el entorno relacionados con el crecimiento (cambios de presión), y/o producción de dióxido de carbono u otros metabolitos que se acumulan o el consumo de sustrato tal como oxígeno) o la acumulación de material celular.

En algunas realizaciones, se toma un estado biológico inicial del cultivo de sangre en la etapa 302 utilizando medios colorimétricos, medios fluorométricos, medios nefelométricos, o medios infrarrojos. Los ejemplos de los medios colorimétricos incluyen, pero no se limitan a, el uso de indicadores rédox colorimétricos tales como resazurina/azul de metileno o cloruro de tetrazolio, o el compuesto violeta de p-yodonitrotetrazolio como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.617.127. Otro ejemplo de medios colorimétricos incluye el análisis colorimétrico utilizado por Oberoi et al. 2004, en "Comparison of rapid colorimetric method with conventional method in the isolation of *Mycobacterium tuberculosis*", Indian J Med Microbiol 22:44-46. En Oberoi et al., un sistema MB/Bact240 (Organon Teknika) se carga con recipientes de cultivo. El principio de funcionamiento de este sistema se basa en la detección de crecimiento de micobacterias por un sensor colorimétrico. Si los organismos están presentes, se produce CO_2 a medida que el organismo metaboliza el glicerol sustrato. El color del sensor permeable al gas en la parte inferior de cada uno de los recipientes de cultivo da como resultado un aumento de la reflectancia en la unidad, que es controlada por el sistema utilizando rayos infrarrojos. Los ejemplos de los medios colorimétricos incluyen adicionalmente cualquier control del cambio en el color de la composición del sensor debido a un cambio en la composición de gas, tal como concentración de CO_2 , en un recipiente resultante del metabolismo de microorganismo.

Los ejemplos de los medios fluorométricos y colorimétricos se describen en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.096.272, que describe un sistema instrumental en el que se proporciona un carrusel giratorio para la incubación y la indexación, y en el que existen múltiples fuentes de luz que emiten cada una luz de longitud de onda diferente para la detección colorimétrica y fluorométrica. Según se utiliza en la presente memoria medio nefelométrico se refiere a la medición de la turbidez del cultivo usando un nefelómetro. Un nefelómetro es un instrumento para medir partículas en suspensión en un coloide líquido o gaseoso. Esto se realiza mediante el empleo de un haz de luz (haz de origen) y un conjunto de detectores de luz a un lado (usualmente 90°) del haz de origen. La densidad de partículas es en ese caso una función de la luz reflejada en el detector desde las partículas. Hasta cierto punto, la cantidad de reflejos luz para una densidad dada de partículas es dependiente de propiedades de las partículas tales como su forma, color y reflectividad. Por lo tanto, se debe establecer una correlación de trabajo entre la turbidez y los sólidos en suspensión (una cuantificación de partículas más útil, pero típicamente más difícil) de forma independiente para cada situación.

Según se utiliza en la presente memoria, un medio de infrarrojos para la medición de un estado biológico de un cultivo de sangre es cualquier sistema infrarrojos de detección de microorganismos o método conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, los descritos Patente de Estados Unidos Núm. 4.889.992, así como en la publicación PCT Núm. WO/2006071800.

En algunas realizaciones, el recipiente 202 que sostiene el cultivo comprende una composición sensora 204 en comunicación de fluido con el cultivo. La composición sensora 204 comprende un compuesto luminiscente que muestra un cambio en la propiedad luminiscente, cuando se irradia con luz que contiene longitudes de onda que hacen que el compuesto luminiscente emita luz, tras la exposición al oxígeno. La presencia de la composición sensora 204 no es destructiva para el cultivo. En tales realizaciones, la etapa de medición 302 (y cada instancia de la etapa de medición 308) comprende la irradiación de la composición sensora 202 con la luz que contiene longitudes de onda que hacen que el compuesto luminiscente emita luz y la observación de la intensidad de la luz luminiscente desde el compuesto luminiscente mientras se irradia la composición sensora con la luz. En algunas

realizaciones, el compuesto luminiscente está contenido dentro de una matriz que es relativamente impermeable al agua y a solutos no gaseosos, pero que tiene una alta permeabilidad al oxígeno. En algunas realizaciones, la matriz comprende caucho o plástico. Se describen más detalles de los sensores de acuerdo con esta realización de la presente invención en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.900.030.

5 En la etapa 304, el estado biológico inicial del cultivo medido tras el inicio desde la etapa 302 se normaliza y se almacena como estado biológico inicial del cultivo 48 (p. ej. a cien por ciento o algún otro valor predeterminado). Este estado biológico inicial, almacenado como elemento de datos 48 en la Figura 1, sirve como un valor de referencia frente las mediciones subsiguientes del estado biológico del cultivo. En algunas realizaciones, la etapa 304 no se realiza y las mediciones absolutas de la etapa 302 se utilizan en los algoritmos descritos en la presente memoria.

10 El aparato 11 incuba el cultivo durante un periodo de tiempo predeterminado después de tomar la medición estado biológico inicial. A continuación, después de que haya transcurrido el periodo de tiempo predeterminado, el aparato 11 realiza otra medición del estado biológico del cultivo. Este proceso se ilustra mediante las etapas 306 y 308 en la Figura 3. En la Figura 3A, el proceso se muestra como un avance de la frecuencia temporal t en la etapa 306. El estado biológico durante el periodo de tiempo en la etapa 306 en la que el aparato espera un tiempo para avanzar la frecuencia temporal t no se utiliza en etapas de procesamiento posteriores para determinar el tipo de microorganismo en el cultivo. En la etapa 308, una vez que el tiempo ha avanzado con una frecuencia temporal t , se toma de nuevo una medición del estado biológico del cultivo en el recipiente de la misma manera que se tomó la medición inicial del estado biológico (p. ej., utilizando el dispositivo representado en la Figura 2). En algunas realizaciones, el periodo de tiempo predeterminado (la duración de la frecuencia temporal t) es de diez minutos. En algunas realizaciones, el periodo de tiempo predeterminado (la duración de la frecuencia temporal t) es un periodo de tiempo que es menos de 5 minutos, un periodo de tiempo que es menos de 10 minutos, un periodo de tiempo que es menos de 15 minutos, un periodo de tiempo que es menos de 20 minutos, un periodo de tiempo en el intervalo entre 1 minuto y 30 minutos, un periodo de tiempo en el intervalo entre 1 minuto y 20 minutos, un periodo de tiempo en el intervalo entre 5 minutos y 15 minutos, o un periodo de tiempo que es mayor de 5 minutos. La medición del estado biológico del cultivo en el recipiente tomada en la etapa 308 se convierte en un valor relativo de normalización mediante la estandarización de la medición de la etapa 308 frente a la medición inicial de la etapa 302 en realizaciones en las que se utiliza la medición inicial de la etapa 302 para la normalización. En una realización, la medición del estado biológico del cultivo en el recipiente tomada en la etapa 308 se convierte en un valor relativo de normalización tomando la razón de la medición de la etapa 308 frente a la medición inicial de la etapa 302. En algunas realizaciones, este valor relativo de normalización calculado se almacena como un elemento de datos 50 en la Figura 1. En algunas realizaciones, la medición del estado biológico medido en la etapa 308 se almacena como un elemento de datos 50 en la Figura 1 y el valor relativo de normalización correspondiente a la medición del estado biológico medido en la etapa 308 se calcula según sea necesario en etapas de procesamiento posteriores.

35 En la etapa 310 se realiza una determinación en cuanto a si ha transcurrido un primer intervalo de tiempo fijado predeterminado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el intervalo de tiempo fijado predeterminado es de setenta minutos. En este ejemplo, si la frecuencia temporal t de la etapa 306 es de 10 minutos, se requeriría que la frecuencia temporal t hubiera avanzado siete veces antes de lograr la condición 310-Yes. En algunas realizaciones, el intervalo de tiempo fijado predeterminado es una duración de tiempo que está entre cinco minutos y cinco horas, una duración de tiempo que está entre veinte minutos y diez horas, una duración de tiempo que está entre veinte minutos y dos horas, una duración de tiempo que está entre treinta minutos y los noventa minutos, una duración de tiempo que es de menos de 24 horas, o una duración de tiempo que es de más de 24 horas. Cuando ha transcurrido el primer intervalo de tiempo fijado predeterminado (310-Yes), el control del procedimiento pasa a la etapa 312, donde se llevan a cabo etapas adicionales del algoritmo. Cuando no ha transcurrido el primer intervalo de tiempo fijado predeterminado (310-No), el control del procedimiento pasa de nuevo a la etapa 306, donde el algoritmo espera a tiempo para avanzar la frecuencia temporal t antes de tomar una vez más una medición del estado biológico del cultivo en una nueva instancia de la etapa 308.

50 El resultado neto de las etapas 306 a 310 es que se toma una pluralidad de mediciones de un estado biológico del cultivo en el recipiente y que cada medición de la pluralidad de mediciones está en un punto temporal diferente entre un primer punto temporal (inicial) y un punto temporal de terminación (final). Adicionalmente, en realizaciones típicas en la que la frecuencia temporal t es la misma cantidad en cada instancia de la etapa 306, las mediciones de la pluralidad de mediciones se toman cada una del cultivo en un intervalo periódico. En algunas realizaciones, el intervalo periódico es una cantidad de tiempo entre un minuto y veinte minutos, una cantidad de tiempo de entre cinco minutos y quince minutos, una cantidad de tiempo entre treinta segundos y cinco horas o una cantidad de tiempo que es mayor de un minuto.

60 Cuando ha transcurrido un intervalo fijado predeterminado (310-Yes), se calcula una primera derivada de los valores de normalización relativos en el respectivo intervalo fijado predeterminado (o valores absolutos de la etapa 302 en el respectivo intervalo fijado predeterminado en realizaciones en las que no se realiza la normalización) en la etapa 312, formando de ese modo un valor de transformación de tasas de 62. En otras palabras, el cambio en los valores relativos de normalización durante el intervalo fijado predeterminado se determina en la etapa 312. Obsérvese que los valores de transformación de tasas son la primera derivada de los valores relativos de normalización en realizaciones en las que los datos de medición se normalizan y valores de transformación de tasas son la primera

derivada de las mediciones absolutas de la etapa 302 en realizaciones en las que los datos de medición no están normalizados. En algunas realizaciones, el intervalo de tiempo fijado predeterminado durante el cual se calcula la primera derivada son todas las mediciones en un período de tiempo inmediatamente precedente que es está entre veinte minutos y dos horas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el intervalo de tiempo fijado predeterminado de la etapa 310 es de setenta minutos, y, en la etapa 312, la tasa de cambio a través de todos los valores relativos de normalización de las mediciones en este intervalo de tiempo de setenta minutos (los últimos 70 minutos) es determinado en la etapa 312 y almacenado como el valor de transformación de tasas 62. En algunas realizaciones, el intervalo de tiempo fijado predeterminado durante el cual se calcula la primera derivada (ventana temporal) son todas las mediciones en un período de tiempo inmediatamente precedente que está entre cinco minutos y veinte horas, entre treinta minutos y diez horas, entre veinte minutos y dos horas, entre veinte minutos y diez horas, o entre treinta minutos y noventa minutos.

En la etapa 314 se realiza una determinación en cuanto a si se han medido un número predeterminado de valores de transformación de tasas desde que se alcanzó la condición 314-Yes de la última vez. Si así fuera (314-Yes), el control del procedimiento pasa a la etapa 316. Si no (314-No), el control del procedimiento retorna de nuevo a la etapa 306 donde de control del procedimiento espera hasta que ha transcurrido la frecuencia temporal t antes de continuar hasta la etapa 308, donde se calcula una vez más el valor relativo de normalización del cultivo. Cada condición (314-Yes) marca la culminación de un conjunto 60 de valores de transformación de tasas 62. Por ejemplo, en algunas realizaciones, condición 314-Yes se logra cuando se han medido siete nuevos valores de transformación de tasas 62. En este ejemplo, un conjunto 60 de valores de transformación de tasas comprende o consiste en los siete valores de transformación de tasas 62. En algunas realizaciones, cada conjunto 60 de valores de transformación de tasas 62 comprende o consiste en entre cuatro y veinte valores de transformación de tasas contiguos. Los valores de transformación de tasas contiguos 62 son valores de transformación de tasas en el mismo conjunto 60. Tales valores de transformación de tasas 62, por ejemplo, se calculan y almacenan en instancias sucesivas de la etapa 312. En algunas realizaciones, cada conjunto 60 de valores de transformación de tasas 62 en la pluralidad de valores de transformación de tasas comprende o consiste en entre cinco y quince valores de transformación de tasas contiguos 62, entre uno y cien valores de transformación de tasas contiguos 62, entre cinco y quince valores de transformación de tasas contiguos 62, más de cinco valores de transformación de tasas 62 o menos de diez valores de transformación de tasas 62.

Cuando se alcanza la condición 314-Yes, se ejecuta la etapa 316. En la etapa 316, se calcula un valor de transformación relativo medio (tasa media de cambio) 66 a partir del conjunto recién formado 60 de valores de transformación tasas 62. Por lo tanto, para cada conjunto 60 de valores de transformación de tasas 62, hay un valor de transformación relativo medio 66. En algunas realizaciones, se calcula un valor de transformación relativo medio (tasa media de cambio) 66 a partir del conjunto recién formado 60 de valores de transformación de tasas 62 tomando una medida de la tendencia central de los valores de transformación tasas de 62 en el conjunto recién formado 60 de valores de transformación de tasas 62. En algunas realizaciones, esta medida de tendencia central es una media geométrica, una media aritmética, una mediana, o una moda de todos o una porción de los valores de transformación de tasas 62 en el conjunto recién formado 60 de valores de transformación de tasas 62.

En la etapa 318, se realiza una determinación en cuanto a si se ha alcanzado un punto predeterminado en el protocolo. Este punto predeterminado es un punto temporal final, también conocido como punto final o segundo punto temporal. En algunas realizaciones, el segundo punto temporal se alcanza (318-Yes) una o más horas, dos o más horas, diez o más horas, entre tres horas y cien horas, o menos de veinte horas después de que se tomara la medición inicial en la etapa 302. En algunas realizaciones, el segundo punto temporal se alcanza (318-Yes) cuando se han realizado entre 10 y 50.000, entre 100 y 10.000, o 150 y 5.000, más de 10, más de cincuenta, o más de 100 mediciones del estado biológico del cultivo en el recipiente en las instancias de la etapa 308. Si no se ha alcanzado el punto predeterminado en el protocolo (318-No), el control del procedimiento retorna a la etapa 306, donde el control del procedimiento espera la frecuencia temporal t para avanzar antes de iniciar otra instancia de la etapa 308 en la que se mide de nuevo el estado biológico del cultivo y se utiliza para calcular un valor relativo de normalización. Si se ha alcanzado el punto predeterminado en el protocolo (318-Yes), el control de procedimiento pasa a la etapa 320.

En la etapa 320, se determinar el valor de la tasa metabólica máxima 57 alcanzado por el cultivo. En algunas realizaciones, se considera que la tasa metabólica máxima 57 es un valor de transformación relativo medio máximo 66 calculado en cualquier instancia de la etapa 316 para el cultivo. Por ejemplo, si el valor de transformación relativo medio máximo 66 calculado alguna vez para el cultivo durante una instancia de la etapa 316 es 250, se considerará que el valor de la tasa metabólica máxima 57 para el cultivo es 250.

En la etapa 322, se determina el grado de crecimiento 58 del cultivo. En algunas realizaciones, el grado de crecimiento (GC) 58 se determina mediante la ecuación:

$$GC = NR_{\text{después_crecimiento}} - NR_{\text{crecimiento_mínimo}} \quad \text{Ec. 1}$$

En algunas realizaciones, $NR_{\text{después_crecimiento}}$ de la Ec. 1 es un valor relativo normalización en la pluralidad de valores relativos de normalización que se utilizó en el cálculo del valor de transformación relativo medio máximo 66 alcanzado alguna vez para el cultivo. Por lo tanto, si los valores relativos de normalización 135 a 144 se utilizaron

para calcular el valor de transformación relativo medio máximo 66, $NR_{\text{después_crecimiento}}$ sería uno de los valores relativos de normalización en el conjunto de valores relativos de normalización {135,..., 144}.

5 En algunas realizaciones, $NR_{\text{después_crecimiento}}$ de la Ec. 1 es un valor relativo de normalización en la pluralidad de valores relativos de normalización que se utilizó en el cálculo del valor de transformación relativo medio 66 después del valor de transformación relativo medio máximo 66 alcanzado alguna vez para el cultivo. Por lo tanto, si los valores relativos de normalización 145 a 154 se utilizaron para calcular el valor de transformación relativo medio 66 después del valor de transformación relativo medio máximo 66, $NR_{\text{después_crecimiento}}$ sería uno de los valores relativos de normalización en el conjunto de valores relativos de normalización {145,..., 154}.

10 En algunas realizaciones, $NR_{\text{después_crecimiento}}$ de la Ec. 1 es un valor relativo de normalización en la pluralidad de valores relativos de normalización que se utilizó en el cálculo del valor de transformación relativo medio 66 que precede al valor de transformación relativo medio máximo 66 alcanzado alguna vez para el cultivo. Por lo tanto, si los valores relativos de normalización 125 a 134 se utilizaron para calcular el valor de transformación relativo medio 66 inmediatamente anterior al valor de transformación relativo medio máximo 66, $NR_{\text{después_crecimiento}}$ sería uno de los valores relativos de normalización en el conjunto de valores relativos de normalización {125,..., 134}.

15 En algunas realizaciones, $NR_{\text{después_crecimiento}}$ de la Ec. 1 es una medida de tendencia central de la totalidad o una parte de los valores relativos de normalización que se utilizaron en el cálculo del valor de transformación relativo medio máximo 66 alcanzado alguna vez para el cultivo. Por lo tanto, si los valores relativos de normalización 135 a 144 se utilizaron para calcular el valor de transformación relativo medio máximo 66, $NR_{\text{después_crecimiento}}$ sería una medida de tendencia central (media geométrica, media aritmética, mediana, o moda) de la totalidad o una parte de los valores relativos de normalización en el conjunto de valores relativos de normalización {135,..., 144}.

20 En algunas realizaciones, $NR_{\text{después_crecimiento}}$ de la Ec. 1 es una medida de tendencia central de la totalidad o una parte de los valores relativos de normalización que se utilizaron en el cálculo del valor de transformación relativo medio 66 después del valor de transformación relativo medio máximo 66 alcanzado alguna vez para el cultivo. Por lo tanto, si los valores relativos de normalización 145 a 154 se utilizaron para calcular el valor de transformación relativo medio 66 después del valor de transformación relativo medio máximo 66, $NR_{\text{después_crecimiento}}$ sería una medida de tendencia central (media geométrica, media aritmética, mediana, o moda) de la totalidad o una parte de los valores relativos de normalización en el conjunto de valores relativos de normalización {145,..., 154}.

25 En algunas realizaciones, $NR_{\text{después_crecimiento}}$ de la Ec. 1 es una medida de tendencia central de la totalidad o una parte de los valores relativos de normalización que se utilizaron en el cálculo del valor de transformación relativo medio 66 que precede al valor de transformación relativo medio máximo 66 alcanzado alguna vez para el cultivo. Por lo tanto, si los valores relativos de normalización 125 a 134 se utilizaron para calcular el valor de transformación relativo medio 66 inmediatamente anterior al valor de transformación relativo medio máximo 66, $NR_{\text{después_crecimiento}}$ sería una medida de tendencia central (media geométrica, media aritmética, mediana, o moda) de la totalidad o una parte de los valores relativos de normalización en el conjunto de valores relativos de normalización {125,..., 134}.

30 En algunas realizaciones, $NR_{\text{crecimiento_mínimo}}$ es un valor relativo de normalización en la pluralidad de valores relativos de normalización que se utilizó en el cálculo de el primer valor de transformación relativo medio 66 para alcanzar un valor umbral. Por lo tanto, si los valores relativos de normalización 20 a 29 se utilizaron para calcular el primer valor de la transformación relativo medio 66 para alcanzar un valor umbral, $NR_{\text{crecimiento_mínimo}}$ sería uno de los valores relativos de normalización en el conjunto de valores relativos de normalización {20,..., 29}.

35 En algunas realizaciones, $NR_{\text{crecimiento_mínimo}}$ es una medida de tendencia central de los valores relativos de normalización que se utilizaron en el cálculo del primer valor de transformación relativo medio 66 para alcanzar un valor umbral. Por lo tanto, si los valores relativos de normalización 20 a 29 se utilizaron para calcular el primer valor de la transformación relativo medio 66 para alcanzar un valor umbral, $NR_{\text{crecimiento_mínimo}}$ sería la totalidad o una parte de los valores relativos de normalización en el conjunto de valores relativos de normalización {20,..., 29}.

40 En algunas realizaciones cuando se utiliza la Ecuación 1 para el cálculo del grado de crecimiento 58, el valor umbral es, en ejemplos no limitantes, un valor entre 5 y 100, un valor entre 25 y 75, un valor entre 1 y 1000, o un valor que es menor de 50.

En algunas realizaciones, el grado de crecimiento (GC) 58 se determina por medio de la ecuación:

$$GC = ART_{\text{max}} * (\text{tiempo}_{ART_{\text{max}}} - \text{tiempo}_{\text{inicial}}) \quad \text{Ec. 2}$$

45 donde ART_{max} es un valor de transformación relativo medio máximo 66 alcanzado por el cultivo y el $\text{tiempo}_{ART_{\text{max}}}$ es una duración de tiempo entre (a) el punto temporal inicial en el se midió que el estado biológico del cultivo en la frecuencia temporal 302 y (b) un punto temporal en el que se midió un valor relativo normalización utilizado en el cálculo de (i) el primer valor de transformación relativo medio después del valor de transformación relativo medio máximo, (ii) el valor de transformación relativo medio máximo, o (iii) el primer valor de transformación relativo medio que precede al valor de transformación relativo medio máximo determinado para el cultivo por las instancias de la etapa 316. Adicionalmente, el $\text{tiempo}_{\text{inicial}}$ es una duración del tiempo entre (i) el punto temporal inicial en el que se midió el estado biológico del cultivo en la frecuencia temporal 302 y (ii) un punto temporal en el que se midió un valor

relativo normalización, utilizado en el cálculo del primer valor de transformación relativo medio para alcanzar un valor umbral.

5 En algunas realizaciones en las que se utiliza la Ecuación 2 para calcular grado de crecimiento 58, el valor umbral es, en ejemplos no limitantes, un valor entre 5 y 100, un valor entre 25 y 75, un valor entre 1 y 1000, o un valor que es menor de 50.

En algunas realizaciones, el grado de crecimiento (GC) 58 se determina por medio de la ecuación:

$$GC = [ART_{max} * (tiempo_{ART_{max}} - tiempo_{inicial})] / tiempo_{inicial} \quad \text{Ec. 3}$$

10 donde los valores para ART_{max} , $tiempo_{ART_{max}}$, y el $tiempo_{inicial}$ son los proporcionados para la Ecuación 2. En algunas realizaciones en las que se utiliza la ecuación 3 para calcular grado de crecimiento 58, el valor umbral es, en ejemplos no limitantes, un valor entre 5 y 100, un valor entre 25 y 75, un valor entre 1 y 1000, o un valor que es menor de 50.

15 Los valores ART_{max} , $tiempo_{ART_{max}}$, $tiempo_{inicial}$, $NR_{después_crecimiento}$, y $NR_{crecimiento_mínimo}$ utilizados en las Ecuaciones 1, 2, o 3 se pueden multiplicar individualmente por cualquier número real siempre que se utilice el mismo formalismo en la construcción de la medida de referencia de valores de crecimiento de 58 para la tabla de consulta 54 opcional. Más en general, cualquiera de las ecuaciones 1, 2, o 3 pueden contener operaciones matemáticas adicionales, tanto lineales como no lineales, y todavía ser utilizada para calcular el grado de crecimiento de 58 con la condición de que se utilicen las mismas operaciones matemáticas cuando se construya la medida de referencia de los valores de crecimiento 58 para la tabla de consulta 54. La medida de referencia de los valores de crecimiento 58, y el valor de la tasa metabólica máxima 57 se calculan para la tabla de consulta 54 utilizando cultivos que contienen microorganismo de tipo conocido.

25 En la etapa 324, el valor metabólico máximo tasa de 57 para el cultivo, determinado en la etapa 320, y el grado de crecimiento 58 del cultivo, determinado en la etapa 322, se utilizan para determinar la identidad de los microorganismos infectantes. En algunas realizaciones de la etapa 342, el valor de la tasa metabólica máxima 57 para el cultivo, determinado en la etapa 320, y el grado de crecimiento 58 del cultivo, determinado en la etapa 322, se comparan con los valores de la tabla de consulta 54 que coinciden con la tasa metabólica máxima 57 y el grado de crecimiento 58 para un microorganismo tipo 59, determinando de ese modo el tipo de microorganismo en el cultivo en el recipiente. Como ilustración, considérese el caso en el que el valor de la tasa metabólica máxima 57 para el cultivo es "200" y el grado de crecimiento 58 del cultivo es "450" y la tabla de consulta de valores 54 tiene los siguientes valores:

Tasa metabólica máxima 56	Grado de crecimiento 58	Tipo de Microorganismo 59
150	400	X
200	455	Y
254	502	Z

30 En este ejemplo, se considerará que el tipo de microorganismo 59 para el cultivo es el tipo Y debido a que los valores (200, 455) en la tabla de consulta 54 son los valores que más se acercan a los valores observados para la tasa metabólica máxima y grado de crecimiento (200, 450). Este ejemplo ilustra una realización preferida de la presente invención en el que se considera que el conjunto de valores 56 (tasa metabólica máxima 57, grado de crecimiento 58) en la tabla de consulta 54 que más se acerca a la tasa metabólica máxima 57 y el grado de crecimiento 58 observados para un cultivo de ensayo es el conjunto de valores coincidentes y por lo tanto se considera que el cultivo de ensayo es el tipo de microorganismo 59 en la tabla de consulta 54 que corresponde a este conjunto de valores coincidentes. En algunas realizaciones, no se utiliza una tabla de consulta. En tales realizaciones, el valor de la tasa metabólica máxima 57 para el cultivo, determinado en la etapa 320, y el grado de crecimiento 58 del cultivo, determinado en la etapa 322 se utilizan en uno o más clasificadores entrenados u otras formas de ecuaciones (p. ej., ecuaciones de regresión) que son capaces de identificar microorganismos basándose en el valor de la tasa metabólica máxima 57 y el grado de crecimiento 58 para el cultivo.

45 En algunas realizaciones, la etapa 324 identifica el tipo de microorganismo 59 en el cultivo en el recipiente como (i) una bacteria de la familia Enterobacteriaceae o (ii) una bacteria que no es de la familia Enterobacteriaceae basándose en la tasa metabólica máxima 57 y el grado de crecimiento 58 del cultivo de ensayo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, esto se realiza comparando la tasa metabólica máxima 57 y el grado de crecimiento 58 del cultivo de ensayo con un valor en la tabla de consulta 54. En otras realizaciones, esto se realiza utilizando la tasa metabólica máxima 57 y el grado de crecimiento de 58 en uno o más clasificadores entrenados y/u otras formas de ecuaciones que tienen en cuentas valores de la tasa metabólica máxima 57 y el grado de crecimiento 58 de un microorganismo conocido en cultivo. En algunas realizaciones, la etapa 324 identifica el tipo de microorganismo 59 como bacterias basándose en la tasa metabólica máxima 57 y el grado de crecimiento 58 del cultivo de ensayo. En

- 5 algunas realizaciones, la etapa 324 identifica el tipo de microorganismo 59 como bacterias basándose en la comparación de la tasa metabólica máxima 57 y el grado de crecimiento 58 del cultivo de ensayo con valores de la tabla de consulta 54. En algunas realizaciones, la etapa 324 identifica el tipo de microorganismo como (i) Enterobacteriaceae, (ii) Staphylococcaceae, (iii) Streptococcus, o (iv) Acinetobacter basándose en la tasa metabólica máxima 56 y el grado de crecimiento 58 del cultivo de ensayo. En algunas realizaciones, la etapa 324 identifica el tipo de microorganismo como (i) Enterobacteriaceae, (ii) Staphylococcaceae, (iii) Streptococcus, o (iv) Acinetobacter basándose en la comparación de la tasa metabólica máxima 56 y el grado de crecimiento 58 del cultivo de ensayo con valores de la tabla de consulta 54. En algunas realizaciones, la etapa 324 identifica el tipo de microorganismo 59 como un único género de las Enterobacteriaceae seleccionado del grupo que consiste en *Alishewanella*, *Alterococcus*, *Aquamonas*, *Aranicola*, *Arsenophonus*, *Azotivirga*, *Blochmannia*, *Brenneria*, *Buchnera*, *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Dickeya*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Ewingella*, *Griimontella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Candidatus Phlomobacter*, *Photorhabdus*, *Plesiomonas*, *Pragia*, *Proteus*, *Providencia*, *Rahnella*, *Raoultella*, *Salmonella*, *Samsonia*, *Serratia*, *Shigella*, *Sodalis*, *Tatumella*, *Trabulsiella*, *Wigglesworthia*, *Xenorhabdus*, *Yersinia*, y *Yokenella* basándose en la comparación de la tasa metabólica máxima 56 y el grado de crecimiento 58 del cultivo de ensayo. En algunas realizaciones, la etapa 324 identifica el tipo de microorganismo 59 como un único género de Enterobacteriaceae seleccionado del grupo que consiste en *Alishewanella*, *Alterococcus*, *Aquamonas*, *Aranicola*, *Arsenophonus*, *Azotivirga*, *Blochmannia*, *Brenneria*, *Buchnera*, *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Dickeya*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Ewingella*, *Griimontella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Candidatus Phlomobacter*, *Photorhabdus*, *Plesiomonas*, *Pragia*, *Proteus*, *Providencia*, *Rahnella*, *Raoultella*, *Salmonella*, *Samsonia*, *Serratia*, *Shigella*, *Sodalis*, *Tatumella*, *Trabulsiella*, *Wigglesworthia*, *Xenorhabdus*, *Yersinia*, y *Yokenella* basándose en la comparación de la tasa metabólica máxima 56 y el grado de crecimiento 58 del cultivo de ensayo con valores de la tabla de consulta 54.
- 25 En algunas realizaciones, la etapa 324 identifica el tipo de microorganismo 59 como una única especie de Staphylococcaceae seleccionada del grupo que consiste en bacterias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus pettenkoferi*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus warneri*, y *Xylosus Staphylococcus*. En algunas realizaciones, la etapa de determinación identifica el tipo de microorganismo como una sola especie de Streptococcus seleccionada del grupo que consiste en *S. agalactiae*, *S. bovis*, *S. mutans*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. suis*, *Streptococcus viridans*, y *Streptococcus uberis* basándose en la tasa metabólica máxima 56 y el grado de crecimiento 58 del cultivo de ensayo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la etapa 324 identifica el tipo de microorganismo como una única especie de Streptococcus seleccionada del grupo que consiste en *S. agalactiae*, *S. bovis*, *S. mutans*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. suis*, *Streptococcus viridans*, y *Streptococcus uberis* basándose de la comparación de la tasa metabólica máxima 56 y el grado de crecimiento 58 del cultivo de ensayo con valores de la tabla de consulta 54.
- 40 En algunas realizaciones, la etapa 324 identifica el tipo de microorganismo como aerobio basándose en la tasa metabólica máxima 56 y el grado de crecimiento 58. En algunas realizaciones, la etapa 324 identifica el tipo de microorganismo 59 como anaerobio basándose de la tasa metabólica máxima 57 y el grado de crecimiento 58 del cultivo de ensayo. En algunas realizaciones, la etapa 324 identifica el tipo de microorganismo como aerobio basándose en la comparación de la tasa metabólica máxima 56 y el grado de crecimiento 58 con valores de la tabla de consulta 54. En algunas realizaciones, la etapa 324 identifica el tipo de microorganismo 59 como anaerobio basándose en la comparación de la tasa metabólica máxima 57 y el grado de crecimiento 58 del cultivo de ensayo con valores de la tabla de consulta 54.
- 45 En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente la salida de una identificación del tipo de microorganismo en cultivo 68 a un dispositivo de interfaz de usuario (p. ej., 32), un monitor (p. ej., 26), un medio de almacenamiento legible por ordenador (p. ej., 14 o 36), una memoria legible por ordenador (p. ej., 14 o 36), o un sistema informático local o remoto. En algunas realizaciones se visualiza una identificación del tipo de microorganismo en el cultivo 68. Según se utiliza en la presente memoria, el término sistema informático local significa un sistema informático que se conecta directamente al aparato 11. Según se utiliza en la presente memoria, el término sistema informático remoto significa un sistema informático que está conectado a un aparato 11 por medio de una red tal como Internet.

5.4 Productos del programa informático y ordenadores ilustrativos

- 55 La presente invención puede ser implementada como un producto de programa informático que comprende un mecanismo de programa informático incorporado en un medio de almacenamiento legible por ordenador. Adicionalmente, cualquiera de los métodos de la presente invención puede implementarse en uno o más ordenadores. Más aún, cualquiera de los métodos de la presente invención puede implementarse en uno o más productos de programas informáticos. Algunas realizaciones de la presente invención proporcionan un producto de programa informático que codifica cualquiera o todos los métodos descritos en la presente memoria. Tales métodos pueden ser almacenados en un CD-ROM, DVD, producto de almacenamiento en disco magnético, o cualquier otro producto de almacenamiento de datos o programas legible por ordenador. Tales métodos también se pueden incorporar a un almacenamiento permanente, tal como ROM, uno o más chips programables, o uno o más circuitos

integrados específicos de aplicación (ASIC). Tal almacenamiento permanente puede estar localizado en un servidor, punto de acceso 802.11, puente inalámbrico/estación 802.11, repetidor, router, teléfono móvil u otros dispositivos electrónicos. Tales métodos codificados en el producto de programa informático también pueden ser distribuidos electrónicamente, a través de Internet o de otra manera.

5 Algunas realizaciones de la presente invención proporcionan un producto de programa informático que contiene cualquiera o todos los módulos de programa y estructuras de datos que se muestran en la Figura 1. Estos módulos de programa se pueden almacenar en un CD-ROM, DVD, productos de almacenamiento en disco magnético, o cualquier otro producto de almacenamiento de datos o programas legible por ordenador. Los módulos del programa también se pueden incorporar a un almacenamiento permanente, tal como ROM, uno o más chips programables, o
 10 uno o más circuitos integrados específicos de aplicación (ASIC). Tal almacenamiento permanente puede estar localizado en un servidor, punto de acceso 802.11, puente inalámbrico/estación 802.11, repetidor, router, teléfono móvil u otros dispositivos electrónicos. Los módulos del soporte lógico en el producto de programa informático también pueden ser distribuidos electrónicamente, a través de Internet o de otra manera.

5.5 Kits

15 Algunas realizaciones de la invención también pueden comprender un kit para realizar cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria. En un ejemplo no limitante, los recipientes, el cultivo para una muestra, los agentes adicionales, y el soporte lógico para llevar a cabo cualquier combinación de los métodos descritos en la presente memoria pueden estar comprendidos en un kit. Los kits comprenderán por lo tanto uno o más de estos reactivos en medios contenedores adecuados.

20 Los componentes de los kits, distintos del soporte lógico, los recipientes, y el sistema radiométrico o no radiométrico, pueden envasarse o bien en medio acuoso o en forma liofilizada. Los medios contenedores adecuados de los kits incluirán generalmente al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, botella, jeringa u otro medio contenedor, en el que se pueda colocar un componente y, preferiblemente, dividido en alícuotas de forma adecuada. Cuando hay más de un componente en el kit, el kit también contendrá generalmente un segundo, un tercer u otro contenedor adicional en
 25 el que pueden ser colocados por separado los componentes adicionales. Sin embargo, varias combinaciones de componentes pueden estar en un vial. Los kits de la presente invención también incluirán típicamente un medio para contener los contenedores de reactivo en un confinamiento cerrado para la venta comercial. Tales contenedores pueden incluir contenedores para inyectables o de plástico moldeados por soplado en los que se conservan los viales deseados.

30 6 Ejemplo

Se ha desarrollado una prueba de identificación del organismo presuntivo para cualquier sistema de cultivo diseñado para el cultivo de una muestra biológica (en adelante "cultivo") para determinar la presencia de microorganismos desconocidos con el uso pretendido de determinar la presencia y la identificación de un microorganismo en el cultivo. El principio es un cultivo inoculado en uno o más viales de cultivo, los viales se introducen en un aparato 11 y el
 35 aparato supervisa los viales para determinar la presencia de la actividad metabólica (la producción de dióxido de carbono u otros metabolitos que se acumulan o el consumo de sustrato tal como oxígeno) o la acumulación de material celular (mediante la medición de la acumulación de células microbianas). El sistema de cultivo de sangre BACTEC[®] es un ejemplo de tal aparato 11. El sistema de cultivo de sangre BACTEC[®] utiliza sensores fluorescentes que informan sobre cambios en el sistema cuando se produce metabolismo microbiano. El algoritmo representado en la Figura 3 se aplica a continuación a la secuencia de datos de la señal. El algoritmo se diseñó para reconocer cambios en la señal con el tiempo que fueran indicativos de la presencia de microorganismos en crecimiento. El usuario es notificado cuando el sistema reconoce evidencia de crecimiento (cambio de estado a un vial positivo) y a continuación el recipiente se procesa para determinar la presencia de un organismo (tinción de Gram y subcultivo en un medio de cultivo en placa). El algoritmo de la invención utiliza las diferencias en la tasa de crecimiento y el grado de crecimiento para proporcionar información sobre los microorganismos presentes y el crecimiento en el cultivo. Esta información, junto con una tabla de consulta que registra una información similar acerca de microorganismos conocidos, da como resultado la identificación del tipo de microorganismo en el cultivo.

Los datos que se recogen con el sistema de cultivo de sangre BACTEC[®] se utilizan como un ejemplo de la aplicación de la transformación de datos de la invención ilustrada en la Figura 3 y proporcionan ejemplos de la
 50 utilidad de la presente invención. El sistema BACTEC[®], como se ha descrito anteriormente, utiliza sensores fluorescentes para controlar los cambios en la actividad metabólica dentro del cultivo a través de una corriente de datos de la señal de fluorescencia compensados que se recoge a intervalos de diez minutos desde un sensor situado en el interior del reactivo del cultivo. Los datos utilizados en este ejemplo se recogen de los instrumentos BACTEC[®] utilizados ya sea en estudios de cultivo sembrado internos o recolectados durante una evaluación clínica del sistema. Los datos se clasifican y se recogen en una base de datos de Becton Dickinson que incluye la identificación del recipiente (mediante la secuencia y los números de acceso), un registro de las fechas de la inoculación, la cantidad de sangre en la muestra (es un sistema de cultivo de sangre) y el resultado con la identificación del microorganismo encontrado en el recipiente (la identificación del organismo es proporcionada por el sitio clínico en el caso de los datos externos). El algoritmo ilustrado en la Figura 3 se aplica posteriormente para el
 60 análisis. La utilidad de esta información es como identificación presuntiva en tipos de organismos estrechamente

relacionados. En este ejemplo, los microorganismos de cultivos de sangre clínica se caracterizan en cuatro tipos de microorganismos diferentes: Enterobacteriaceae, (ii) Staphylococcaceae, (iii) Streptococcus, o (iv) Acinetobacter. Las especies estrechamente relacionadas de microorganismos que son indicativas de estas clasificaciones generales de microorganismos se separan entre sí (*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* separados entre sí y *Staphylococcus aureus* y estafilococos coagulasa negativos separados entre sí). En algunos casos, las especies individuales de microorganismos se pueden identificar con un alto grado de confianza. El principio fundamental para la utilización de estos datos para la identificación presuntiva es que el tipo de procesos metabólicos que estos microorganismos poseen y la bioenergética relativa de estos diferentes tipos de microorganismos se pueden distinguir mediante el control de una variedad de funciones de tasas asociadas con el crecimiento en condiciones definidas.

Las transformaciones de datos de la invención comienzan con una normalización inicial de la señal del recipiente a una salida específica (su estado inicial después de entrar en el sistema), como se ha descrito anteriormente con respecto a las etapas 302 y 304 de la Figura 3. Todos los datos siguientes se representan como un porcentaje de la señal inicial, que se ha estandarizado a 100 por ciento en estos análisis, como se indica en las etapas 306 y 308 de la Figura 3. Las mediciones de datos normalizadas por la señal inicial se denominan valores relativos de normalización. En condiciones teóricas ideales, un valor relativo de normalización de 125 significa que el metabolismo del microorganismo ocasiona la fluorescencia medida por el sensor BACTEC® para aumentar 25 por ciento con respecto a la medición inicial. El siguiente valor que se calcula es la primera derivada del valor de NR, ya que éste cambia con el tiempo como se indica en las etapas 310 y 312 de la Figura 3. Este valor es el valor de transformación de la tasa (RT) y el valor RT base utilizado en este ejemplo utiliza un límite de periodicidad de 70 minutos. Cualquier valor RT dado representa la tasa de cambio de porcentaje de señal de fluorescencia durante los setenta minutos anteriores de su cálculo. El siguiente valor que se calcula es ART o valor de cambio de tasa medio como se indica en las etapas 314 y 316 de la Figura 3. Esto se calcula como la media de los 7 valores ART previos que se han calculado y actuó como una función de suavizado del valor RT.

Los ejemplos de los parámetros que se calculan para determinar la identidad de un tipo de microorganismo que infecta un cultivo se presentan en las Figuras 4, 5 y 6. Se analiza un cultivo de *Escherichia coli* utilizando estos indicadores cuantitativos (los valores relativos normalizados 50, los valores de transformación de tasas 62, y los valores de transformación relativos medios 66. El cultivo contiene tres mililitros de sangre humana de un sujeto y se inocula con una suspensión de *E. Coli* (55 UFC) y se introduce en un instrumento BACTEC® 9000. El identificador 4942 es el único que identifica el cultivo del que se informa en las Figuras 4, 5, y 6 y se puede utilizar para vincular los datos para este cultivo a una base de datos de investigación y desarrollo BACTEC®. La Figura 4 muestra un gráfico de los valores relativos de normalización a lo largo del tiempo. El recipiente se introduce en el instrumento y los efectos de la temperatura con respecto al equilibrio del recipiente se observan durante aproximadamente la primera hora. La señal estabilizada y el fondo se observan para incrementar de 94 por ciento a 95 por ciento la señal inicial durante la primera hora (esta tasa se debe a la actividad de la sangre). En el gráfico relativo de normalización (Figura 4), el crecimiento es visible comenzando a las ocho horas y continúa hasta las 15 horas con un valor final de NR próximo a 126. El gráfico de los valores de transformación relativos medios 66 a lo largo del tiempo basándose en la tasa media de cambio en los valores transformación de tasas 62 de la Figura 4 a lo largo del tiempo se proporciona en la Figura 5. Cada valor de transformación relativo medio (ART) 66 es una medida de la tasa media de cambio y ART máximo de este cultivo es de 1158 lograda a la 12,8 horas en el cultivo. Esto representa que el máximo promediado por este cultivo alcanza la tasa de cambio del sensor a lo largo de un período de una hora. La Figura 6 es el segundo gráfico de la derivada de los valores relativos de normalización 50 y muestra los cambios en la tasa con el tiempo. Esta es una interpretación gráfica que muestra los siguientes puntos críticos: el punto de aceleración inicial 602 (movimiento desde el nulo), el punto de máxima aceleración 604 (el máximo), donde la aceleración alcanza su máximo (que cruza el punto nulo), el punto máximo de desaceleración (el mínimos) 606, y el final de la curva de crecimiento de 608 (donde el cambio de tasa vuelve a nulo).

Las características de crecimiento que utilizan las transformaciones de datos identificadas anteriormente (valores de transformación de tasas 60, valor de transformación relativa media 66, y los valores relativos de normalización) para la identificación presuntiva del tipo de microorganismo son la tasa metabólica máxima y grado de crecimiento. En este ejemplo, la tasa metabólica máxima (ARTmax) se definió como el valor máximo ART 66 alcanzado (en este ejemplo, la tasa metabólica máxima fue de 1158).

En este ejemplo, el grado de crecimiento (GC) se determinó como

$$GC = NR_{\text{después_crecimiento}} - NR_{\text{crecimiento_mínimo}} \quad \text{Ec. 1}$$

que es la diferencia del valor relativo de normalización (NR) antes del crecimiento ($NR_{\text{crecimiento_mínimo}}$) y después del crecimiento ($NR_{\text{después_crecimiento}}$). Para estandarizar la definición de antes y después del crecimiento, se utilizó el siguiente formalismo para determinar los puntos que representan antes del crecimiento ($NR_{\text{crecimiento_mínimo}}$) y después del crecimiento ($NR_{\text{después_crecimiento}}$). $NR_{\text{crecimiento_mínimo}}$ fue definido como el punto donde el crecimiento era discernible de la señal de fondo. El punto temporal en el que $NR_{\text{crecimiento_mínimo}}$ se midió fue denominado tiempo_{inicial}. Un valor ART 66 de valor 50 definió el inicio del crecimiento (este tiempo se correlaciona fuertemente con el tiempo de detección para la mayoría de los cultivos en el sistema BACTEC®). Se utilizó un punto definido después de ART máximo para definir el punto de comparación del grado de crecimiento $NR_{\text{después_crecimiento}}$. Por supuesto, se podrían utilizar otros formalismos para determinar los puntos que representan antes y después del crecimiento con el fin de

determinar el grado de crecimiento y todos estos formalismos están dentro del alcance de la presente invención. En el ejemplo de *E. Coli* ilustrado en la Figura 4, el tiempo para NR = 50 es de 9,6 horas y esto corresponde a un valor de NR 95,7. De este modo, $NR_{\text{crecimiento_mínimo}}$ fue 95,7. A partir de la Figura 5, se observó que el tiempo para el primer punto después del máximo de ART, referido en este ejemplo como $\text{tiempo}_{\text{ARTmax}}$, fue 12,3 horas. A partir de la Figura 4, 12,3 horas corresponde a un valor de NR = 119,5. De este modo, $NR_{\text{después_crecimiento}}$ fue 119,5. Por lo tanto, el grado de crecimiento determinado para este cultivo fue de 119,5 - 95,7 que es igual a 23,8 NR (que es igual al cambio de porcentaje en la señal a lo largo del período definido). Adicionalmente, a partir de la Figura 5 se observó que la tasa de crecimiento máximo es de 1158 ART. Estos valores para la tasa de crecimiento máximo y el grado de crecimiento se compararon con una tabla de consulta 54 que contiene conjuntos de valores de referencia 56 para la tasa metabólica máxima 57 y para el grado de crecimiento 58. Se consideró que el tipo de microorganismo 59 que correspondía al conjunto de valores 56 que más se aproximaban a los valores determinados experimentalmente para una tasa de crecimiento máximo y el grado de crecimiento era el tipo de microorganismo para el cultivo.

Otro valor que se utilizó para determinar el grado de crecimiento fue:

$$GC = \text{ARTmax} * (\text{tiempo}_{\text{ARTmax}} - \text{tiempo}_{\text{inicial}}) \quad \text{Ec. 2}$$

en la que ARTmax se multiplicó por la diferencia de tiempo ($\text{tiempo}_{\text{ARTmax}} - \text{tiempo}_{\text{inicial}}$), donde el $\text{tiempo}_{\text{ARTmax}}$ se definió como el tiempo hasta el primer punto después de ARTmax y el $\text{tiempo}_{\text{inicial}}$ se definió como el punto donde NR alcanzó un valor de 50. Este valor para el grado de crecimiento se pudo utilizar junto con o en lugar del grado de crecimiento calculado utilizando la ecuación 1. Para este ejemplo, el grado de crecimiento definido por la Ecuación 2 tuvo un valor de 3281.

En algunas realizaciones, el grado de crecimiento (GC) 58 se determinó mediante la ecuación:

$$GC = [\text{ARTmax} * (\text{tiempo}_{\text{ARTmax}} - \text{tiempo}_{\text{inicial}})] / \text{tiempo}_{\text{inicial}} \quad \text{Ec. 3}$$

donde los valores para ARTmax, $\text{tiempo}_{\text{ARTmax}}$, y $\text{tiempo}_{\text{inicial}}$ son los proporcionados para las Ecuaciones 1 y 2. Para este ejemplo, el grado de crecimiento definido por la ecuación 3 tuvo un valor de 353.

La Tabla 1 es una lista de 96 productos aislados clínicamente significativos que se detectaron en la reciente evaluación clínica del sistema BACTEC[®]. Los datos instrumentados se recogieron y se enviaron a Becton Dickinson para el análisis de datos. La Tabla 1 contiene los datos de las tasas incluyendo los cálculos de descriptores clave mencionados anteriormente (p. ej., grado de crecimiento, tasa metabólica máxima). Estos datos son representativos de los microorganismos que se recuperan de forma rutinaria de la sangre. En la Tabla 1, la columna 1 es un identificador de cultivo único, la columna 2 es una indicación del microorganismo identificado en el cultivo (ENTFA1 es *Enterococcus faecalis*, ENTCAA es *Enterococcus faecium*, STRSANGR es el grupo de *Streptococcus sanguinus*, STRAHE es *Streptococcus Alfa hemolítico*, STRAGA es *Streptococcus agalactiae*, ESCCOL es *Escherichia coli*, SAUR es *Staphylococcus aureus*, STACNEG es *Staphylococcus coagulasa negativo*, PROTMR es *Proteus mirabilis*, KLEPNEP es *Klebsiella pneumoniae*, NEIMEN es *Neisseria Meningitidis*, y ACINBAU es *Acinetobacter Baumannii*), la columna 3 es un tiempo de inicialización en horas, la columna 4 es un valor para el valor de ART máximo alcanzado por el cultivo, la columna 5 es el tiempo para alcanzar el valor ART máximo en horas, la columna 6 es el tiempo que se tardó en alcanzar a un valor ART de 50 en horas, la columna 7 es el tiempo que se tardó en alcanzar a un valor ART de 20 en horas, la columna 8 es la diferencia entre el tiempo que se tardó en alcanzar el valor de ART máximo menos el tiempo que se tardó en alcanzar un valor de ART de 50 en horas, la columna 9 es la razón entre el valor de ART máximo y el valor de transformación de tasas máximo, la columna 10 es el valor de ARTmaxInterval50 que se calcula como ARTmax multiplicada por la diferencia en el tiempo entre (i) el tiempo que se tardó en alcanzar ARTmax y (ii) el tiempo que se tardó en alcanzar un valor de ART de 50, y la columna 11 es ARTmaxInterval50 dividido por el tiempo que tardó el cultivo para llegar a un valor de ART de 50 en horas (el valor de la columna 10 dividido por el tiempo que se tardó en alcanzar un valor de ART de 50 en horas).

Secuencia (Columna 1)	Producto aislado (Columna 2)	TTD (Columna 3)	ARTMax (Columna 4)	Tiempo ARTMax (Columna 5)	Tiempo ART @ 50 (Columna 6)	Tiempo ART @ 20 (Columna 7)	Tiempo ARTMax - Tiempo ART @ 50 (columna 8)	Razón ARTM_TARTMax (Columna 9)	Intervalo 50 (columna 10)	Int50_TT Art50 (Columna 11)
1	ENTCFAI	10,00	687,07	11,57	9,40	8,38	2,17	59,39	1489,02	158,39
2	ENTCFAA	14,10	566,33	16,35	14,02	13,35	2,33	34,63	1321,76	94,28
3	ENTCFAA	9,70	348,38	10,43	6,75	6,21	3,69	33,40	1284,06	190,34
4	ENTCFAA	10,80	741,87	13,22	10,88	10,21	2,34	56,13	1735,83	159,59
5	ENTCFAA	12,40	372,63	15,44	12,10	11,10	3,34	24,13	1245,81	102,97
6	ENTCFAA	28,20	250,28	31,74	27,54	26,37	4,20	7,89	1050,90	38,16
7	ENTCFAA	12,50	892,42	14,86	12,19	11,36	2,67	60,06	2380,26	195,23
8	ENTCFAI	10,60	889,70	12,69	10,52	9,69	2,17	70,09	1931,36	183,54
9	STRSANGR	11,30	727,77	12,67	10,67	10,34	2,00	57,42	1455,69	136,38
10	STRANG	21,10	560,87	24,10	21,27	20,60	2,83	25,99	1775,15	83,47
11	STRAHE	14,20	971,12	15,95	13,45	10,44	2,50	35,16	1402,62	104,28
12	STRAGA	7,80	1097,53	9,19	7,02	3,69	2,17	105,69	2104,90	299,80
13	STRAGA	8,80	1133,48	10,19	8,19	7,52	2,00	107,73	2195,94	268,19
14	ESCCOL	11,00	1065,62	12,76	10,18	8,84	2,58	88,82	2925,06	287,31
15	ESCCOL	9,10	1121,82	11,18	8,84	7,85	2,34	95,31	2494,40	282,14

Secuencia (Columna 1)	Producto aislado (Columna 2)	TTD (Columna 3)	ARTMax (Columna 4)	Tiempo ARTMax (Columna 5)	Tiempo ART @ 50 (Columna 6)	Tiempo ART @ 20 (Columna 7)	Tiempo ARTMax - Tiempo ART @ 50 (columna 8)	Razón ARTM_TARTMax (Columna 9)	Intervalo 50 (columna 10)	Int50_TT Art50 (Columna 11)
16	ESCCOL	8,90	1325,20	10,93	8,26	7,76	2,67	102,68	2992,12	362,33
17	ESCCOL	11,20	975,38	12,73	10,10	NC	2,64	104,08	3494,02	346,11
18	ESCCOL	8,70	1246,27	10,26	7,92	7,59	2,33	95,08	2276,73	287,32
19	ESCCOL	9,30	1333,27	11,31	8,51	NC	2,80	110,24	3489,93	410,34
20	ESCCOL	10,60	1239,10	12,35	9,52	4,34	2,83	107,93	3778,35	396,93
21	ESCCOL	11,00	1084,38	12,90	10,22	9,72	2,68	96,06	3320,42	324,93
22	ESCCOL	11,30	1373,55	13,34	10,84	10,50	2,50	81,31	2711,82	250,28
23	ESCCOL	10,80	1299,52	11,90	8,72	8,39	3,18	115,43	4367,89	500,96
24	ESCCOL	7,10	1266,70	9,18	6,34	4,01	2,83	141,59	3682,71	580,50
25	ESCCOL	7,30	297,63	9,85	7,18	6,68	2,67	128,66	3378,54	470,68
26	ESCCOL	17,00	1159,62	20,56	16,72	13,38	3,84	14,48	1142,66	68,35
27	ESCCOL	10,10	892,88	12,94	9,93	8,77	3,00	89,65	3480,48	350,36
924028	ESCCOL	10,50	829,72	13,17	10,34	9,00	2,83	67,81	2530,06	244,81
29	SAUR	12,00	614,18	13,51	11,18	NC	2,33	61,40	1936,73	173,25
30	SAUR	13,80	676,02	16,51	13,85	13,01	2,67	37,19	1638,14	118,30

Secuencia (Columna 1)	Producto aislado (Columna 2)	TTD (Columna 3)	ARTMax (Columna 4)	Tiempo ARTMax (Columna 5)	Tiempo ART @ 50 (Columna 6)	Tiempo ART @ 20 (Columna 7)	Tiempo ARTMax - Tiempo ART @ 50 (columna 8)	Razón ARTM_TARTMax (Columna 9)	Intervalo 50 (columna 10)	Int50_TT Art50 (Columna 11)
31	SAUR	21,80	988,80	23,81	21,48	15,12	2,33	28,39	1577,56	73,46
32	SAUR	15,30	596,58	17,35	14,85	12,85	2,50	57,00	2472,59	166,54
33	SAUR	22,30	697,33	24,68	22,01	21,01	2,67	24,17	1590,54	72,25
34	SAUR	14,70	687,07	16,87	14,37	13,70	2,50	41,34	1743,88	121,36
35	SAUR	11,20	698,28	13,54	10,87	10,03	2,67	51,57	1866,50	171,74
36	SAUR	14,50	764,00	16,70	14,20	13,37	2,50	45,74	1910,61	134,52
37	SAUR	16,90	467,43	19,12	14,45	14,12	4,67	24,45	2182,01	150,97
38	SAUR	14,90	984,03	14,92	13,57	13,24	1,34	65,97	1319,78	97,23
39	SAUR	14,90	819,72	14,92	13,57	NC	1,34	54,96	1099,41	80,99
40	SAUR	13,40	864,43	15,29	12,76	11,75	2,53	56,55	2188,65	171,59
41	SAUR	16,60	790,62	18,70	16,35	14,85	2,35	42,28	1858,59	113,69
42	SAUR	21,30	651,02	23,03	20,51	18,18	2,51	28,27	1636,08	79,75
43	SAUR	16,00	799,97	18,03	15,68	13,85	2,35	44,36	1880,65	119,93
44	SAUR	17,50	698,57	20,57	17,18	16,18	3,38	33,97	2361,52	137,43
45	SAUR	22,20	811,25	24,28	22,11	21,28	2,17	33,42	1758,38	79,53

Secuencia (Columna 1)	Producto aislado (Columna 2)	TTD (Columna 3)	ARTMax (Columna 4)	Tiempo ARTMax (Columna 5)	Tiempo ART @ 50 (Columna 6)	Tiempo ART @ 20 (Columna 7)	Tiempo ARTMax - Tiempo ART @ 50 (columna 8)	Razón ARTM_TARTMax (Columna 9)	Intervalo 50 (columna 10)	Int50_TT Art50 (Columna 11)
46	SAUR	28,10	1197,85	23,68	19,83	18,83	3,85	50,58	4613,04	232,64
47	SAUR	28,00	1084,03	22,34	19,16	18,49	3,18	48,52	3447,87	179,93
48	SAUR	18,50	1017,80	20,74	17,90	33,84	2,84	49,08	2891,37	161,56
49	SAUR	9,70	972,92	12,06	8,37	NC	3,69	80,67	3594,65	429,67
50	SAUR	35,10	624,30	39,81	35,48	NC	4,33	15,68	2706,22	76,28
51	SAUR	15,60	1003,82	17,64	15,12	13,45	2,52	56,92	2524,61	166,97
52	SAUR	14,20	1082,83	16,28	13,61	22,96	2,67	66,50	2888,23	212,15
53	SAUR	31,60	941,75	26,96	23,26	23,09	3,70	34,93	3485,51	149,86
54	SAUR	11,80	777,80	15,36	11,86	11,02	3,50	50,64	2723,16	229,65
55	SAUR	14,00	669,53	18,75	14,69	13,69	4,06	35,70	2718,49	185,03
56	SAUR	18,60	643,83	20,50	17,66	12,31	2,83	31,41	1824,68	103,30
57	SAUR	19,80	657,62	22,48	19,31	18,31	3,17	29,25	2085,25	108,00
58	STACNEG	25,90	523,45	28,29	25,79	23,29	2,50	18,50	1309,04	50,76
59	STACNEG	18,40	727,85	20,16	17,49	17,32	2,67	36,10	1945,03	111,22
60	STACNEG	20,10	533,47	23,12	20,12	18,95	3,00	23,07	1602,92	79,69

Secuencia (Columna 1)	Producto aislado (Columna 2)	TTD (Columna 3)	ARTMax (Columna 4)	Tiempo ARTMax (Columna 5)	Tiempo ART @ 50 (Columna 6)	Tiempo ART @ 20 (Columna 7)	Tiempo ARTMax - Tiempo ART @ 50 (columna 8)	Razón ARTM_TARTMax (Columna 9)	Intervalo 50 (columna 10)	Int50_TT Art50 (Columna 11)
61	STACNEG	31,70	370,55	28,05	25,37	24,03	2,69	13,21	995,04	39,23
62	STACNEG	61,20	491,33	63,29	61,13	59,96	2,17	7,76	1065,06	17,42
63	STACNEG	17,80	516,47	20,05	17,88	16,55	2,17	25,76	1119,29	62,60
64	STACNEG	18,70	506,82	21,60	18,37	16,53	3,23	23,47	1637,18	89,13
65	STACNEG	39,80	365,48	43,92	39,69	39,02	4,23	8,32	1546,78	38,98
66	STACNEG	18,90	590,70	21,57	18,40	17,07	3,17	27,38	1871,04	101,66
67	STACNEG	19,10	460,67	21,29	18,62	17,62	2,67	21,64	1228,70	65,97
68	STACNEG	28,90	541,97	30,74	28,23	27,06	2,51	17,63	1360,02	48,17
69	STACNEG	22,90	472,97	26,14	22,97	20,63	3,17	18,10	1498,13	65,23
70	STACNEG	16,50	571,60	18,79	16,05	6,86	2,74	30,43	1564,30	97,46
71	STACNEG	23,90	454,45	26,98	23,48	22,48	3,50	16,84	1592,30	67,83
72	STACNEG	21,20	804,02	23,77	20,43	18,10	3,33	33,83	2681,00	131,20
73	STACNEG	80,30	265,65	90,39	83,72	79,37	6,67	2,94	1772,18	21,17
74	STACNEG	30,90	606,87	34,49	30,15	27,65	4,34	17,60	2633,33	87,34
75	STACNEG	18,70	533,92	16,92	13,87	13,06	3,05	31,55	1626,53	117,24

Secuencia (Columna 1)	Producto aislado (Columna 2)	TTD (Columna 3)	ARTMax (Columna 4)	Tiempo ARTMax (Columna 5)	Tiempo ART @ 50 (Columna 6)	Tiempo ART @ 20 (Columna 7)	Tiempo ARTMax - Tiempo ART @ 50 (columna 8)	Razón ARTM_TARTMax (Columna 9)	Intervalo 50 (columna 10)	Int50_TT Art50 (Columna 11)
76	STACNEG	23,70	575,67	25,78	22,93	21,26	2,85	22,33	1638,47	71,46
77	STACNEG	20,70	413,22	24,63	20,95	19,95	3,68	16,78	1522,14	72,67
78	STACNEG	23,40	816,38	25,48	22,61	19,93	2,87	32,04	2344,81	103,73
79	STACNEG	15,50	577,42	16,90	15,24	12,35	1,67	34,16	962,67	63,18
80	STACNEG	15,20	900,37	18,29	14,89	13,70	3,40	49,24	3060,99	205,61
81	STACNEG	20,30	69,13	20,49	20,32	19,49	0,17	3,37	11,54	0,57
82	STACNEG	125,70	55,92	139,08	137,74	125,56	1,33	0,40	74,59	0,54
83	STACNEG	22,50	224,73	23,51	22,00	21,67	1,51	9,56	338,78	su 0,40
84	STACNEG	27,60	543,70	30,29	26,62	26,28	3,68	17,95	1998,21	75,07
85	STACNEG	14,70	709,97	17,09	14,42	13,42	2,67	41,54	1897,18	131,57
86	STACNEG	22,30	517,22	24,35	21,85	NC	2,50	21,24	1293,52	59,20
87	PROTMIR	13,70	885,83	15,73	12,89	7,04	2,84	56,33	2513,99	195,05
88	KLEPNEP	51,70	836,13	53,05	50,88	50,38	2,17	15,76	1811,81	35,61
89	KLEPNEP	10,80	1578,75	13,20	10,52	10,19	2,68	119,60	4224,10	401,38
90	KLEPNEP	13,80	1415,38	16,39	13,72	13,05	2,67	86,38	3775,53	275,22

Secuencia (Columna 1)	Producto aislado (Columna 2)	TTD (Columna 3)	ARTMax (Columna 4)	Tiempo ARTMax (Columna 5)	Tiempo ART @ 50 (Columna 6)	Tiempo ART @ 20 (Columna 7)	Tiempo ARTMax - Tiempo ART @ 50 (columna 8)	Razón ARTM_TARTMax (Columna 9)	Intervalo 50 (columna 10)	Int50_TT Art50 (Columna 11)
91	NEIMEN	18,40	477,40	20,64	17,63	NC	3,01	23,13	1437,79	81,55
92	ACINBAU	11,60	226,03	13,21	11,37	10,70	1,84	17,11	416,96	36,68
93	ACINBAU	14,00	359,07	13,23	11,71	8,85	1,52	27,14	544,28	46,46

5 La Figura 7 es un gráfico de la razón del grado de crecimiento/tasa metabólica máxima (definida como $ART_{max} \text{ Interval}50 / TTART50$ frente ART_{max} para fines de trazado de la Figura 7) de los cultivos de referencia que contienen microorganismos de tipo conocido. En la Figura 7, las bacterias de la familia Enterobacteriaceae (p. ej., *E. coli* y *K. pneumoniae*) se agrupan en la esquina superior derecha de la figura. Las enterobacterias se caracterizaron por tener una elevada ART_{max} y una elevada razón Integral50 con respecto a TTART50 (grado de crecimiento determinado por la ecuación 3). Hubo algunos *estreptococos* (STRAGA) que encajaron en esta categoría. Estos se pueden distinguir por su cambio de NR relativa en comparación con las bacterias Enterobacteriaceae.

10 El siguiente grupo distinguible en la Figura 7 fue *Staphylococcus aureus* que tiene un valor de ART_{max} mayor de 600 y una razón Integral50 con respecto a TTART50 mayor de 80 (grado de crecimiento determinado por la ecuación 3). Esto ayudó a distinguir el *Staphylococcus aureus* de los *estafilococos* coagulasa negativos que típicamente tienen ART_{max} y una razón Integral50 con respecto a TTART50 inferiores.

15 El siguiente grupo distinguible en la Figura 7 fue *Acinetobacter* (representado por *Acinetobacter baumannii* en este ejemplo). Los microorganismos de este tipo tenían un bajo valor de ART_{max} debido a su carácter respiratorio obligado y su preferencia por sustratos no carbohidratados. Sus curvas NR eran muy características por tener una explosión de crecimiento rápida temprana seguida de un cese de crecimiento rápido temprano cuyo resultado es que nunca alcanzan un ART_{max} sostenida.

REIVINDICACIONES

1. Un método de identificación de un tipo de microorganismo en un cultivo en un recipiente, comprendiendo el método:
 - 5 (a) calcular un valor relativo de normalización para cada respectiva medición en una pluralidad de mediciones de un estado biológico del cultivo en el recipiente, tomado en diferentes puntos temporales entre un primer punto temporal y un segundo punto temporal, entre (i) la respectiva medición y (ii) un estado biológico inicial del cultivo tomado en un punto temporal inicial, formando de ese modo una pluralidad de valores relativos de normalización;
 - 10 (b) determinar, para cada intervalo fijado predeterminado respectivo de puntos temporales entre el primer punto temporal y el segundo punto temporal, una primera derivada de los valores relativos de normalización para las mediciones del estado biológico en el respectivo intervalo fijado predeterminado de puntos temporales, formando de ese modo una pluralidad de valores de transformación de tasas, en donde la pluralidad de valores de transformación de tasas comprende una pluralidad de conjuntos de valores de transformación de tasas, en donde cada respectivo conjunto de valores de transformación de tasas en la pluralidad de conjuntos de valores de transformación de tasas es para un conjunto diferente de puntos temporales contiguos entre el primer punto temporal y el segundo punto temporal;
 - 15 (c) calcular, para cada respectivo conjunto de valores de transformación de tasas en la pluralidad de conjuntos de valores de transformación de tasas, un valor de transformación relativo medio como una medida de la tendencia central de cada uno de los valores de transformación de tasas en el respectivo conjunto de valores de transformación de tasas, calculando de ese modo una pluralidad de valores de transformación relativos medios;
 - 20 (d) determinar una tasa metabólica máxima y un grado de crecimiento a partir de la pluralidad de valores relativos de normalización y la pluralidad de valores de transformación relativos medios; y
 - (e) determinar el tipo de microorganismo en el cultivo en el recipiente a partir de la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento.
2. El método de la reivindicación 1, comprendiendo adicionalmente el método:
 - 25 (f) dar salida a una identificación del tipo de microorganismo en el cultivo en el recipiente para microorganismos a un dispositivo de interfaz de usuario, un monitor, un medio de almacenamiento legible por ordenador, una memoria legible por ordenador, o un sistema informático local o remoto; o mostrar una identificación del tipo de microorganismo en el cultivo.
3. El método de la reivindicación 1, en donde el primer punto temporal es de cinco o más minutos después del punto temporal inicial y el segundo punto temporal es de treinta o más horas después del punto temporal inicial o en donde el primer punto temporal está entre 0,5 horas y 3 horas después del punto temporal inicial y el segundo punto temporal está entre 4,5 horas y veinte horas después del punto temporal inicial.
4. El método de la reivindicación 1, en donde la medida de la tendencia central de los valores de transformación de tasas en un primer conjunto de valores de transformación de tasas en la pluralidad de conjuntos de valores de transformación de tasas comprende:
 - 35 una media geométrica de cada uno de los valores de transformación de tasas m del primer conjunto de valores de transformación de tasas,
 - una media aritmética de cada uno de los valores de transformación de tasas m del primer conjunto de valores de transformación de tasas,
 - 40 una mediana de cada uno de los valores de transformación de tasas en el primer conjunto de valores de transformación de tasas o
 - una moda de cada uno de los valores de transformación de tasas en el primer conjunto de valores de transformación de tasas.
5. El método de la reivindicación 1, en donde las mediciones en la pluralidad de mediciones del estado biológico del cultivo se toman cada una del cultivo a un intervalo de tiempo periódico entre el primer punto temporal y el segundo punto temporal, en donde el intervalo de tiempo periódico es una cantidad de tiempo entre un minuto y veinte minutos, o entre cinco minutos y quince minutos.
6. El método de la reivindicación 1, en donde el estado biológico inicial del cultivo se determina por medio de una salida de fluorescencia de un sensor que está en contacto con el cultivo, en donde la cantidad de salida de fluorescencia del sensor se ve afectada preferiblemente por la concentración de CO₂, la concentración de O₂ o el pH.
- 50 7. El método de la reivindicación 1, en donde entre 10 y 50.000 mediciones, preferiblemente 100 y 5.000 mediciones

y lo más preferiblemente 150 y 5.000 mediciones del estado biológico del cultivo en el recipiente están en la pluralidad de mediciones del estado biológico del cultivo.

8. El método de la reivindicación 1, en donde cada respectivo intervalo fijado predeterminado de puntos temporales de la etapa (B) consiste en cada uno de los valores de transformación de tasas para puntos temporales en una ventana temporal entre el primer punto temporal y el segundo punto temporal, y en donde la ventana temporal es un periodo de tiempo que está entre veinte minutos y diez horas, y/o en donde cada respectivo intervalo fijado predeterminado de puntos temporales de la etapa (B) consiste en los valores de transformación de tasas para todos los puntos temporales en una ventana temporal entre el primer punto temporal y el segundo punto temporal en el que se midió un estado biológico del cultivo en el recipiente, y en donde una duración de la ventana temporal es un periodo de tiempo que está entre veinte minutos y dos horas, y/o en donde cada respectivo intervalo fijado predeterminado de puntos temporales de la etapa (B) consiste en los valores de transformación de tasas para todos los puntos temporales en una ventana temporal entre el primer punto temporal y el segundo punto temporal en el que se midió un estado biológico del cultivo en el recipiente, y en donde una duración de la ventana temporal es un periodo de tiempo que está entre treinta minutos y noventa minutos.

9. El método de la reivindicación 1, en donde cada conjunto de valores de transformación de tasas en la pluralidad de valores de transformación de tasas consiste en entre cuatro y veinte, preferiblemente entre cinco y quince valores de transformación de tasas contiguos.

10. El método de la reivindicación 1, en donde hay entre cinco y quinientos, preferiblemente entre veinte y cien valores de transformación relativos medios en la pluralidad de valores de transformación relativos medios.

11. El método de la reivindicación 1, en donde un volumen del cultivo está entre 1 ml y 40 ml, preferiblemente entre 2 ml y 10 ml.

12. El método de la reivindicación 1, en donde el recipiente contiene una composición sensora en comunicación de fluido con el cultivo, en donde la composición sensora comprende un compuesto luminiscente que muestra un cambio en la propiedad luminiscente, cuando se irradia con luz que contiene longitudes de onda que hacen que dicho compuesto luminiscente emita luz, tras la exposición a oxígeno, en donde la presencia de la composición sensora no es destructiva al cultivo y en donde el estado biológico inicial del cultivo se mide mediante la irradiación de dicha composición sensora con luz que contiene longitudes de onda que hacen que dicho compuesto luminiscente emita luz; y observar la intensidad de luz luminiscente de dicho compuesto luminiscente mientras se irradia dicha composición sensora con dicha luz.

13. El método de la reivindicación 12, en donde dicho compuesto luminiscente está contenido dentro de una matriz que es relativamente impermeable al agua y solutos no gaseosos, pero que tiene una alta permeabilidad al oxígeno, en donde dicha matriz comprende preferiblemente caucho o plástico.

14. El método de la reivindicación 1, en donde se considera que la tasa metabólica máxima es un valor de transformación relativo medio máximo en la pluralidad de valores de transformación relativos medios.

15. El método de la reivindicación 1, en donde el grado de crecimiento se determina por medio de la ecuación:

$$GC = NR_{\text{después_crecimiento}} - NR_{\text{crecimiento_mínimo}}$$

en donde $NR_{\text{después_crecimiento}}$ es un valor relativo de normalización en la pluralidad de valores relativos de normalización que se utilizó en el cálculo de (i) el primer valor de transformación relativo medio después del valor de transformación relativo medio máximo, (ii) el valor de transformación relativo medio máximo, o (iii) el primer valor de transformación relativo medio anterior al valor de transformación relativo medio máximo en la pluralidad de valores de transformación relativos medios, y $NR_{\text{crecimiento_mínimo}}$ es un valor relativo de normalización en la pluralidad de valores relativos de normalización que se utilizó en el cálculo del primer valor de transformación relativo medio para alcanzar un valor umbral.

16. El método de la reivindicación 1, en donde el grado de crecimiento (GC) se determina por medio de la ecuación:

$$GC = ART_{\text{máx}} * (\text{tiempo}_{ART_{\text{máx}}} - \text{tiempo}_{\text{inicial}})$$

en donde,

$ART_{\text{máx}}$ es un valor de transformación relativo medio máximo en la pluralidad de valores de transformación relativos medios, $\text{tiempo}_{ART_{\text{máx}}}$ es una duración de tiempo entre (a) el punto temporal inicial y (b) un punto temporal cuando se midió el valor relativo de normalización en la pluralidad de valores relativos de normalización que se utilizó en el cálculo de (i) el primer valor de transformación relativo medio después del valor de transformación relativo medio máximo, (ii) el valor de transformación relativo medio máximo, o (iii) el primer valor de transformación relativo medio anterior al valor de transformación relativo medio máximo en la pluralidad de valores de transformación relativos medios; y

el $\text{tiempo}_{\text{inicial}}$ es una duración de tiempo entre (i) el punto temporal inicial y (ii) un punto temporal cuando se midió el

valor relativo de normalización en la pluralidad de valores relativos de normalización que se utilizó en el cálculo del primer valor de transformación relativo medio para alcanzar un valor umbral.

17. El método de la reivindicación 1, en donde el grado de crecimiento (GC) se determina por medio de la ecuación:

$$GC = [ART_{\text{máx}} * (\text{tiempo}_{ART_{\text{máx}}} - \text{tiempo}_{\text{inicial}})] / \text{tiempo}_{\text{inicial}}$$

5 en donde,

ART_{max} es un valor de transformación relativo medio máximo en la pluralidad de valores de transformación relativos medios,

10 tiempo_{ART_{max}} es una duración de tiempo entre (a) el punto temporal inicial y (b) un punto temporal cuando se midió el valor relativo de normalización en la pluralidad de valores relativos de normalización que se utilizó en el cálculo de (i) el primer valor de transformación relativo medio después del valor de transformación relativo medio máximo, (ii) el valor de transformación relativo medio máximo, o (iii) el primer valor de transformación relativo medio anterior al valor de transformación relativo medio máximo en la pluralidad de valores de transformación relativos medios; y

15 tiempo_{inicial} es una duración de tiempo entre (i) el punto temporal inicial y (ii) un punto temporal cuando se midió el valor relativo de normalización en la pluralidad de valores relativos de normalización que se utilizó en el cálculo del primer valor de transformación relativo medio para alcanzar un valor umbral.

18. El método de las reivindicaciones 15, 16 o 17, en donde el valor umbral es un valor entre 5 y 100, preferiblemente entre 25 y 75.

20 El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de determinación (E) identifica el tipo de microorganismo en el cultivo en el recipiente como (i) una bacteria de la familia Enterobacteriaceae o (ii) una bacteria que no es de la familia Enterobacteriaceae basándose en la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento.

20. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de determinación (E) identifica el tipo de microorganismo como bacterias basándose en la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento.

25 21. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de determinación (E) identifica el tipo de microorganismo como (i) Enterobacteriaceae, (ii) Staphylococcaceae, (iii) Streptococcus, o (iv) Acinetobacter basándose en la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento.

30 22. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de determinación (E) identifica el tipo de microorganismo como un único género de la familia Enterobacteriaceae seleccionado del grupo que consiste en *Alishewanella*, *Alterococcus*, *Aquamonas*, *Aranicola*, *Arsenophonus*, *Azotivirga*, *Blochmannia*, *Brenneria*, *Buchnera*, *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Dickeya*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Ewingella*, *Griimontella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Candidatus Phlomobacter*, *Photothabdus*, *Plesiomonas*, *Pragia*, *Proteus*, *Providencia*, *Rahnella*, *Raoultella*, *Salmonella*, *Samsonia*, *Serratia*, *Shigella*, *Sodalis*, *Tatumella*, *Trabulsiella*, *Wigglesworthia*, *Xenorhabdus*, *Yersinia*, o *Yokenella* basándose en la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento.

35 23. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de determinación (E) identifica el tipo de microorganismo como una única especie de Staphylococcaceae seleccionada del grupo que consiste en bacterias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus pettenkoferi*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus warneri*, y *Staphylococcus xylosus*, basándose en la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento.

40 24. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de determinación (E) determina si el microorganismo es *Staphylococcus aureus* o *estafilococos* coagulasa negativos.

25. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de determinación (E) identifica el tipo de microorganismo como una única especie de Streptococcus seleccionada del grupo que consiste de *S. agalactiae*, *S. bovis*, *S. mutans*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. suis*, *Streptococcus viridans*, y *Streptococcus uberis* basándose en la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento.

45 26. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de determinación (E) identifica el tipo de microorganismo como aerobio o anaerobio basándose en la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento.

50 27. El método de la reivindicación 1, en donde el estado biológico inicial del cultivo se mide mediante medios colorimétricos, medios fluorométricos, medios nefelométricos, o medio infrarrojos y/o en donde cada estado biológico en la pluralidad de mediciones del estado biológico se determina mediante medios colorimétricos, medios fluorométricos, medios nefelométricos, o medios infrarrojos.

28. El método de la reivindicación 1, en donde el cultivo es un cultivo de sangre de un sujeto.

29. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de determinación (E) compara la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento con una tabla de consulta que empareja la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento a un tipo de microorganismo, determinando de ese modo el tipo de microorganismo en el cultivo en el recipiente.

- 5 30. Un aparato para identificar un tipo de microorganismo en un cultivo en un recipiente, comprendiendo el aparato un procesador y una memoria, acoplada al procesador, un sensor para la medición de un estado biológico del cultivo, comprendiendo la memoria:

un módulo de determinación del tipo microorganismo que comprende:

10 (A) instrucciones codificadas electrónicamente para calcular un valor relativo de normalización para cada respectiva medición en una pluralidad de mediciones, tomadas en diferentes puntos temporales entre un primer punto temporal y un segundo punto temporal, entre (i) la respectiva medición y (ii) un estado biológico inicial del cultivo tomado en un punto temporal inicial, formando de ese modo una pluralidad de valores relativos de normalización;

15 (B) instrucciones codificadas electrónicamente para determinar, para cada respectivo intervalo fijado predeterminado de puntos temporales entre el primer punto temporal y el segundo punto temporal, una primera derivada de los valores relativos de normalización para las mediciones del estado biológico en el respectivo intervalo fijado predeterminado de puntos temporales, formando de ese modo una pluralidad de valores de transformación de tasas, en donde la pluralidad de valores de transformación de tasas comprende una pluralidad de conjuntos de valores de transformación de tasas, en donde cada respectivo conjunto de valores de transformación de tasas en la pluralidad de conjuntos de valores de transformación de tasas es para un conjunto diferente de puntos temporales contiguos entre el primer punto temporal y el segundo punto temporal;

20 (C) instrucciones codificadas electrónicamente para calcular, para cada respectivo conjunto de valores de transformación de tasas en la pluralidad de conjuntos de valores de transformación de tasas, un valor de transformación relativo medio como medida de la tendencia central de cada uno de los valores de transformación de tasas en el respectivo conjunto de valores de transformación de tasas, calculando de ese modo una pluralidad de valores de transformación relativos medios;

(D) instrucciones codificadas electrónicamente para determinar una tasa metabólica máxima y un grado de crecimiento a partir de la pluralidad de valores relativos de normalización y la pluralidad de valores de transformación relativos medios;

y

30 (E) instrucciones codificadas electrónicamente para determinar el tipo de microorganismo en el cultivo en el recipiente a partir de la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento;

31. El aparato de la reivindicación 30, comprendiendo adicionalmente la memoria:

35 una tabla de consulta que comprende emparejamientos entre (i) una pluralidad de conjuntos de valores, comprendiendo cada conjunto de valores de la pluralidad de conjuntos de valores un valor de la tasa metabólica máxima y un grado de crecimiento, y (ii) un conjunto de tipos de microorganismos, en donde, para cada conjunto de valores en la pluralidad de conjuntos de valores hay un tipo de microorganismo correspondiente en el conjunto de tipos de microorganismos, y

40 en donde las instrucciones codificadas electrónicamente para determinar (E) incluyen instrucciones para la comparación de la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento con la tabla de consulta que coincide con la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento de un tipo de microorganismo, determinando de ese modo el tipo de microorganismo en el cultivo en el recipiente.

32. Un medio legible por ordenador que almacena un producto de programa informático para identificar un microorganismo en un cultivo en un recipiente, ejecutable por un ordenador, en donde el producto de programa informático comprende:

45 un módulo de determinación del tipo microorganismo que comprende:

(A) instrucciones codificadas electrónicamente para calcular un valor relativo de normalización para cada respectiva medición en una pluralidad de mediciones, tomadas en diferentes puntos temporales entre un primer punto temporal y un segundo punto temporal, entre (i) la respectiva medición y (ii) un estado biológico inicial del cultivo tomado en un punto temporal inicial, formando de ese modo una pluralidad de valores relativos de normalización;

50 (B) instrucciones codificadas electrónicamente para determinar, para cada respectivo intervalo fijado predeterminado de puntos temporales entre el primer punto temporal y el segundo punto temporal, una primera derivada de los valores relativos de normalización para las mediciones del estado biológico en el respectivo intervalo fijado predeterminado de puntos temporales, formando de ese modo una pluralidad de valores de transformación de tasas, en donde la pluralidad de valores de transformación de tasas comprende una pluralidad de conjuntos de valores de

transformación de tasas, en donde cada respectivo conjunto de valores de transformación de tasas en la pluralidad de conjuntos de valores de transformación de tasas es para un conjunto diferente de puntos temporales contiguos entre el primer punto temporal y el segundo punto temporal;

5 (C) instrucciones codificadas electrónicamente para calcular, para cada respectivo conjunto de valores de transformación de tasas en la pluralidad de conjuntos de valores de transformación de tasas, un valor de transformación relativo medio como medida de la tendencia central de cada uno de los valores de transformación de tasas en el respectivo conjunto de valores de transformación de tasas, calculando de ese modo una pluralidad de valores de transformación relativos medios;

10 (D) instrucciones codificadas electrónicamente para determinar una tasa metabólica máxima y un grado de crecimiento a partir de la pluralidad de valores relativos de normalización y la pluralidad de valores de transformación relativos medios;

y (E) instrucciones codificadas electrónicamente para determinar el tipo de microorganismo en el cultivo en el recipiente a partir de la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento.

15 33. Los medios legibles por ordenador de la reivindicación 32, comprendiendo adicionalmente el producto de programa informático:

una tabla de consulta que comprende emparejamientos entre (i) una pluralidad de conjuntos de valores, comprendiendo cada conjunto de valores de la pluralidad de conjuntos de valores un valor de la tasa metabólica máxima y un grado de crecimiento, y (ii) un conjunto de tipos de microorganismos, en donde, para cada conjunto de valores en la pluralidad de conjuntos de valores hay un tipo de microorganismo correspondiente en el conjunto de tipos de microorganismos, y en donde

20 las instrucciones codificadas electrónicamente para determinar (E) incluyen instrucciones para la comparación de la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento con la tabla de consulta que coincide con la tasa metabólica máxima y el grado de crecimiento de un tipo de microorganismo, determinando de ese modo el tipo de microorganismo en el cultivo en el recipiente.

25

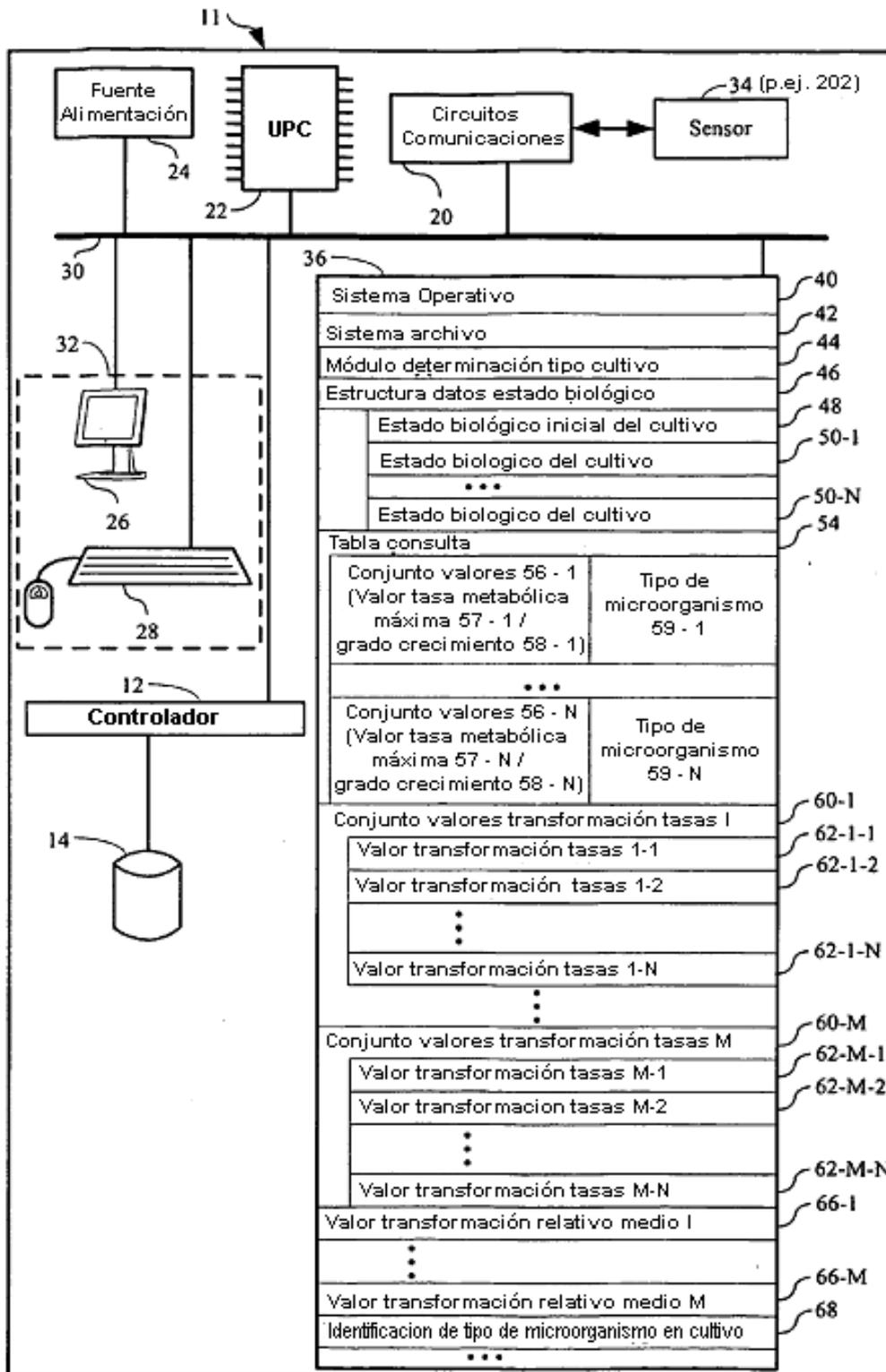


Fig. 1

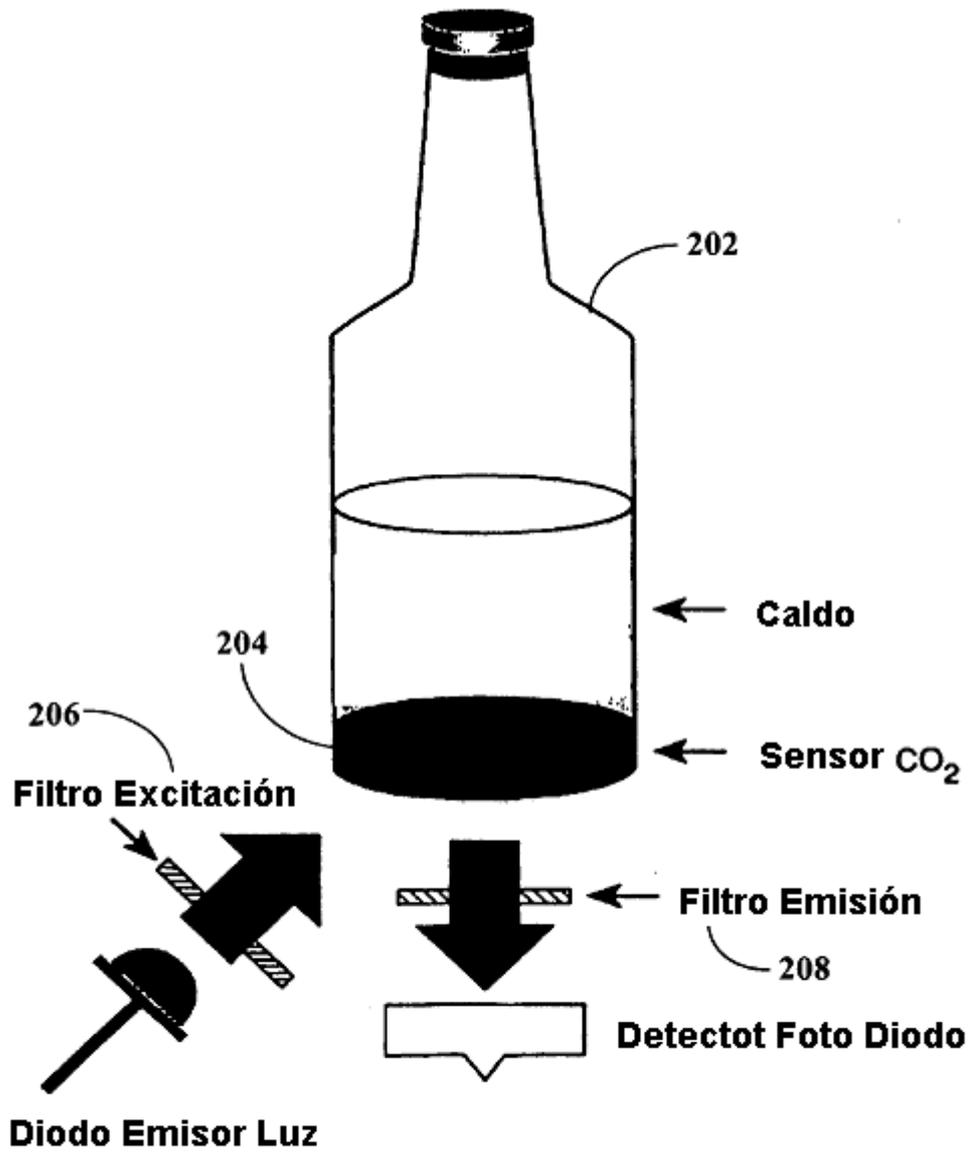


Fig. 2

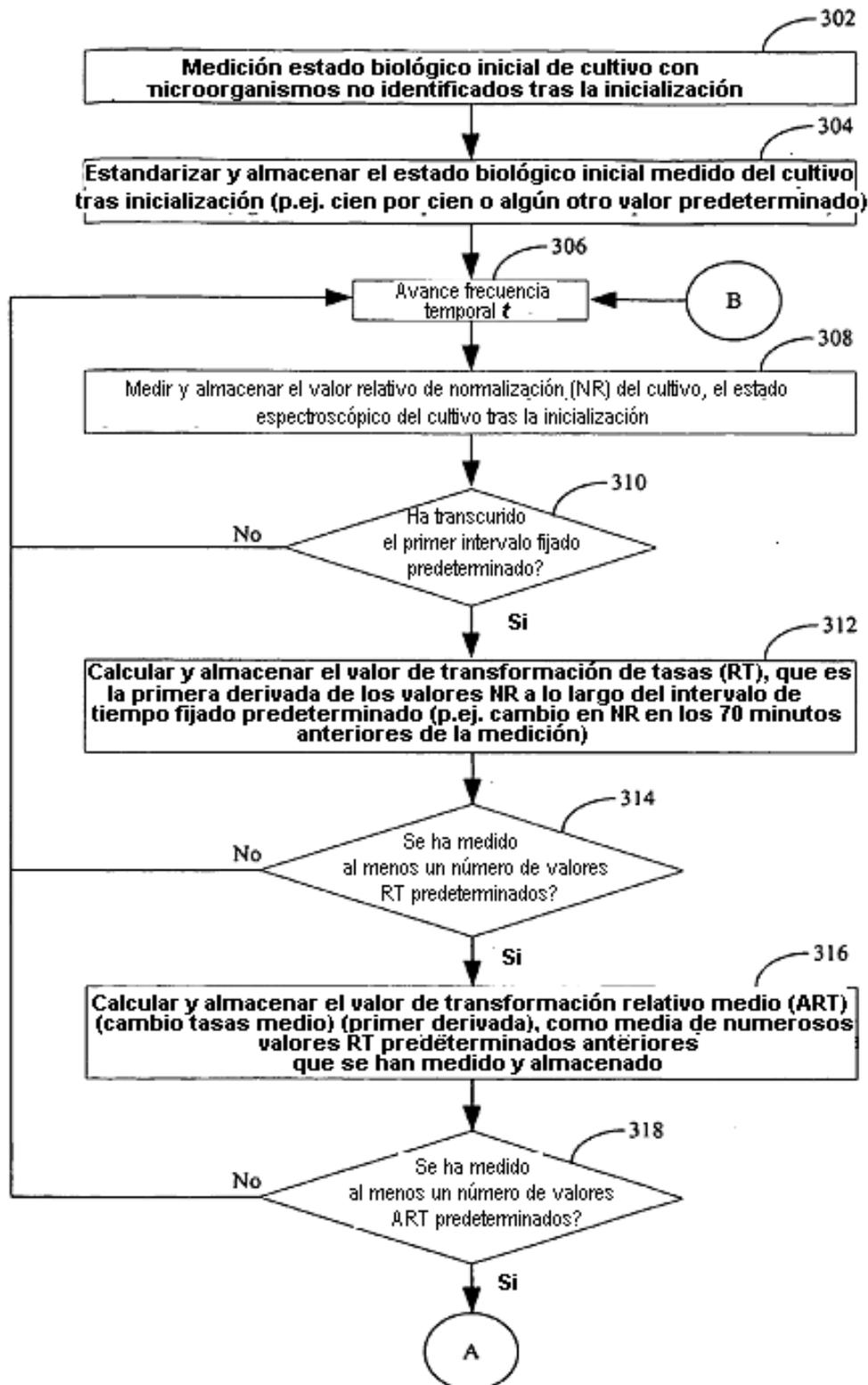


Fig. 3A

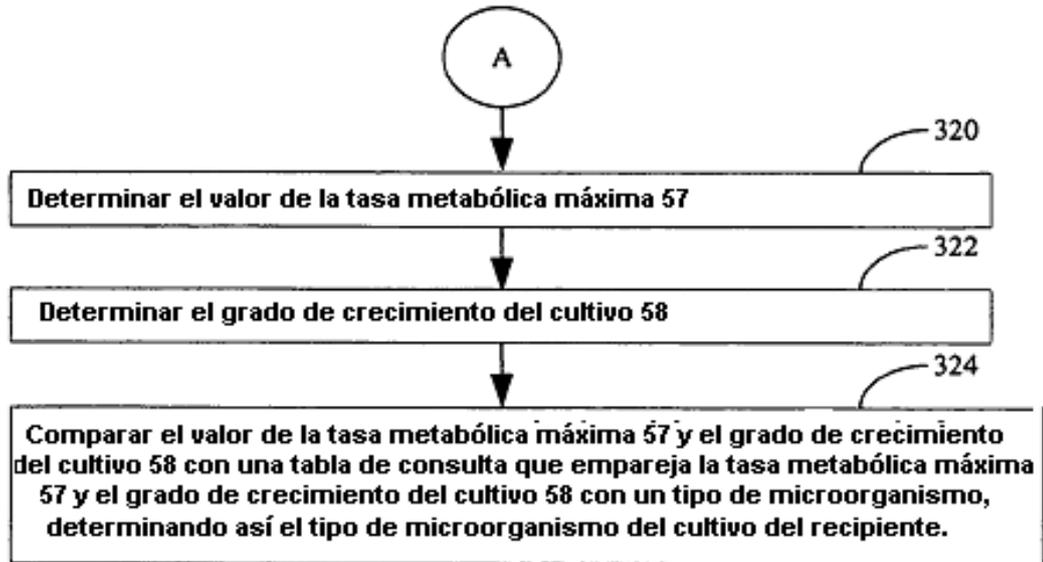


Fig. 3B

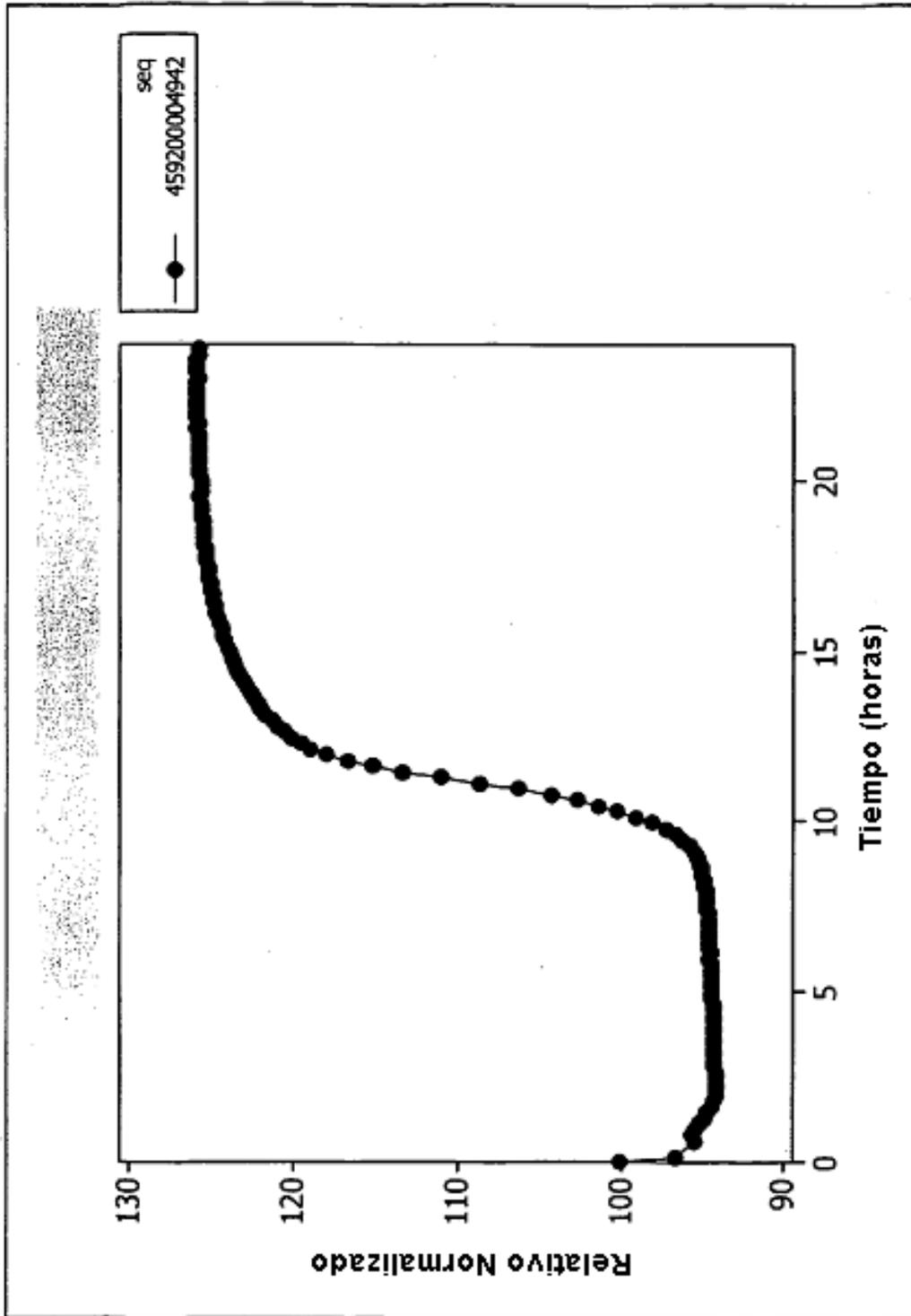


Fig. 4

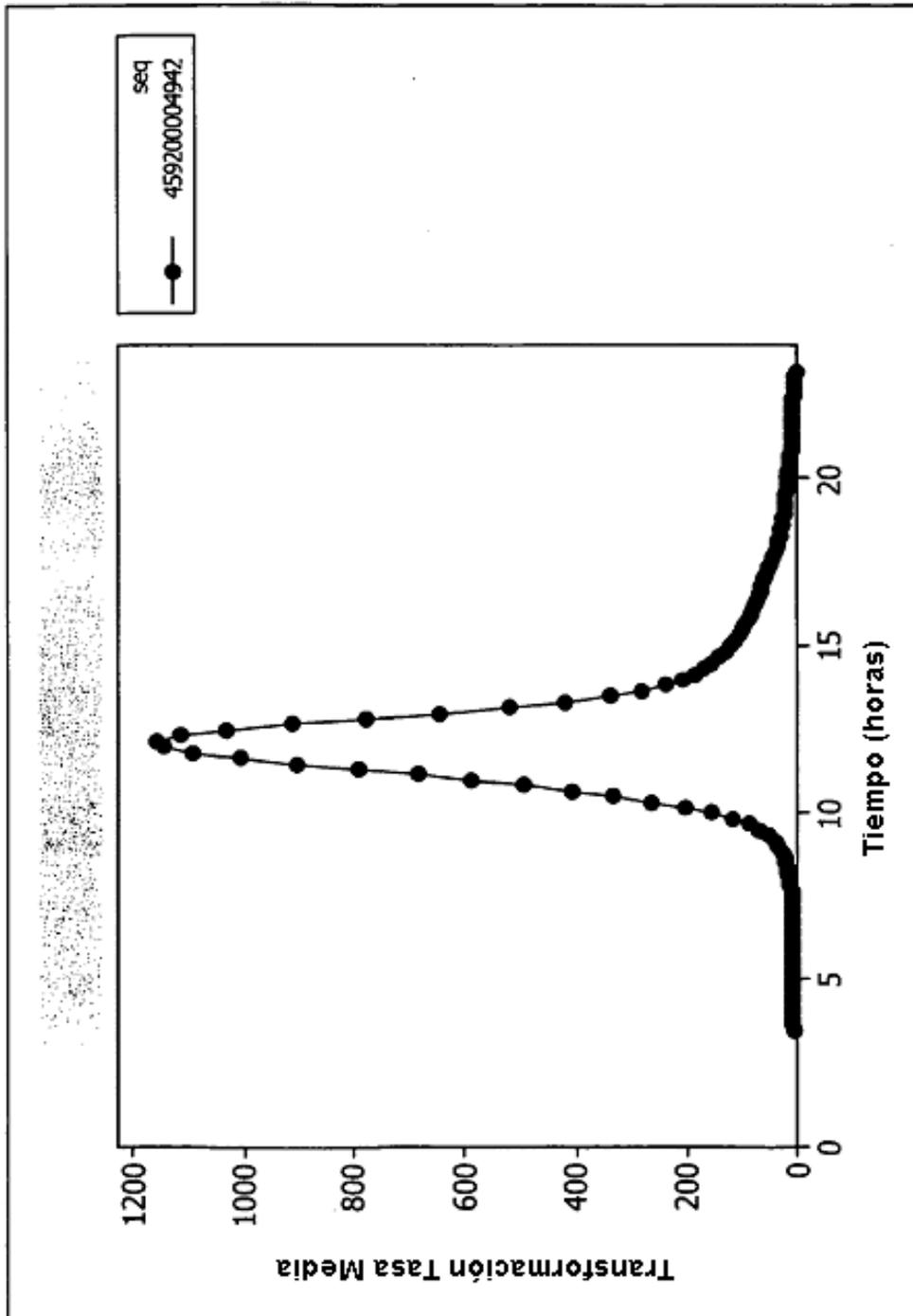


Fig. 5

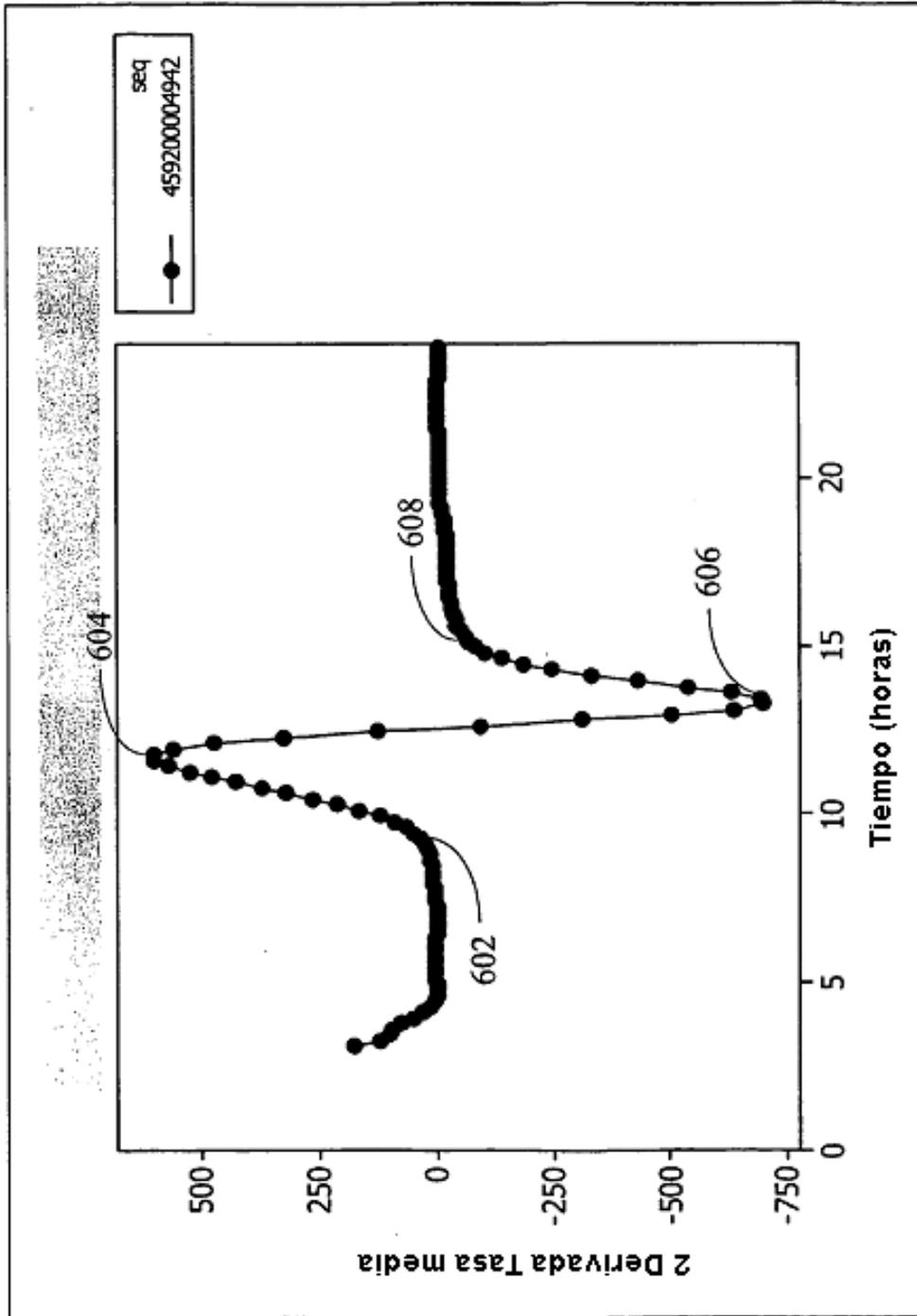


Fig. 6

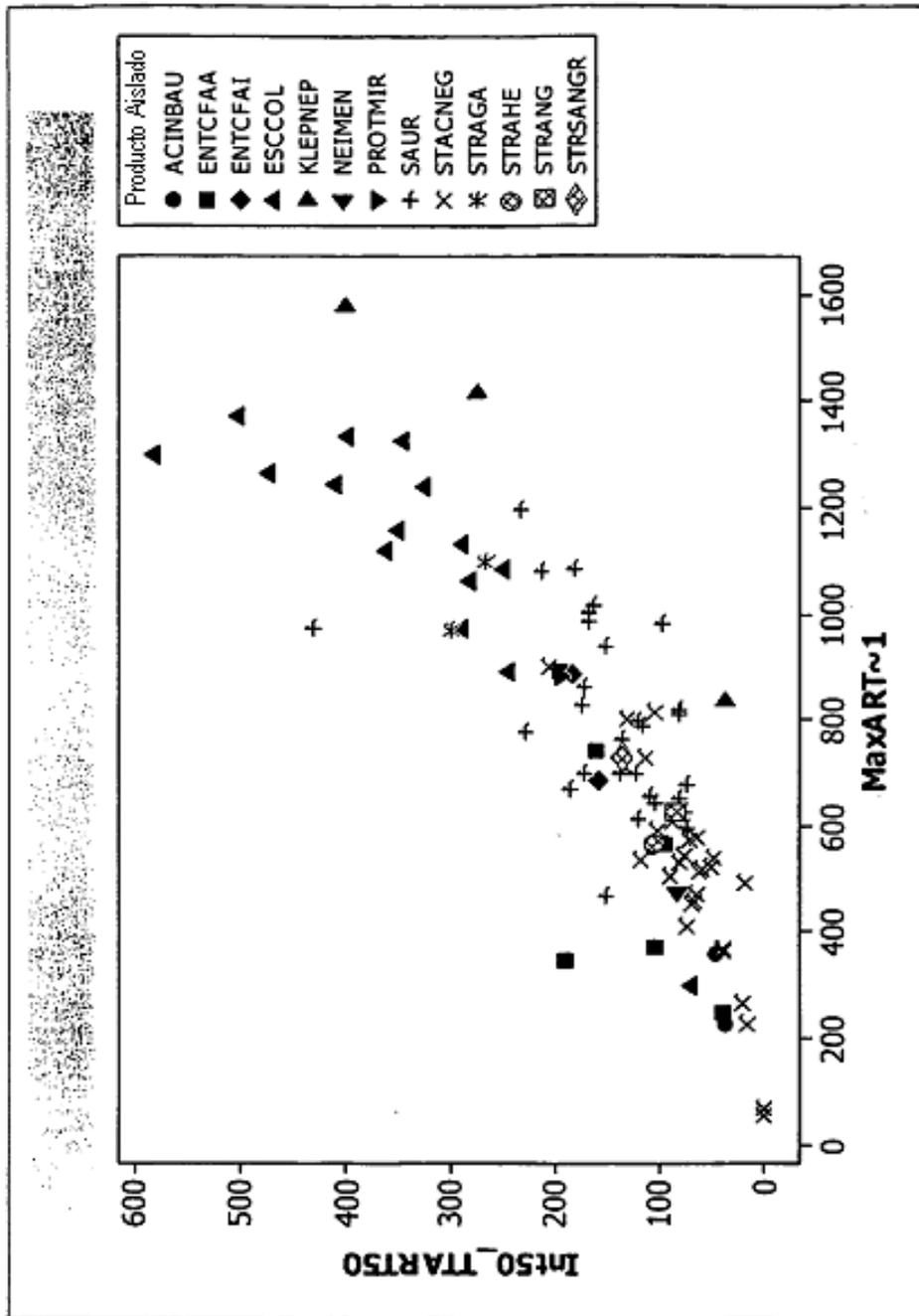


Fig. 7