

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 203**

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 08725773 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2015 EP 2245177**

54 Título: **Sistemas y métodos para identificar un cultivo como positivo en microorganismos con una elevada fiabilidad**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.09.2015**

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 2 545 203 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 identificar un cultivo como positivo en microorganismos con una elevada fiabilidad

5 1. CAMPO DE LA INVENCION

Se divulgan sistemas y métodos mejorados para determinar que un cultivo situado en el interior de un vaso contiene microorganismos.

2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Una detección rápida y fiable de microorganismos en un cultivo, tal como un cultivo de sangre, se encuentra entre las funciones más importantes del laboratorio de microbiología clínica. En la actualidad, la presencia de agentes biológicamente activos tales como bacterias en un fluido corporal de un paciente, y, especialmente, en la sangre, se determina utilizando viales de cultivo. Se inyecta una pequeña cantidad del fluido corporal del paciente, a través de un diafragma de caucho circundante, en un vial estéril que contiene un medio de cultivo, y el vial es entonces  
15 incubado y sometido a un seguimiento en lo que respecta al crecimiento de microorganismos.

Una inspección visual común del vial de cultivo implica, entonces, supervisar la turbidez u observar eventuales cambios de color de la suspensión líquida contenida en el vial. Pueden utilizarse también métodos instrumentales conocidos para detectar cambios en el contenido de dióxido de carbono de los vasos de cultivo, que es un producto  
20 secundario metabólico del crecimiento bacteriano. La supervisión del contenido de dióxido de carbono puede llevarse a cabo por métodos bien establecidos en la técnica.

En algunos casos, se utiliza un instrumento de detección de microorganismos por infrarrojos no invasivo en el que se emplean viales especiales que tienen ventanas de transmisión de infrarrojos. En algunos casos, se transfieren viales  
25 de vidrio a un espectrómetro de infrarrojos por medio de un brazo manipulador automático, y se miden a través del vial de vidrio. En algunos casos, se disponen sensores químicos dentro 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 están basadas en mediciones de la intensidad luminosa y requieren de filtración  
30 espectral en las señales de excitación y/o de medición.

Como se ha indicado en lo anterior, diversos sistemas y soluciones de cultivo diferentes se encuentran disponibles para los laboratorios. Por ejemplo, los sistemas radiométricos y no radiométricos de BACTEC® (Becton Dickenson Diagnostic Instrument Systems –Sistemas Instrumentales de Diagnóstico Becton Dickenson–, Sparks, Maryland) se  
35 utilizan a menudo para esta tarea. El instrumento BACTEC® 9240, por ejemplo, da acomodo hasta a 240 vasos de cultivo y sirve como incubadora, agitador y sistema de detección. Cada vaso contiene un sensor de CO<sub>2</sub> fluorescente, y los sensores son supervisados en un régimen continuo (por ejemplo, cada diez minutos). Los cultivos son reconocidos como positivos por algoritmos informáticos para la detección del crecimiento basándose en una velocidad de cambio en aumento así como en un incremento sostenido de la producción de CO<sub>2</sub>, en lugar de en el  
40 uso de un umbral o valores de delta, o incrementales, del índice de crecimiento.

Una desventaja de estas soluciones de detección de microorganismos es que no siempre detectan cultivos que contienen microorganismos. Así, pues, lo que se necesita en cada uno de los sistemas anteriormente expuestos son  
45 métodos mejorados para determinar si un cultivo situado en el interior de un vaso contiene una pluralidad de microorganismos.

El documento US 2006/0115824 A1 describe un método para detectar un microorganismo en un cultivo almacenado en un vaso, en el cual se determina, en diferentes instantes de tiempo, la presencia o ausencia de marcadores  
50 específicos. Subsiguientemente, se determina un valor de índice que es proporcional al número de marcadores presentes. El valor de índice se somete a un seguimiento como indicador de los microorganismos.

El documento US 5.814.474 describe un método para identificar microorganismos en un cultivo almacenado en un vaso, según el cual el gas del espacio de la parte superior del vaso es analizado por un sensor que detecta  
componentes gaseosos específicos de las especies de microorganismos presentes.

55 3. COMPENDIO DE LA INVENCION

A fin de satisfacer las necesidades identificadas en la técnica anterior, la presente invención, en un aspecto, proporciona sistemas, métodos y aparatos que permiten un grado de fiabilidad incrementado en la notificación del estado positivo de un vaso en sistemas de cultivo. La presente invención proporciona, de forma ventajosa, un estado  
60 positivo de alta fiabilidad en un cultivo de sangre.

La presente invención se sirve de la diferencia en la velocidad del cambio metabólico y en la magnitud del cambio para proporcionar información acerca de la fiabilidad de un cambio de estado positivo siguiendo un criterio por vasos  
individuales. La presente invención describe una transformación de datos que puede ser aplicada a datos de crecimiento metabólico o celular de una manera que proporciona fiabilidad en lo que respecta a que un cultivo  
65 situado en el interior de un vaso esté infectado con un microorganismo (positivo de alta fiabilidad), y elimina

esencialmente la posibilidad de determinaciones de falsos negativos, tal como existen en la actualidad en sistemas de cultivo conocidos. El positivo de alta fiabilidad puede, por ejemplo, ser aplicado a casos en que ha comenzado el crecimiento pero el vial no estaba siendo medido. Un ejemplo de ello es el caso en que un vaso se encuentra con retardos significativos entre el momento en que se recogió el espécimen dentro del vaso y el momento en que el vaso entra en el instrumento de medición. El algoritmo positivo de alta fiabilidad puede ser aplicado a vasos que tienen lapsos de lectura de medición resultantes de diversas causas que incluyen la pérdida de potencia, un fallo del instrumento y tiempos muertos debidos al servicio. El beneficio para el usuario es una reducción de la necesidad de vasos de cultivos subordinados, o subcultivos, con los que han venido surgiendo estos tipos de interrupciones del protocolo. Por otra parte, el positivo de elevada fiabilidad puede ser vinculado con procedimientos de ensayo positivo como una métrica de cuantificación biológica. Por ejemplo, un cultivo puede ser detectado como positivo a un valor de cambio de velocidad promedio (ART) de 100, puede requerirse la masa celular de un  $ART = 200$  para llevar a cabo una rápida identificación de la caracterización molecular del microorganismo presente, y un valor de  $ART > 400$  puede requerir de dilución antes de procedimientos rápidos de identificación o codificación genética.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar si un cultivo situado en el interior de un vaso contiene una pluralidad de microorganismos. En el método, se calcula un valor relativo de normalización para cada medición respectiva de una pluralidad de mediciones de un estadio biológico del cultivo del interior del vaso, tomadas en diferentes instantes de tiempo entre un primer instante de tiempo y un segundo instante de tiempo, entre (i) la respectiva medición y (ii) un estadio biológico inicial del cultivo, tomado en un instante de tiempo inicial, con lo que se forma una pluralidad de valores relativos de normalización.

La pluralidad de valores relativos de normalización puede ser fragmentada, según un criterio temporal, en intervalos fijos predeterminados de instantes temporales entre el primer instante de tiempo y el segundo instante de tiempo. Por ejemplo, un primer intervalo fijo predeterminado puede incluir los diez primeros valores relativos de normalización, un segundo intervalo fijo predeterminado puede incluir los diez siguientes valores relativos de normalización, y así sucesivamente hasta que se llega al segundo instante de tiempo. Para cada uno de estos respectivos intervalos fijos predeterminados de instantes de tiempo entre el primer instante de tiempo y el segundo instante de tiempo, se determina una primera derivada de los valores relativos de normalización dentro del respectivo intervalo fijo predeterminado, con lo que se forman una pluralidad de valores de transformación de velocidad.

Existe un valor de transformación de velocidad para cada intervalo fijo predeterminado de instantes temporales. Puede considerarse que la pluralidad de valores de transformación de velocidad comprende una pluralidad de conjuntos de valores de transformación de velocidad. Cada conjunto respectivo de valores de transformación de velocidad está destinado a un conjunto diferente de instantes temporales contiguos entre el primer instante de tiempo y el segundo instante de tiempo. Por ejemplo, el primer conjunto de valores de transformación de velocidad puede ser los siete primeros valores de transformación de velocidad de la pluralidad de valores de transformación de velocidad, el segundo conjunto de valores de transformación de velocidad puede ser los siete siguientes valores de transformación de velocidad de la pluralidad de valores de transformación de velocidad, y así sucesivamente. Para cada conjunto respectivo de valores de transformación de velocidad de la pluralidad de conjuntos de valores de transformación de velocidad, se computa un valor de transformación relativo promedio como medida de la tendencia central de cada uno de los valores de transformación de velocidad del respectivo conjunto de valores de transformación de velocidad. Se computa, de esta manera, una pluralidad de valores de transformación relativos promedio.

Por otra parte, en el método, se obtiene bien (i) un primer resultado, bien (ii) un segundo resultado, o bien (iii) tanto un primer resultado como un segundo resultado. El primer resultado está basado en una determinación acerca de si algún valor de transformación relativo promedio de la pluralidad de valores de transformación relativos promedio excede un primer valor de umbral. El segundo resultado está basado en una determinación acerca de si una extensión del crecimiento exhibida por el cultivo excede un segundo valor de umbral. Se utiliza el primer resultado o el segundo resultado para determinar si el cultivo del interior del vaso contiene la pluralidad de microorganismos.

En algunas realizaciones, el método comprende, de manera adicional, suministrar como salida el primer resultado, el segundo resultado, o una determinación acerca de si el cultivo del interior del vaso contiene la pluralidad de microorganismos, a un dispositivo de interfaz de usuario, un monitor, un medio de almacenamiento legible por computadora, una memoria legible por computadora, o un sistema informático local o remoto. En algunas realizaciones, se presenta visualmente el primer resultado, el segundo resultado o la determinación acerca de si el cultivo del vaso contiene la pluralidad de microorganismos.

En algunas realizaciones, el primer instante de tiempo es cinco o más minutos después del instante de tiempo inicial, y el instante de tiempo final es treinta o más horas después del instante de tiempo inicial. En algunas realizaciones, el primer instante de tiempo es entre 0,5 horas y 3 horas después del instante de tiempo inicial, y el instante de tiempo final es entre 4,5 horas y veinte horas después del instante de tiempo inicial. En algunas realizaciones, la medición de una tendencia central de los valores de transformación de velocidad de un primer conjunto de valores de transformación de velocidad de la pluralidad de conjuntos de valores de transformación de velocidad, comprende

(i) una media geométrica, (ii) una media aritmética, una mediana o una moda de cada uno de los valores de transformación de velocidad del primer conjunto de valores de transformación de velocidad.

5 En algunas realizaciones, cada una de las mediciones de la pluralidad de mediciones del estadio biológico del cultivo se toma, para el cultivo, a un intervalo de tiempo periódico entre el primer instante de tiempo y el segundo instante de tiempo. En algunas realizaciones, el intervalo de tiempo periódico es una cantidad de tiempo comprendida entre un minuto y veinte minutos, entre cinco minutos y quince minutos, o entre 0,5 minutos y 120 minutos.

10 En algunas realizaciones, el estadio biológico inicial del cultivo se determina por una salida de fluorescencia de un sensor que está en contacto con el cultivo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la magnitud de la salida de fluorescencia del sensor se ve afectada por la concentración de CO<sub>2</sub>, la concentración de O<sub>2</sub>, o el pH.

15 En algunas realizaciones, valores entre 10 y 50.000 mediciones, entre 100 y 10.000 mediciones, o entre 150 y 5.000 mediciones se encuentran dentro de la pluralidad de mediciones del estadio biológico del cultivo. En algunas realizaciones, cada intervalo fijo predeterminado respectivo de instantes temporales comprende, o consiste en, cada uno de los valores de transformación de velocidad para instantes temporales situados dentro de una ventana temporal entre el primer instante de tiempo y el segundo instante de tiempo, de tal manera que la ventana temporal es un periodo de tiempo que está comprendido entre veinte minutos y diez horas, entre veinte minutos y dos horas, o entre treinta minutos y noventa minutos.

20 En algunas realizaciones, cada conjunto de valores de transformación de velocidad de la pluralidad de valores de transformación de velocidad comprende, o consiste en, entre cuatro y veinte, entre cinco y quince, o entre 2 y 100 valores de transformación de velocidad contiguos. En algunas realizaciones, existen entre cinco y quinientos, o entre veinte y cien, valores de transformación relativos promedio en la pluralidad de valores de transformación relativos promedio. En algunas realizaciones, el volumen del cultivo está comprendido entre 1 ml y 40 ml, entre 2 ml y 10 ml, o bien es menor que 100 ml, o es mayor que 100 ml.

30 En algunas realizaciones, el vaso contiene una composición detectora en comunicación de fluido con el cultivo, de tal manera que la composición detectora comprende un compuesto luminiscente que exhibe un cambio en sus propiedades luminiscentes cuando es irradiado con luz que contiene longitudes de onda que provocan que dicho compuesto luminiscente emita luminiscencia al ser expuesto al oxígeno, y de tal modo que la presencia de la composición detectora no es destructiva para el cultivo, y de manera que el estadio biológico inicial del cultivo es medido por el método de (i) irradiar la composición detectora con luz que contiene longitudes de onda que provocan que el compuesto luminiscente emita luminiscencia, y (ii) observar la intensidad luminosa de la luminiscencia procedente del compuesto luminiscente al tiempo que se irradia la composición detectora con la luz. En algunas realizaciones, el compuesto luminiscente está contenido en el seno de una matriz que es relativamente impermeable al agua y a los solutos no gaseosos, pero que presenta una alta permeabilidad al oxígeno. En algunas realizaciones, la matriz comprende caucho o plástico.

40 En algunas realizaciones, la extensión del crecimiento (EG –“extension of growth”–) es el valor relativo de normalización máximo de la pluralidad de valores relativos de normalización. En algunas realizaciones, la extensión del crecimiento se determina por la ecuación:

$$EG = NR_{\text{tras\_crecimiento}} - NR_{\text{crecimiento\_mínimo}}$$

45 donde

50 NR<sub>tras\_crecimiento</sub> es un valor relativo de normalización de la pluralidad de valores relativos de normalización que se utilizó en el cálculo de (i) el primer valor de transformación relativo promedio que sigue a un valor de transformación relativo promedio máximo, (ii) un valor de transformación relativo promedio máximo, o (iii) un primer valor de transformación relativo promedio que precede al valor de transformación relativo promedio máximo de la pluralidad de valores de transformación relativos promedio, y

55 NR<sub>crecimiento\_mínimo</sub> es un valor relativo de normalización de la pluralidad de valores relativos de normalización que se utilizó en el cálculo del primer valor de transformación relativo promedio con el fin de conseguir un tercer valor de umbral. En algunas realizaciones, el tercer valor de umbral es un valor entre 5 y 100 o un valor entre 25 y 75.

60 Ventajosamente, utilizando los novedosos sistemas, métodos y aparatos de la presente invención, puede programarse un sistema de incubación, tal como el sistema de cultivo de sangre BACTEC<sup>®</sup>, para que determine si un cultivo está infectado con microorganismos antes de que se lleven a cabo ensayos manuales, tales como una mancha de Gram o un subcultivo. Brevemente, un cultivo es identificado como positivo en cuanto a infección con microorganismos, por parte de una incubadora, mediante el análisis de parámetros nuevos (por ejemplo, el valor de transformación relativo promedio, la extensión del crecimiento exhibida por el cultivo) asociados con el metabolismo del microorganismo. Tales cultivos presentarán un metabolismo incrementado con respecto a cultivos no infectados y, con este criterio, puede ser detectada la infección por el microorganismo. Si bien los ensayos divulgados en esta

memoria son de la mayor precisión cuando un único tipo de microorganismo está infectando un cultivo, es posible detectar la infección por microorganismos cuando múltiples tipos de microorganismos (por ejemplo, múltiples especies de microorganismos) infectan un único cultivo.

5 Aunque se proporcionan numerosos valores a modo de ejemplo para los nuevos parámetros (por ejemplo, el valor de transformación relativo promedio, la extensión del crecimiento exhibida por el cultivo) divulgados en la presente memoria, en los datos presentados en esta memoria para detectar si un cultivo está infectado con microorganismos, utilizando unos medios dados, ha de apreciarse que estos valores de los nuevos parámetros pueden cambiar cuando los medios utilizados para dar soporte al crecimiento del cultivo son alterados. Es más, es posible que los  
10 valores de los nuevos parámetros puedan variar cuando se utiliza una incubadora diferente. De esta forma, preferiblemente, la misma incubadora que se utiliza para generar valores de referencia para la detección de una infección por microorganismos, debe utilizarse para cultivos en los que el estado del microorganismo no es conocido. Y, lo que es más, los mismos medios de cultivo utilizados para generar valores de referencia para la  
15 detección de una infección por microorganismos, han de utilizarse para cultivos en los que el estado del microorganismo no es conocido.

En algunas realizaciones, se considera que el cultivo contenido en el vaso contiene la pluralidad de microorganismos cuando un valor de transformación relativo promedio de la pluralidad de valores de transformación relativos promedio excede el primer valor de umbral. En algunas realizaciones, se considera que el cultivo contenido en el  
20 vaso contiene la pluralidad de microorganismos cuando la extensión del crecimiento exhibida por el cultivo excede el segundo valor de umbral.

En algunas realizaciones, el método determina que el cultivo contenido en el vaso contiene la pluralidad de microorganismos, y la pluralidad de microorganismos son bacterias de la familia de las Enterobacteriaceae. En algunas realizaciones, el método determina que el cultivo contiene la pluralidad de microorganismos, y la pluralidad de microorganismos del cultivo es (i) Enterobacteriaceae, (ii) Staphylococcaceae, (iii) Streptococcus o (iv) Acinetobacter. En algunas realizaciones, el método determina que el cultivo contiene la pluralidad de microorganismos, y la pluralidad de microorganismos es *Alishewanella*, *Alterococcus*, *Aquamonas*, *Aranicola*,  
25 *Arsenophonus*, *Azotivirga*, *Blochmannia*, *Brenneria*, *Buchnera*, *Bubvicia*, *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* o *Yokenella*.

35 En algunas realizaciones, el método determina que el cultivo del vaso contiene la pluralidad de microorganismos, y la pluralidad de microorganismos son una única especie de Staphylococcaceae seleccionada de entre el grupo consistente en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus pettenkofferi*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus warneri* y *Staphylococcus xylosus*.

40 En algunas realizaciones, el método determina que el cultivo contiene la pluralidad de microorganismos, y la pluralidad de microorganismos es *Staphylococcus aureus* o *staphylococci* de coagulasa negativa. En algunas realizaciones, el método determina que el cultivo contiene la pluralidad de microorganismos, y la pluralidad de microorganismos son una única especie de Streptococcus seleccionada de entre el grupo consistente en *S. agalactiae*, *S. bovis*, *S. mutans*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. suis*, *Streptococcus viridans* y *Streptococcus uberis*.

50 En algunas realizaciones, el método determina que el cultivo del vaso contiene la pluralidad de microorganismos, y la pluralidad de microorganismos es aeróbica. En algunas realizaciones, el método determina que el cultivo del vaso contiene la pluralidad de microorganismos, y la pluralidad de microorganismos es anaeróbica. En algunas realizaciones, el estadio biológico inicial del cultivo se mide por unos medios colorimétricos, unos medios fluorescentes, unos medios nefelométricos o unos medios infrarrojos. En algunas realizaciones, cada estadio biológico de la pluralidad de mediciones del estadio biológico se determina por unos medios colorimétricos, unos medios fluorométricos, unos medios nefelométricos o unos medios infrarrojos. En algunas realizaciones, el cultivo es  
55 un cultivo sanguíneo procedente de un sujeto.

En algunas realizaciones, se obtiene únicamente el primer resultado, que se utiliza para determinar si el cultivo del vaso contiene la pluralidad de organismos. En algunas realizaciones, únicamente el segundo resultado es utilizado para determinar si el cultivo del vaso contiene la pluralidad de organismos. En algunas realizaciones, el primer  
60 resultado y el segundo resultado son utilizados para determinar si el cultivo del vaso contiene la pluralidad de organismos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un aparato para determinar si un cultivo de un vaso contiene una pluralidad de microorganismos, de tal manera que el aparato comprende un procesador y una memoria conectada al procesador, para llevar a cabo cualquiera de los métodos divulgados en esta memoria. En aún otro aspecto de la  
65

presente invención, un medio legible por computadora almacena un producto de programa informático para determinar si un cultivo de un vaso contiene una pluralidad de microorganismos, de tal manera que el producto de programa informático es ejecutable por una computadora. El producto de programa informático comprende instrucciones para llevar a cabo cualquiera de los métodos divulgados en la presente memoria.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar si un cultivo de un vaso contiene una pluralidad de microorganismos. El método comprende obtener una pluralidad de mediciones del estadio biológico del cultivo, de tal modo que cada medición de la pluralidad de mediciones se toma en un instante de tiempo diferente comprendido entre un primer instante de tiempo y un segundo instante de tiempo. El método comprende, de manera adicional, determinar, para cada intervalo fijo predeterminado respectivo de instantes temporales entre el primer instante temporal y el segundo instante temporal, una primera derivada de las mediciones del estadio biológico dentro del respectivo intervalo fijo predeterminado de instantes de tiempo, con lo que se forma una pluralidad de valores de transformación de velocidad, de tal manera que la pluralidad de valores de transformación de velocidad comprende una pluralidad de conjuntos de valores de transformación de velocidad, de forma que cada conjunto respectivo de valores de transformación de velocidad de la pluralidad de conjuntos de valores de transformación de velocidad es para un conjunto diferente de instantes temporales contiguos entre el primer instante de tiempo y el segundo instante de tiempo. El método comprende, de manera adicional, computar, para cada conjunto respectivo de valores de transformación de velocidad de la pluralidad de conjuntos de valores de transformación de velocidad, un valor de transformación relativo promedio como una medida de la tendencia central de cada uno de los valores de transformación de velocidad del conjunto respectivo de valores de transformación de velocidad, con lo que se computa una pluralidad de valores de transformación relativos promedio. El método comprende, adicionalmente, obtener (i) un primer resultado basándose en una determinación acerca de si algún valor de transformación relativo promedio de la pluralidad de valores de transformación relativos promedio excede un primer valor de umbral, o (ii) un segundo resultado basándose en una determinación acerca de si una extensión del crecimiento exhibida por el cultivo excede un segundo valor de umbral. El método comprende, de manera adicional, utilizar el primer resultado o el segundo resultado para determinar si el cultivo del vaso contiene la pluralidad de microorganismos.

Así, pues, los sistemas y métodos de la presente invención pueden proporcionar una variedad de aplicaciones de utilidad en microbiología y en campos relacionados, y encuentran aplicación particular en procedimientos de ensayo de esterilidad de cultivos celulares.

#### 4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 ilustra un aparato para determinar si un cultivo situado en un vaso contiene una pluralidad de microorganismos, de tal manera que el aparato comprende un procesador y una memoria conectada al procesador, de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 2 representa un dibujo esquemático de un vaso de cultivo y un sistema detector de CO<sub>2</sub> de acuerdo con una realización de la presente invención.

Las Figuras 3A y 3B ilustran un método para determinar si un cultivo de un vaso contiene una pluralidad de microorganismos, de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 4 muestra una representación gráfica de valores relativos de normalización medidos a partir de un cultivo de sangre contenido en un vaso, de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 5 es una representación gráfica de los valores de transformación relativos promedio a lo largo del tiempo, basándose en la velocidad promedio de cambio en valores de transformación de velocidad de la Figura 4 a lo largo del tiempo, de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 6 es la representación gráfica de la segunda derivada de valores relativos de normalización de la Figura 4, y muestra los cambios en la velocidad del metabolismo con el tiempo, de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 7 es una representación gráfica de la señal fluorescente compensada frente al tiempo para un falso negativo clínico de *Enterococcus faecalis*.

La Figura 8 es una representación gráfica de valores relativos normalizados frente al tiempo para un falso negativo clínico de *Enterococcus faecalis*.

La Figura 9 es una representación gráfica de la transformación de velocidad promedio frente al tiempo para un falso negativo clínico de *Enterococcus faecalis*.

Los mismos números de referencia aluden a partes correspondientes a lo largo de todas las diversas vistas de los dibujos.

#### 5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se proporcionan sistemas, métodos y aparatos para determinar si un cultivo situado en el interior de un vaso contiene una pluralidad de microorganismos. Se calcula un valor relativo de normalización para cada medición respectiva de un estadio biológico del cultivo entre (i) la medición respectiva y (ii) un estadio biológico inicial. Para cada intervalo fijo de instantes temporales entre un primer instante temporal y un segundo instante temporal, se calcula una derivada de los valores relativos de normalización para mediciones del estadio biológico situadas dentro del intervalo de instantes de tiempo, con lo que se forma una pluralidad de valores de transformación de velocidad. Para cada conjunto de valores de transformación de velocidad de la pluralidad de valores de transformación de

velocidad, se computa una medición de la tendencia central de los valores del conjunto, con lo que se forma una pluralidad de valores de transformación relativos promedio. Se realiza una determinación acerca de si el cultivo contiene los microorganismos basándose en si algún valor de transformación relativo promedio excede un primer umbral, o en si una extensión del crecimiento exhibido por el cultivo excede un segundo umbral.

Un tal sistema en el que la presente invención puede ser implementada es el sistema de cultivo de sangre BACTEC®. El sistema de cultivo de sangre BACTEC® se sirve de sensores fluorescentes que informan de cambios en el sistema cuando se produce un metabolismo microbiano. Se aplican entonces a la secuencia de datos de señal algoritmos que se han diseñado para reconocer cambios en la señal con el tiempo que son indicativos de la presencia de microorganismos en crecimiento. Se le notifica al usuario cuando el sistema constata evidencia de crecimiento (cambio de estado a un vial positivo), y el vaso es entonces tratado para confirmar la presencia de un microorganismo (por ejemplo, utilizando un manchado de Gram y un subcultivo en un medio dispuesto en una placa), antes de iniciar procedimientos para comenzar con la identificación del microorganismo y con determinaciones de susceptibilidad antimicrobiana.

#### 5.1 Definiciones

El término "Acinetobacter", tal y como se utiliza en esta memoria, se refiere a un género negativo frente al ensayo de Gram de bacteria perteneciente al filo Proteobacteria. Las especies de Acinetobacter sin motilidad son negativas frente a la oxidasa y se dan en pares bajo aumento.

La expresión "estadio biológico", tal y como se utiliza en esta memoria, se refiere a una medida de la actividad metabólica de un cultivo, según se determina a través de, por ejemplo, la concentración de CO<sub>2</sub>, la concentración de O<sub>2</sub>, el pH, la velocidad de cambio en la concentración de CO<sub>2</sub>, la velocidad de cambio en la concentración de O<sub>2</sub>, o la velocidad de cambio en el pH del cultivo.

El término "sangre", tal y como se utiliza en esta memoria, significa ya sea sangre entera, ya sea uno cualquiera, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete tipos de célula de entre el grupo de tipos de células consistente en glóbulos rojos, plaquetas, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos. La sangre puede ser de cualquier especie, incluyendo humanos, cualquier animal de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, perros, chimpancés), o cualquier mamífero, si bien no está limitada por estos.

La expresión "cultivo de sangre", tal y como se utiliza en esta memoria, se refiere a cualquier cantidad de sangre que se haya mezclado con medios de cultivo de sangre. Ejemplos de medios de cultivo incluyen caldo de caseína de soja con suplementos, enriquecido de caseína de soja, hemina, bicarbonato sódico, polianetol sulfonato de sodio, sucrosa, HCKI piridoxal, extracto de levadura y L-cisteína, aunque sin estar limitados por estos. Uno o más reactivos que pueden utilizarse como medios de cultivo de sangre se encuentran, por ejemplo, en la divulgación de Stainer et al., 1986, *The Microbial World*, 5ª edición, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, Nueva Jersey, páginas 10-20, 33-37 y 190-195, que se incorpora aquí, en su totalidad, como referencia en la presente memoria para tal propósito. En algunas situaciones, se obtiene un cultivo de sangre cuando un sujeto tiene síntomas de una infección de la sangre o de bacteriemia. Se extrae sangre de un sujeto y se deposita directamente dentro de un vaso que contiene un medio de cultivo nutricional. En algunas realizaciones, se necesitan diez mililitros de sangre para cada vaso.

El término "cultivo", tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier muestra biológica obtenida de un sujeto y que está, bien aislada o bien mezclada con uno o más reactivos que se han concebido para el cultivo de células. La muestra biológica obtenida del sujeto puede ser, por ejemplo, sangre, células, un extracto celular, fluido cefalorraquídeo, plasma, suero, saliva, esputo, un espécimen de tejido, una biopsia de tejido, orina, una secreción de una herida, una muestra obtenida de la superficie de un catéter lineal interno al cuerpo, o un espécimen de brote. El sujeto puede ser un miembro de cualquier especie, incluyendo humanos, cualquier animal de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, perros, chimpancés) o cualquier mamífero, aunque no está limitado por estos. Uno o más reactivos que pueden mezclarse con la muestra biológica se encuentran, por ejemplo, en la divulgación de Stainer et al., 1986, *The Microbial World*, 5ª edición, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, Nueva Jersey, páginas 10-20, 33-37 y 190-195, que se incorpora aquí, en su totalidad, como referencia en la presente memoria para tal propósito. Un ejemplo de cultivo es un cultivo de sangre. En algunas realizaciones, la muestra biológica se da en forma líquida y la cantidad de muestra biológica del cultivo está comprendida entre 1 ml y 150 ml, entre 2 ml y 100 ml, entre 0,5 ml y 90 ml, entre 0,5 ml y 10.000 ml, o entre 0,25 ml y 100.000 ml. En algunas realizaciones, la muestra biológica está en forma líquida y se encuentra entre el 1 y el 99 por ciento del volumen del cultivo, entre el 5 y el 80 por ciento del volumen del cultivo, entre el 10 y el 75 por ciento del volumen del cultivo, tiene menos del 80 por ciento del volumen del cultivo, o más del 10 por ciento del volumen del cultivo. En algunas realizaciones, la muestra biológica se encuentra entre el 1 y el 99 por ciento del peso total del cultivo, entre el 5 y el 80 por ciento del peso total del cultivo, entre el 10 y el 75 por ciento del peso total del cultivo, tiene menos del 80 por ciento del peso total del cultivo, o más del 10 por ciento del peso total del cultivo.

Tal y como se utiliza en esta memoria, el término "Enterobacteriaceae" se refiere a una gran familia de bacterias que incluye la *Salmonella* y la *Escherichia coli*. Se hace referencia también a las Enterobacteriaceae, en esta memoria, como grupo Entérico. Estudios genéticos las sitúan entre las Proteobacteria, y se les ha dado su propio orden

(Enterobacteriales). Los miembros de las Enterobacteriaceae tienen forma de barra y son, por lo común, de entre 1 µm y 5 µm de longitud. Como otras proteobacterias, tienen manchas negativas en el ensayo de Gram, y son anaerobios facultativos, fermentando los 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 carecen generalmente de citocromo c oxidasa, si bien hay excepciones (por ejemplo, *Plesiomonas*). La mayoría de ellas tienen muchos flagelos, pero unos pocos géneros carecen de motilidad. No son formadoras de esporas y, excepto para las cepas de *Shigella dysenteriae*, son positivas frente a la catalasa. Muchos miembros de esta familia son parte normal de la flora intestinal encontrada en los intestinos de humanos y otros animales, mientras que otros se encuentran en el agua o en el suelo, o son parásitos de una variedad de diferentes animales y plantas. La mayoría de miembros de las Enterobacteriaceae tienen fimbrias peritricosas del Tipo I implicadas en la adhesión de las células bacterianas a sus huéspedes. Géneros de las Enterobacteriaceae incluyen *Alishewanella*, *Alterococcus*, *Aquamonas*, *Aranicola*, *Arsenophonus*, *Azotivirga*, *Blochmannia*, *Brenneria*, *Buchnera*, *Bubvicia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Dickeya*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia* (por ejemplo, *Erwinia amylovora*), *Escherichia* (por ejemplo, *Escherichia coli*), *Ewingella*, *Griimontella*, *Hafnia*, *Klebsiella* (por ejemplo *Klebsiella neumoniae*), *Kluyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Candidatus Phlomobacter*, *Photorhabdus* (por ejemplo, *Photorhabdus luminescens*), *Plesiomonas* (por ejemplo, *Plesiomonas shigelloides*), *Pragia*, *Proteus* (por ejemplo, *Proteus vulgaris*), *Providencia*, *Rahnella*, *Raoultella*, *Salmonella*, *Samsonia*, *Serratia* (por ejemplo, *Serratia marcescens*), *Shigella*, *Sodalis*, *Tatumella*, *Trabulsiella*, *Wigglesworthia*, *Xenorhabdus*, *Yersinia* (por ejemplo, *Yersinia pestis*) y *Yokenella*, si bien no están limitados por estos. Puede encontrarse más información acerca de las Enterobacteriaceae en la divulgación de Stainer et al., 1986, *The Microbial World*, 5ª edición, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, Nueva Jersey, Capítulo 5, que se incorpora aquí, en su totalidad, como referencia en la presente memoria para tal propósito.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “instancia” se refiere a la ejecución de una etapa dentro de un algoritmo. Algunas etapas de un algoritmo pueden hacerse funcionar varias veces, de manera que se hace referencia a cada repetición de la etapa como instancia de la etapa.

Tal y como se utiliza en esta memoria, el término “microorganismo” se refiere a organismos con un diámetro de 1 mm o menor, excluyendo los virus.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la expresión “tipo de microorganismo” se refiere a cualquier subclase del reino de las bacterias, tal como un filo, clase, orden, familia, género o especie del reino de las bacterias.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término “porción” se refiere a al menos el uno por ciento, al menos el dos por ciento, al menos el diez por ciento, al menos el veinte por ciento, al menos el treinta por ciento, al menos el cincuenta por ciento, al menos el setenta y cinco por ciento, al menos el noventa por ciento, o al menos el 99 por ciento de un conjunto. De esta forma en un ejemplo no limitativo, al menos una porción de una pluralidad de objetos significa al menos el uno por ciento, al menos el dos por ciento, al menos el diez por ciento, al menos el veinte por ciento, al menos el treinta por ciento, al menos el cincuenta por ciento, al menos el setenta y cinco por ciento, al menos el noventa por ciento, o al menos el 99 por ciento de los objetos de la pluralidad.

Tal y como se utiliza en esta memoria, el término “Staphylococcaceae” se refiere a una familia de bacterias comprendida dentro del orden de los Bacillales y que incluye las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus pettenkofferi*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus warneri* y *Staphylococcus xylosum*, si bien no está limitada por estas.

Tal y como se utiliza aquí, el término “Streptococcus” se refiere a un género de bacterias esféricas positivas ante el ensayo de Gram, perteneciente al filo Firmicutes y al grupo de bacterias del ácido láctico. La división celular se produce en estas bacterias a lo largo de un único eje y, por tanto, crecen en cadenas o en pares; de ahí, el nombre – del griego, *streptos*, que significa fácil de doblar o de retorcer, como una cadena–. Esto está en contraste con los estafilococos, que se dividen a lo largo de múltiples ejes y generan agrupamientos o células en forma de racimo de uvas. Las especies de los Streptococcus incluyen *S. agalactiae*, *S. bovis*, *S. mutans*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. suis*, *Streptococcus viridans* y *Streptococcus uberis*, si bien no están limitadas por estos.

Tal y como se utiliza aquí, el término “vaso” se refiere a cualquier recipiente que pueda albergar un cultivo tal como un cultivo de sangre. Por ejemplo, en una realización, un vaso es un recipiente que tiene una pared lateral, una pared de fondo y un extremo superior abierto para recibir un cultivo de manera que quede contenido dentro del recipiente, de tal manera que el recipiente está hecho de un material tal como vidrio, plástico transparente (por ejemplo, un copolímero de olefina cíclico) que tiene la suficiente transparencia para apreciar visualmente la turbidez de la muestra, y de tal modo que el recipiente es, preferiblemente, resistente al calentamiento a una temperatura de al menos 250°C. En algunas realizaciones, el recipiente tiene un espesor de pared suficiente para soportar una presión interna de al menos 1,75 kg/cm<sup>2</sup>, y un elemento de cierre acoplado al extremo abierto del recipiente, de tal modo que el cultivo carece sustancialmente de contaminación tras su almacenamiento dentro del vaso durante un



periodo prolongado de tiempo, en condiciones ambientales. Recipientes proporcionados a modo de ejemplo se describen en la Patente de los EE.UU. N° 6.432.697, que se incorpora a esta memoria como referencia, por la presente. En algunas realizaciones, el periodo prolongado de tiempo bajo condiciones ambientales es al menos aproximadamente un año, a aproximadamente 40°C. En algunas realizaciones, el vaso comprende, de manera adicional, un compuesto detector fluorescente fijado a una superficie interior del recipiente, que, cuando se expone al oxígeno, exhibe una reducción de la intensidad fluorescente al exponerse a luz de fluorescencia. En algunas realizaciones, el recipiente es sustancialmente transparente a dicha luz de fluorescencia. En algunas realizaciones, el compuesto detector fluorescente comprende al menos un compuesto seleccionado de entre el grupo consistente en sales de tris-4,7-difenil-1,10-fenantrolina rutenio (II), sales de tris-2,2'-bipiridil rutenio (II), 9,10-difenilantraceno, así como mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, un vaso es un vial de cultivo Blood Culture BACTEC®LYTIC/10 Anaerobic/F, un vial BBL®SEPTI-CHEK®, una botella de 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 vial de cultivo Becton Dickinson BACTEC® PEDS PLUS®/F, o un vial de Becton Dickinson BACTEC® Standard Anaerobic/F (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey).

### 5.2 Ejemplo de aparato

La Figura 1 detalla un aparato 11 para determinar si un cultivo situado dentro de un vaso contiene una pluralidad de microorganismos, el cual comprende un procesador y una memoria conectada al procesador. 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, automatizado o semiautomatizado. El aparato 11 comprende, preferiblemente:

- una unidad central de procesamiento;
- opcionalmente, una unidad principal de almacenamiento no volátil 14, por ejemplo, un dispositivo de accionamiento de disco duro, a fin de almacenar software y datos, de tal manera que la unidad de almacenamiento 14 está controlada por un controlador de almacenamiento 12;
- una memoria 36 del sistema, preferiblemente una memoria de acceso aleatorio (RAM –“random access memory”–) de alta velocidad, para almacenar programas de control del sistema de almacenamiento, datos y programas de aplicación, que comprende programas y datos (opcionalmente cargados desde la unidad de almacenamiento no volátil 14); la memoria 36 del sistema puede también incluir memoria de solo lectura (ROM –“read-only memory”–);
- una interfaz 32 de usuario, que comprende uno o más dispositivos de entrada (por ejemplo, un teclado 28, un ratón) y un dispositivo de presentación visual 26 u otro dispositivo de salida;
- un sensor 34 para tomar una medición de un estadio biológico de un cultivo dispuesto en el interior de un vaso;
- una tarjeta 20 de interfaz de red (circuitos de comunicaciones) para conectarse al sensor 34;
- un bus interno 30 para interconectar los elementos antes mencionados del sistema; y
- una fuente de suministro de energía 24, destinada a alimentar en energía los elementos antes mencionados.

El funcionamiento de la unidad central de procesamiento 22 se controla fundamentalmente por un sistema operativo 40. El sistema operativo 40 puede ser almacenado en la memoria 36 del sistema. En una implementación convencional, la memoria 36 del sistema también incluye:

- un sistema de archivo 42, destinado a controlar el acceso a los diversos archivos y estructuras de datos empleados por la presente invención;
- un módulo 44 de detección de microorganismos, destinado a determinar si un cultivo dispuesto dentro de un vaso contiene una pluralidad de microorganismos;
- una estructura 46 de datos biológicos, destinada a almacenar un estadio biológico inicial 48 del cultivo así como una pluralidad de mediciones del estadio biológico del cultivo, de tal manera que cada medición 50 de la pluralidad de mediciones se toma en un instante temporal diferente comprendido entre un primer instante de tiempo (inicial) y un segundo instante de tiempo (final);
- una tabla de consulta opcional 54, que comprende coincidencias entre (i) una pluralidad de conjuntos de valores, de manera que cada conjunto 56 de valores de la pluralidad de conjuntos de valores comprende un primer valor de umbral 57 y un segundo valor de umbral 58, y (ii) un conjunto de tipos de medios, de tal modo que, para cada conjunto 56 de valores de la pluralidad de conjuntos de valores existe un tipo de medio 59 correspondiente del conjunto de tipos de medios;
- conjuntos 60 de valores de transformación de velocidad, de tal manera que cada conjunto de valores de transformación de velocidad comprende una pluralidad de valores de transformación de velocidad, de tal modo que cada valor 62 de transformación de velocidad consiste en una primera derivada de los valores relativos de normalización asociados con un intervalo fijo predeterminado de instantes temporales;
- un valor de transformación relativo promedio 66 para cada conjunto 60 de valores 62 de transformación de velocidad; y
- una estructura de datos destinada a almacenar una determinación 68 acerca de si un cultivo de un vaso

contiene una pluralidad de microorganismos.

Como se ha ilustrado en la Figura 1, el aparato 11 puede comprender datos tales como la estructura 46 de datos de estadio biológico, la tabla de consulta opcional 54, conjuntos 60 de valores de transformación de velocidad, valores de transformación relativos promedio 66, así como una determinación 68 acerca de si un cultivo dispuesto en el vaso contiene una pluralidad de microorganismos. En algunas realizaciones, la memoria 36 o el dispositivo de almacenamiento de datos opcional 14 también almacena una medida de la tendencia central de los valores de transformación relativos promedio 66. Los datos descritos anteriormente pueden darse en cualquier forma de dispositivo de almacenamiento de datos, incluyendo un archivo plano, una base de datos relacional (SQL) o una base de datos de tratamiento analítico en línea (OLAP –“on-line analytical processing”–) (MDX y/o variantes de la misma), si bien no están limitados por estos. En algunas realizaciones, tales estructuras de datos son almacenadas en una base de datos que comprende un esquema en estrella que no es almacenado como un cubo, sino que tiene tablas de dimensiones que definen una jerarquía. Aún adicionalmente, en algunas realizaciones, tales estructuras de datos son almacenadas en una base de datos que tiene una jerarquía que no es explícitamente eludida en la base de datos o esquema de base de datos o esquema de base de datos subyacente (por ejemplo, tablas de dimensiones que no están jerárquicamente dispuestas). En algunas realizaciones, tales estructuras de datos son almacenadas en el aparato 11. En otras realizaciones, todas estas estructuras de datos, o una parte de ellas, son alojadas (almacenadas) en una o más computadoras a las que puede dirigirse el aparato 11 a través de la Internet / una red que no se ha representado en la Figura 1. En algunas realizaciones, la totalidad o una parte de uno o más de los módulos de programa representados en el aparato 11 de la Figura 1, tal como el módulo 44 de detección de microorganismos, son, de hecho, residentes en un dispositivo (por ejemplo, computadora) distinto del aparato 11, al que puede dirigirse el aparato 11 a través de la Internet / una red que no se ha representado en la Figura 1.

El aparato 11 determina la actividad metabólica de un cultivo mediante, por ejemplo, la concentración de CO<sub>2</sub>, la concentración de O<sub>2</sub>, el pH, una velocidad de cambio en la concentración de CO<sub>2</sub>, una velocidad de cambio en la concentración de O<sub>2</sub>, o una velocidad de cambio en el pH de un 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 da acomodo a varios vasos de cultivo y sirve como incubadora, agitador y sistema de detección. Estos componentes del aparato 11 no se han representado en la Figura 1 debido a que la naturaleza de tales componentes variará ampliamente dependiendo de la configuración exacta del aparato 11. Por ejemplo, el número de vasos acomodados por el aparato puede oscilar entre un único vaso y más de 1.000 vasos. Puede haber un sensor asociado con cada vaso al objeto de medir el estadio biológico del cultivo contenido dentro del vaso. El sensor puede encontrarse en cualquier ubicación del vaso y existe una amplia variedad de sensores que pueden ser utilizados.

La Figura 2 ilustra un sensor proporcionado a modo de ejemplo, que es capaz de medir el estado biológico de un cultivo. En la Figura 2, un sensor de CO<sub>2</sub> 204 está unido a la base de la botella de cultivo 202 (vaso) y sobre él se ha dispuesto una cierta cantidad de cultivo. El sensor de CO<sub>2</sub> es impermeable a los iones, a los componentes del medio y al cultivo, pero es libremente permeable al CO<sub>2</sub>. El dióxido de carbono producido por las células del cultivo se difunde dentro del sensor 204 y se disuelve en el agua presente en la matriz del sensor, generando iones de hidrógeno. Los incrementos en la concentración de iones de hidrógeno (reducciones del pH) aumentan la salida de fluorescencia del sensor 204, por lo que se modifica la señal transmitida desde el filtro de excitación 206 hasta el filtro de emisión 208. El aparato 11 toma mediciones repetidas de la señal que penetra en el filtro de emisión 208 a lo largo del tiempo, y utiliza estos datos para determinar si el cultivo contiene microorganismos sirviéndose de los algoritmos divulgados en esta memoria.

En algunas realizaciones, el aparato 11 es una incubadora, una sacudidora y un detector de fluorescencia que albergarán entre 1 y 1.000 vasos de cultivo (por ejemplo, 96, 240 o 384 vasos de cultivo). En algunas realizaciones, los vasos se han dispuesto en estantes (por ejemplo, estantes circulares o lineales), cada uno de los cuales tiene un cierto número de estaciones de vaso. Por ejemplo, en una realización específica, el aparato 11 albergará 140 vasos dispuestos en seis estantes, de tal manera que cada estante tiene 40 estaciones de vaso. En algunas realizaciones, cada estación de vaso del aparato 11 contiene un diodo emisor de luz y un detector de fotodiodo con filtros de excitación y de emisión apropiados (por ejemplo, como los ilustrados en la Figura 2). En algunas realizaciones, los vasos son sacudidos y calentados a 35 ± 1°C.

### 5.3 Ejemplo de método

Ahora que se ha descrito un aparato proporcionado a modo de ejemplo de acuerdo con la presente invención, se detallarán métodos proporcionados a modo de ejemplo de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, tales métodos pueden ser implementados por el módulo 44 de detección de microorganismos de la Figura 1. Haciendo referencia a la etapa 302 de la Figura 3, se toma un estadio biológico inicial del cultivo. Por ejemplo, haciendo referencia a la Figura 2, en algunas realizaciones, se realiza una lectura inicial del detector 204 para determinar la concentración de CO<sub>2</sub> dentro del sensor. En realizaciones alternativas, se lee, en la etapa 302, una concentración inicial de O<sub>2</sub>, el pH u otros indicadores del estadio biológico del cultivo. En algunas realizaciones, el estadio biológico inicial del cultivo se determina por una salida de fluorescencia de un sensor (por ejemplo, el sensor 204) que está en contacto con el cultivo. En algunas realizaciones, la magnitud de la salida de fluorescencia

del sensor se ve afectada por la concentración de CO<sub>2</sub> de la manera descrita anteriormente en combinación con la Figura 2. En algunas realizaciones, la magnitud de la salida de fluorescencia del sensor se ve afectada por la concentración de O<sub>2</sub>, por el pH o por algún otro indicador del estadio metabólico conocido en la técnica. En general, cualquier observable físico que sea indicativo de la velocidad metabólica del cultivo puede ser medido y almacenado como el estadio inicial. En algunas realizaciones, este observable físico es la acumulación de productos moleculares (un ejemplo de ello es lipopolisacárido con bacterias negativas frente al ensayo de Gram), cambios físicos / químicos no moleculares en el entorno relacionados con el crecimiento (cambios de presión), y/o la producción de dióxido de carbono o de otros metabolitos que se acumulan, o el consumo de sustrato (tal como oxígeno) o la acumulación de material celular.

En algunas realizaciones, se toma, en la etapa 302, un estadio biológico inicial del cultivo de sangre utilizando medios colorimétricos, medios fluorométricos, medios nefelométricos o medios infrarrojos. Ejemplos de medios colorimétricos incluyen el uso de indicadores redox colorimétricos tales como la resazurina / azul de metileno o el cloruro de tetrazolio, o el del compuesto violeta de p-yodonitrotetrazolio, tal como se divulga en la Patente de los EE.UU. N° 6.617.127, que se incorpora aquí, en su totalidad, como referencia en la presente memoria, si bien no están limitados por estos. Otro ejemplo de medios colorimétricos incluye el ensayo colorimétrico que se utiliza en la divulgación de Oberoi et al., 2004: "Comparison of rapid colorimetric method with conventional method in the isolation of mycobacterium tuberculosis" (Comparación de un método colorimétrico rápido con un método convencional en el aislamiento de la tuberculosis micobacteriana), Indian J Med Microbiol 22: 44-46, que se incorpora aquí, en su totalidad, como referencia en la presente memoria. En la divulgación de Oberoi et al., un sistema MB/Bact240 (Organon Teknika) se carga con vasos de cultivo. El principio de funcionamiento de este sistema está basado en la detección del crecimiento micobacteriano por medio de un sensor colorimétrico. Si los organismos están presentes, se produce CO<sub>2</sub> a medida que el organismo metaboliza el glicerol del sustrato. El color del sensor permeable al gas situado en el fondo de cada vaso de cultivo da como resultado un incremento de la reflectancia en la unidad, que es supervisado por el sistema utilizando rayos infrarrojos. Ejemplos de medios colorimétricos incluyen, de manera adicional, cualquier supervisión del cambio en un color de la composición del sensor debido al cambio de la composición del gas, tal como la concentración de CO<sub>2</sub>, del interior de un vaso, que resulta del metabolismo del microorganismo.

Ejemplos de medios fluorométricos y colorimétricos se divulgan en la Patente de los EE.UU. N° 6.096.272, que se incorpora aquí, en su totalidad, como referencia en la presente memoria y que divulga un sistema instrumental en el que se ha dispuesto un carrusel rotativo para incubación y desplazamiento paso a paso, y en el cual existen múltiples fuentes de luz, cada una de las cuales emite luz de diferente longitud de onda para la detección colorimétrica y fluorométrica. Tal y como se utilizan en esta memoria, los medios nefelométricos se refieren a la medición de la turbidez del cultivo utilizando un nefelómetro. Un nefelómetro es un instrumento para la medición de partículas suspendidas en un coloide líquido o gaseoso. Lleva esto a cabo empleando un haz de luz (haz de fuente) y detector de luz dispuesto a un lado (habitualmente a 90°) del haz de fuente. La densidad de partículas es entonces función de la luz que se refleja al interior del detector desde las partículas. En cierta medida, la cantidad de luz que se refleja para una densidad de partículas dada depende de propiedades de las partículas tales como su forma, su color y su reflectividad. En consecuencia, el establecimiento de una correlación de trabajo entre la turbidez y los sólidos suspendidos (una cuantificación más útil, pero, por lo común, más difícil, de las partículas) ha de determinarse independientemente para cada situación.

Tal y como se utilizan aquí, unos medios infrarrojos para medir un estadio biológico de un cultivo de sangre son cualquier sistema o método de detección de microorganismos por infrarrojos conocido en la técnica, incluyendo los divulgados en la Patente de los EE.UU. N° 4.889.992 así como en la Publicación PCT número WO/2006071800, cada una de las cuales se incorpora aquí, en su totalidad, como referencia en la presente memoria, si bien no están limitados por estos. En algunas realizaciones, los datos recogidos en la etapa 302 y en ciertas etapas subsiguientes son clasificados y recogidos en una base de datos que incluye información de identificación para los vasos, tal como la identificación del vaso (por ejemplo, mediante números de secuencia y acceso), un registro de las fechas de inoculación, o la cantidad de una muestra biológica en el cultivo.

En algunas realizaciones, el vaso 202 que alberga el cultivo comprende una composición detectora 204 en comunicación de fluido con el cultivo. En tales realizaciones, la composición detectora 204 comprende un compuesto luminiscente que exhibe un cambio en las propiedades luminiscentes cuando es irradiado con luz que contiene longitudes de onda que provocan que el compuesto luminiscente emita luminiscencia al ser expuesto al oxígeno. La presencia de la composición detectora 204 no es destructiva en relación con el cultivo de sangre. En tales realizaciones, la etapa de medición 302 (y cada una de las instancias de la etapa de medición 308) comprende irradiar la composición detectora 202 con luz que contiene longitudes de onda que provocan que el compuesto luminiscente emita luminiscencia, y observar la intensidad de la luz luminiscente procedente del compuesto luminiscente mientras se irradia la composición detectora con la luz. En algunas realizaciones, el compuesto luminiscente está contenido en el seno de una matriz que es relativamente impermeable al agua y a solutos no gaseosos, pero que presenta una elevada permeabilidad al oxígeno. En algunas realizaciones, la matriz comprende caucho o plástico. Más detalles de sensores de acuerdo con esta realización de la presente invención se divulgan en la Patente de los EE.UU. N° 6.900.030, que se incorpora aquí, en su totalidad, como referencia en la presente

memoria.

5 En la etapa opcional 304, el estadio biológico inicial medido del cultivo con una inicialización a partir de la etapa 302, se estandariza y almacena como el estadio biológico inicial del cultivo de sangre 48 (por ejemplo, al cien por ciento o con algún otro valor predeterminado). Este estadio biológico inicial, almacenado como elemento de datos 48 en la Figura 1, sirve como valor de referencia frente a las mediciones subsiguientes del estadio biológico del cultivo de sangre. En algunas realizaciones, la etapa 304 no se lleva a cabo y se utilizan las mediciones absolutas de la etapa 302 en los algoritmos que se describen en esta memoria.

10 El aparato 11 incuba el cultivo durante un periodo de tiempo predeterminado desde que se toma la medición del estadio biológico inicial. A continuación, una vez que ha transcurrido el periodo de tiempo predeterminado, el aparato 11 realiza otra medición del estadio biológico del cultivo. Este procedimiento se ilustra por las etapas 306 y 308 en la Figura 3. En la Figura 3A, el procedimiento se muestra en su avance hacia el salto de tiempo  $t$ , en la etapa 306. El estadio biológico durante el periodo de tiempo de la etapa 306 en que el aparato espera el instante avanzar un salto de tiempo  $t$ , no se utiliza en etapas de procedimiento subsiguientes para averiguar el tipo de microorganismo del cultivo. En la etapa 308, una vez que el tiempo ha avanzado en el salto de tiempo  $t$ , se toma de nuevo una medición del estadio biológico del cultivo contenido en el vaso de la misma manera como se tomó la medición inicial del estadio biológico (por ejemplo, utilizando el dispositivo representado en la Figura 2). En algunas realizaciones, el periodo de tiempo predeterminado (la duración del salto de tiempo  $t$ ) es diez minutos. En algunas realizaciones, el periodo de tiempo predeterminado (la duración del salto de tiempo  $t$ ) es un periodo de tiempo que es menor que 5 minutos, un periodo de tiempo que es menor que 10 minutos, un periodo de tiempo que es menor que 15 minutos, un periodo de tiempo que es menor que 20 minutos, un periodo de tiempo que está comprendido en el intervalo entre 1 minuto y 30 minutos, un periodo de tiempo que está comprendido en el intervalo entre 1 minuto y 20 minutos, un periodo de tiempo que está comprendido en el intervalo entre 5 minutos y 15 minutos, o un periodo de tiempo que es mayor que 5 minutos. La medición del estadio biológico del cultivo contenido en el vaso 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 la medición inicial de la etapa 302 es utilizada para la normalización. En una realización, la medición del estadio biológico del cultivo contenido en el vaso tomada en la etapa 308 se convierte en un valor relativo de normalización tomando la relación de la medición de la etapa 308 frente a la medición inicial de la etapa 302. En algunas realizaciones, este valor relativo de normalización computado es almacenado como un elemento de datos 50 de la Figura 1. En algunas realizaciones, la medición del estadio biológico medido en la etapa 308 es almacenada como un elemento de datos 50 en la Figura 1, y el valor relativo de normalización correspondiente a la medición del estadio biológico medido en la etapa 308 es computado según se necesite en subsiguientes etapas de tratamiento.

35 En la etapa 310, se realiza una determinación acerca de si ha transcurrido un primer intervalo de tiempo fijo predeterminado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el intervalo de tiempo fijo predeterminado es setenta minutos. En dicho ejemplo, si el salto de tiempo  $t$  de la etapa 306 es de 10 minutos, entonces será necesario que el salto de tiempo  $t$  haya avanzado siete veces antes de que se alcance la condición 310-Sí. En algunas realizaciones, el intervalo de tiempo fijo predeterminado es una duración temporal que está comprendida entre cinco minutos y cinco horas, una duración temporal que está comprendida entre veinte minutos y diez horas, una duración temporal que está comprendida entre veinte minutos y dos horas, una duración temporal que está comprendida entre treinta minutos y noventa minutos, una duración temporal que es de menos de 24 horas, o una duración temporal que es de más de 24 horas. Una vez transcurrido el primer intervalo de tiempo fijo predeterminado (310-Sí), el control del procedimiento pasa a la etapa 312, en la que se lleva a cabo una etapa adicional del algoritmo. En el caso de que no haya transcurrido el primer intervalo de tiempo fijo predeterminado (310-No), el control del procedimiento pasa de vuelta a la etapa 306, en la que el algoritmo espera el instante de avanzar en la cantidad de tiempo  $t$ , antes de tomar, una vez más, una medición del estadio biológico del cultivo en una nueva instancia de la etapa 308.

40 El resultado neto de las etapas 306 a 310 es que se toman una pluralidad de mediciones de un estadio biológico del cultivo contenido en el vaso, y que cada medición de la pluralidad de mediciones es en un instante temporal diferente comprendido entre un primer instante de tiempo (inicial) y un instante de tiempo de terminación (final). Por otra parte, en realizaciones típicas en las que el salto de tiempo  $t$  es de la misma magnitud en cada instancia de la etapa 306, cada una de las mediciones de la pluralidad de mediciones se toma del cultivo a un intervalo periódico. En algunas realizaciones, el intervalo periódico es un lapso de tiempo comprendido entre un minuto y veinte minutos, un lapso de tiempo comprendido entre cinco minutos y quince minutos, un lapso de tiempo comprendido entre treinta segundos y cinco horas, o un lapso de tiempo que es mayor que un minuto.

50 Una vez que ha transcurrido un intervalo fijo predeterminado (310-Sí), se computa, en la etapa 312, una primera derivada de los valores relativos de normalización dentro del respectivo intervalo fijo predeterminado (o valores absolutos obtenidos de la etapa 302, dentro del respectivo intervalo fijo predeterminado, en realizaciones en las que no se lleva a cabo la normalización), con lo que se forma un valor 62 de transformación de velocidad. En otras palabras, el cambio en los valores relativos de normalización durante el intervalo fijo predeterminado se determina en la etapa 312. Nótese que los valores de transformación de velocidad son la primera derivada de valores relativos de normalización en realizaciones en las que los datos de medición son normalizados, y los valores de

transformación de velocidad son la primera derivada de mediciones absolutas obtenidas de la etapa 302, en realizaciones en las que los datos de medición no son normalizados. En algunas realizaciones, el intervalo de tiempo fijo predeterminado a lo largo del cual se computa la primera derivada, consiste en todas las mediciones dentro de un periodo de tiempo inmediatamente precedente que está comprendido entre veinte minutos y dos horas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el intervalo de tiempo fijo predeterminado de la etapa 310 es de setenta minutos y, en la etapa 312, la velocidad de cambio a través de la totalidad de valores relativos de medición de mediciones dentro de este intervalo temporal de setenta minutos (los pasados 70 minutos) se determina en la etapa 312 y se almacena como el valor 62 de transformación de velocidad. En algunas realizaciones, el intervalo de tiempo fijo predeterminado a lo largo del cual se computa la primera derivada (ventana temporal) lo constituyen la totalidad de mediciones dentro de un periodo de tiempo inmediatamente precedente que está comprendido 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 acerca de si se han medido un número predeterminado de valores de transformación de velocidad desde que se cumplió la última condición temporal 314-Sí. Si es así (314-Sí), el control del procedimiento pasa a la etapa 316. Si no (314-No), el control del procedimiento retorna de vuelta a la etapa 306, en la que el control del procedimiento aguarda hasta que haya transcurrido el salto de tiempo  $t$  antes de continuar con la etapa 308, en la que se calcula, una vez más, el valor relativo de normalización del cultivo. Cada instancia de la condición (314-Sí) marca la completitud de un conjunto 60 de valores 62 de transformación de velocidad. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la condición 314-Sí se alcanza cuando se han medido siete nuevos valores 62 de transformación de velocidad. En este ejemplo, un conjunto 60 de valores de transformación de velocidad comprende, o consiste en, los siete valores 62 de transformación de velocidad. En algunas realizaciones, cada conjunto 60 de valores 62 de transformación de velocidad comprende, o consiste en, entre cuatro y veinte valores de transformación de velocidad contiguos. Los valores 62 de transformación de velocidad contiguos son valores de transformación de velocidad del mismo conjunto 60. Tales valores 62 de transformación de velocidad son, por ejemplo, calculados y almacenados en sucesivas instancias de la etapa 312. En algunas realizaciones, cada conjunto 60 de valores 62 de transformación de velocidad de la pluralidad de valores de transformación comprende, o consiste en, entre cinco y quince valores 62 de transformación de velocidad contiguos, entre uno y cien valores 62 de transformación de velocidad contiguos, entre cinco y una quincena de valores 62 de transformación de velocidad contiguos, más de cinco valores 62 de transformación de velocidad, o menos de diez valores 62 de transformación de velocidad.

Cuando se cumple la condición 314-Sí, se pone en marcha la etapa 316. En la etapa 316, se computa un valor de transformación relativo promedio (velocidad de cambio promedio) a partir del recientemente formado conjunto 60 de valores 62 de transformación de velocidad. De esta forma, para cada conjunto 60 de valores 62 de transformación de velocidad, existe un valor de transformación relativo promedio 66. En algunas realizaciones, se computa un valor de transformación relativo promedio (velocidad de cambio promedio) 66 a partir del recientemente formado conjunto 60 de valores 62 de transformación de velocidad, tomando una medida de la tendencia central de los valores 62 de transformación de velocidad del conjunto 60 recientemente formado de valores 62 de transformación de velocidad. En algunas realizaciones, esta medición de la tendencia central es una media geométrica, una media aritmética, una mediana o una moda de la totalidad o de una parte de los valores 62 de transformación de velocidad del conjunto 60 recientemente formado de valores 62 de transformación de velocidad.

En la etapa 318, se realiza una determinación acerca de si se ha llegado a un punto predeterminado del protocolo. Este punto predeterminado es un instante de tiempo final, también conocido como punto final. En algunas realizaciones, el instante de tiempo final se alcanza (318-Sí) en una o más horas, en dos o más horas, en diez o más horas, en entre tres horas y cien horas, o en menos de veinte horas después de haber tomado la medición inicial en la etapa 302. En algunas realizaciones, se llega al instante de tiempo final (318-Sí) cuando se han realizado entre 10 y 50.000, entre 100 y 10.000 o entre 150 y 5.000, más de 10, más de cincuenta o más de 100 mediciones del estadio biológico del cultivo contenido en el vaso, en instancias de la etapa 308. En el caso de que no se haya alcanzado el punto predeterminado del protocolo (318-No), entonces el control del procedimiento retorna a la etapa 306, en la que el control del procedimiento aguarda el salto de tiempo  $t$  para avanzar, antes de iniciar otra instancia de la etapa 308 en la que el estadio biológico del cultivo es de nuevo medido y utilizado para calcular un valor relativo de normalización. Si se ha llegado al punto predeterminado del protocolo (318-Sí), el control del procedimiento pasa, bien (i) a la etapa 320a, bien (ii) a la etapa 320b, o bien (iii) tanto a la etapa 320a como a la etapa 320b.

En la etapa 320a, se obtiene un primer resultado basándose en una determinación acerca de si alguno de los valores de transformación relativos promedio 66 de la pluralidad de valores de transformación relativos promedio supera el primer valor de umbral 57. En algunas realizaciones, el primer valor de umbral 57 depende del tipo de medio, lo que significa que el valor exacto para el primer valor de umbral dependerá del tipo de medio que se utilizó para el cultivo. En la práctica, por ejemplo, la tabla de consulta opcional 54 puede almacenar varios primeros valores de umbral 57 diferentes para diversos tipos de medios 59 diferentes. De esta forma, en la etapa 320a, se consulta la tabla de consulta opcional 54, basándose en el tipo de medio exacto 59 del cultivo, a fin de determinar el primer valor de umbral 57 correcto que utilizar. En algunas realizaciones, se espera que, con independencia del tipo de

medio exacto 59 utilizado, el primer valor de umbral esté comprendido en el intervalo entre 50 y 200. En algunas realizaciones, se espera que, con independencia del tipo de medio exacto 59 utilizado, el primer valor de umbral esté comprendido en el intervalo entre 75 y 125. En algunas realizaciones, se espera que, con independencia del tipo de medio exacto 59 utilizado, el primer valor de umbral esté comprendido en el intervalo entre 85 y 115. En algunas realizaciones, se espera que, con independencia del tipo de medio exacto 59 utilizado, el primer valor de umbral esté comprendido en el intervalo entre 95 y 105. Si algún valor de transformación relativo promedio 66 de la pluralidad de valores de transformación relativos promedio excede el primer valor de umbral 57 (320a-Sí), entonces el cultivo se marca como positivo en cuanto a infección microbiana (etapa 322). Si ninguno de los valores de transformación relativos promedio 66 de la pluralidad de valores de transformación relativos promedio excede el primer valor de umbral 57 (320a-No), entonces el cultivo no es marcado como positivo en cuanto a infección microbiana (etapa 324). Sin embargo, en algunas realizaciones, incluso si se cumple la condición 320a-No, otros algoritmos de detección microbiana del aparato 11 pueden marcar el cultivo como positivo en cuanto a infección microbiana. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se pone en marcha la etapa 320b, de manera que esta etapa 320b es capaz de marcar el cultivo como positivo en cuanto a infección microbiana. Es más, pueden ponerse en marcha otros algoritmos de detección microbiana adicionales por parte del aparato 11 sobre el cultivo, por ejemplo, un algoritmo que detecta un punto de inflexión en el ritmo de aceleración de una señal obtenida del cultivo, y estos otros algoritmos de detección microbiana adicionales pueden determinar de forma independiente que el cultivo se ha infectado con un microorganismo.

En la etapa 320b, se obtiene un segundo resultado basándose en una determinación acerca de si la extensión del crecimiento exhibida por el cultivo supera un segundo valor de umbral 58. En algunas realizaciones, el segundo valor de umbral 58 es dependiente del tipo de medio, lo que significa que el valor exacto del segundo valor de umbral dependerá del tipo de medio que se utilice para el cultivo. En la práctica, por ejemplo, la tabla de consulta 54 puede almacenar varios segundos valores de umbral 58 diferentes para diversos tipos de medio 59 diferentes. De esta forma, en la etapa 320a, la tabla de consulta 54 es consultada basándose en el tipo de medio exacto 59 del cultivo, a fin de determinar el segundo valor de umbral 57 correcto que se ha de utilizar. Si la extensión del crecimiento supera el segundo valor de umbral 58 (320b-Sí), entonces el cultivo es marcado como positivo en cuanto a infección microbiana (etapa 322). Si la extensión del crecimiento no supera el segundo valor de umbral 58, entonces el cultivo no es marcado como positivo en cuanto a infección microbiana (etapa 324). Sin embargo, en algunas realizaciones, incluso si se llega a cumplir la condición 320b-No, otros algoritmos de detección microbiana del aparato del aparato 11 pueden marcar el cultivo como positivo en cuanto a infección microbiana. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se pone en marcha la etapa 320a, de manera que la etapa 320a es capaz de marcar el cultivo como positivo en cuanto a infección microbiana, como se ha descrito anteriormente. Es más, pueden hacerse funcionar otros algoritmos de detección microbiana adicionales por parte del aparato 11 sobre el cultivo, por ejemplo, un algoritmo que detecta un punto de inflexión en el ritmo de aceleración de una señal obtenida de un cultivo, y estos otros algoritmos de detección microbiana adicionales pueden determinar de forma independiente que el cultivo está infectado con un microorganismo.

En algunas realizaciones, la extensión del crecimiento (EG –“extension of growth”–) 58 es el valor relativo de normalización máximo medido para el cultivo. En algunas realizaciones en las que EG es el valor relativo de normalización máximo, se espera que, con independencia del tipo de medio exacto 59 utilizado, el segundo valor de umbral esté comprendido en el intervalo entre 112 y 140. En algunas realizaciones en las que EG es el valor relativo de normalización máximo, se espera que, con independencia del tipo de medio exacto 59 utilizado, el segundo valor de umbral esté comprendido en el intervalo entre 113 y 118. En algunas realizaciones en las que EG es el valor relativo de normalización máximo, se espera que el segundo valor de umbral sea 117.

En algunas realizaciones, la extensión del crecimiento se determina por la ecuación:

$$EG = NR_{\text{tras\_crecimiento}} - NR_{\text{crecimiento\_mínimo}} \quad \text{Ec. 1}$$

donde  $NR_{\text{tras\_crecimiento}}$  es un valor relativo de normalización de la pluralidad de valores relativos de normalización que se utilizó en el cálculo de (i) el primer valor de transformación relativo promedio a continuación de un valor de transformación relativo promedio máximo, (ii) un valor de transformación relativo promedio máximo, o (iii) un primer valor de transformación relativo promedio precedente al valor de transformación relativo promedio máximo de la pluralidad de valores de transformación relativos promedio, y  $NR_{\text{crecimiento\_mínimo}}$  es un valor relativo de normalización de la pluralidad de valores relativos de normalización que se utilizó en el cálculo del primer valor de transformación relativo promedio para alcanzar un tercer valor de umbral. En algunas realizaciones en las que EG se define por la Ecuación 1, el segundo valor de umbral estará comprendido en el intervalo entre 12 y 40 con independencia del tipo de medio exacto 59 utilizado. En algunas realizaciones en las que EG se define por la Ecuación 1, el segundo valor de umbral estará comprendido en el intervalo entre 13 y 18 con independencia del tipo de medio exacto 59 utilizado. En algunas realizaciones en las que EG se define por la Ecuación 1, el segundo valor de umbral será 17 con independencia del tipo de medio exacto 59 utilizado.

En algunas realizaciones,  $NR_{\text{tras\_crecimiento}}$  de la Ec. 1 es un valor relativo de normalización de la pluralidad de valores relativos de normalización que se utilizó en el cálculo del valor de transformación relativo promedio 66 que sigue al

máximo valor de transformación relativo promedio 66 nunca alcanzado para el cultivo. De esta forma, si se utilizaron los valores relativos de normalización 145 a 154 para computar el valor de transformación relativo promedio 66 que sigue al valor de transformación relativo promedio 66 máximo, entonces  $NR_{\text{tras\_crecimiento}}$  será uno de los valores relativos de normalización del conjunto de valores relativos de normalización {145, ..., 154}.

5 En algunas realizaciones,  $NR_{\text{tras\_crecimiento}}$  de la Ec. 1 es un valor relativo de normalización de la pluralidad de valores relativos de normalización que se utilizó en el cálculo del valor de transformación relativo promedio 66 que precede al máximo valor de transformación relativo promedio 66 nunca alcanzado para el cultivo. De esta forma, si se utilizaron los valores relativos de normalización 125 a 134 para computar el valor de transformación relativo promedio 66 que precede inmediatamente al valor de transformación relativo promedio 66 máximo, entonces  $NR_{\text{tras\_crecimiento}}$  será uno de los valores relativos de normalización del conjunto de valores relativos de normalización {125, ..., 134}.

10 En algunas realizaciones,  $NR_{\text{tras\_crecimiento}}$  de la Ec. 1 es una medida de la tendencia central de la totalidad o de una parte de los valores relativos de normalización que se utilizaron en el cálculo del máximo valor de transformación relativo promedio 66 nunca alcanzado por el cultivo. De esta forma, si se utilizaron los valores relativos de normalización 135 a 144 para computar el valor de transformación relativo promedio 66 máximo, entonces  $NR_{\text{tras\_crecimiento}}$  será una medida de la tendencia central (una media geométrica, una media aritmética, una mediana o un moda) de la totalidad o de una parte de los valores relativos de normalización del conjunto de valores relativos de normalización {135, ..., 144}.

15 En algunas realizaciones,  $NR_{\text{tras\_crecimiento}}$  de la Ec. 1 es una medida de la tendencia central de la totalidad o de una parte de los valores relativos de normalización que se utilizaron en el cálculo del valor de transformación relativo promedio 66 que sigue al máximo valor de transformación relativo promedio 66 nunca alcanzado para el cultivo. De esta forma, si se utilizaron los valores relativos de normalización 145 a 154 para computar el valor de transformación relativo promedio 66 que sigue al máximo valor de transformación relativo promedio 66, entonces  $NR_{\text{tras\_crecimiento}}$  será una medida de la tendencia central (una media geométrica, una media aritmética, una mediana o una moda) de la totalidad o de una parte de los valores relativos de normalización del conjunto de valores relativos de normalización {145, ..., 154}.

20 En algunas realizaciones,  $NR_{\text{tras\_crecimiento}}$  de la Ec. 1 es una medida de la tendencia central de la totalidad o de una parte de los valores relativos de normalización que se utilizaron en el cálculo del valor de transformación relativo promedio 66 que precede al máximo valor de transformación relativo promedio 66 nunca alcanzado para el cultivo. De esta forma, si se utilizaron los valores relativos de normalización 125 a 134 para computar el valor de transformación relativo promedio 66 que precede inmediatamente al máximo valor de transformación relativo promedio 66, entonces  $NR_{\text{tras\_crecimiento}}$  será una medida de la tendencia central (una media geométrica, una media aritmética, una mediana o una moda) de la totalidad o de una parte de los valores relativos de normalización del conjunto de valores relativos de normalización {125, ..., 134}.

25 En algunas realizaciones,  $NR_{\text{crecimiento\_mínimo}}$  es un valor relativo de normalización de la pluralidad de valores relativos de normalización que se utilizó en el cálculo del primer valor de transformación relativo promedio 66 para alcanzar un valor de umbral. De esta forma, si se utilizaron los valores relativos de normalización 20 a 29 para computar el primer valor de transformación relativo promedio 66, con el fin de alcanzar un valor de umbral, entonces  $NR_{\text{crecimiento\_mínimo}}$  será uno de los valores relativos de normalización del conjunto de valores relativos de normalización {20, ..., 29}.

30 En algunas realizaciones,  $NR_{\text{crecimiento\_mínimo}}$  es una medida de la tendencia central de los valores relativos de normalización que se utilizó en el cálculo del primer valor de transformación relativo promedio 66 para alcanzar un valor de umbral. De esta forma, si se utilizaron los valores relativos de normalización 20 a 29 para computar el primer valor de transformación relativo promedio 66, con el fin de alcanzar un valor de umbral, entonces  $NR_{\text{crecimiento\_mínimo}}$  será la totalidad o una parte de los valores relativos de normalización del conjunto de valores relativos de normalización {20, ..., 29}.

35 En algunas realizaciones, en el caso de que se utilice la Ecuación 1 para calcular la extensión del crecimiento 58, el valor de umbral es, en ejemplos no limitativos, un valor comprendido entre 5 y 100, un valor comprendido entre 25 y 75, un valor comprendido entre 1 y 1.000 o un valor que es menor que 50.

40 En algunas realizaciones, la extensión del crecimiento viene determinada por la ecuación:

45 
$$EG = NR_{\text{max}} - NR_{\text{inicial}} \quad \text{Ec. 2}$$

50 donde  $NR_{\text{max}}$  es el máximo valor relativo de normalización de la pluralidad de valores relativos de normalización y  $NR_{\text{inicial}}$  es un valor del estadio biológico inicial del cultivo frente al que ha sido estandarizado cada valor relativo de normalización. En algunas realizaciones en las que EG se define por la Ecuación 2, el segundo valor de umbral estará comprendido en el intervalo entre 12 y 40, con independencia del tipo de medio exacto 59 utilizado. En

algunas realizaciones en las que EG se define por la Ecuación 2, el segundo valor de umbral estará comprendido en el intervalo entre 13 y 18, con independencia del tipo de medio exacto 59 utilizado. En algunas realizaciones en las que EG se define por la Ecuación 2, el segundo valor de umbral será 17 con independencia del tipo de medio exacto 59 utilizado.

5 Se apreciará que las Ecuaciones 1 y 2 pueden contener operaciones matemáticas adicionales, tanto lineales como no lineales, y seguir siendo utilizadas para contener la extensión del crecimiento 58.

10 En algunas realizaciones, se identifica el cultivo como contenedor de microorganismos cuando contiene (i) una bacteria de la familia de las Enterobacteriaceae o (ii) una bacteria que no es de la familia de las Enterobacteriaceae. En algunas realizaciones, el cultivo es identificado como contenedor de microorganismos cuando contiene (i) Enterobacteriaceae, (ii) Staphylococcaceae, (iii) Streptococcus o (iv) Acinetobacter. En algunas realizaciones, el cultivo es identificado como contenedor de microorganismos cuando contiene *Alishewanella*, *Alterococcus*,  
15 *Aquamonas*, *Aranicola*, *Arsenophonus*, *Azotivirga*, *Blochmannia*, *Brenneria*, *Buchnera*, *Bubvicia*, *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* o *Yokenella*.

20 En algunas realizaciones, el cultivo es identificado como contenedor de microorganismos cuando contiene bacterias de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus pettenkofferi*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus warneri* o *Staphylococcus xylosus*. En algunas realizaciones, el cultivo es identificado como contenedor de microorganismos cuando contiene *S. agalactiae*, *S. bovis*, *S. mutans*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*,  
25 *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. suis*, *Streptococcus viridans* o *Streptococcus uberis*.

30 En algunas realizaciones, el cultivo es identificado como contenedor de microorganismos cuando contiene bacterias aeróbicas. En algunas realizaciones, el cultivo es identificado como contenedor de microorganismos cuando contiene bacterias anaeróbicas.

35 En algunas realizaciones, el método comprende, de manera adicional, suministrar como salida el primer resultado (la respuesta condicionada afirmativa o negativa a la que se llega en la etapa 320a), el segundo resultado (la respuesta condicionada positiva o negativa a la que se llega en la etapa 320b), o una determinación acerca de si el cultivo del vaso contiene la pluralidad de microorganismos, facilitada a un dispositivo de interfaz de usuario (por ejemplo, el 32), un monitor (por ejemplo, el 26), un medio de almacenamiento legible por computadora (por ejemplo, el 14 o el 36), una memoria legible por computadora (por ejemplo, la 14 o la 36), o un sistema informático local o remoto. En algunas realizaciones, se presenta visualmente el primer resultado, el segundo resultado o la determinación acerca de si el cultivo del vaso contiene la pluralidad de microorganismos. Tal y como se utiliza en esta memoria, la expresión "sistema informático local" significa un sistema informático que está directamente conectado al aparato 11. Tal y como se utiliza en esta memoria, la expresión "sistema informático remoto" significa un sistema informático que está conectado al aparato 11 por una red tal como la Internet.

#### 5.4 Ejemplos de productos de programa informático y computadoras

45 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 computadora. Por otra parte, cualquiera de los métodos de la presente invención puede ser implementado en una o más computadoras. Aún adicionalmente, cualquiera de los métodos de la presente invención puede ser implementado en uno o más productos de programa informático. Algunas realizaciones de la presente invención proporcionan un producto de programa informático que codifica cualquiera de los métodos divulgados en la presente memoria o la totalidad de ellos. Tales métodos pueden ser almacenados en CD-ROM, DVD, un producto de almacenamiento de disco magnético o cualquier otro producto de almacenamiento de datos o de programas legible por computadora. Tales métodos pueden también haberse incorporado en un dispositivo de almacenamiento permanente, tal como una ROM, uno o más chips programables, uno o más circuitos integrados específicos de la aplicación (ASICs – "application specific integrated circuits"–). Semejante dispositivo de almacenamiento permanente puede estar radicado en un servidor, un punto de acceso según la norma 802.11, un puente / estación inalámbrica conforme a la 802.11, un repetidor, un dispositivo de encaminamiento, un teléfono móvil u otros dispositivos electrónicos. Tales métodos codificados en el producto de programa informático pueden ser también distribuidos electrónicamente, a través de la Internet o de otra manera.

60 Tales realizaciones de la presente invención proporcionan un producto de programa informático que contiene cualquiera de los módulos de programa y estructuras de datos mostrados en la Figura 1, o la totalidad de ellos. Estos módulos de programa pueden ser almacenados en un CD-ROM, un DVD, un producto de almacenamiento de disco magnético o cualquier otro producto de almacenamiento de datos o de programas legible por computadora. Los módulos de programa pueden también haberse incorporado en un dispositivo de almacenamiento permanente,  
65



tal como una ROM, uno o más chips programables, o uno o más circuitos integrados específicos de la aplicación (ASICs). Tal dispositivo de almacenamiento permanente puede estar radicado en un servidor, un punto de acceso según la norma 802.11, un puente / estación inalámbrica conforme a la 802.11, un repetidor, un dispositivo de encaminamiento, un teléfono móvil u otros dispositivos electrónicos. Los módulos de software del producto de programa informático pueden también distribuirse electrónicamente, a través de la Internet o de otra manera.

#### 5.5 Juegos

Algunas realizaciones de la invención pueden también comprender un juego para llevar a cabo cualquiera de los métodos que se describen en esta memoria. En un ejemplo no limitativo, pueden estar comprendidos en un juego vasos, cultivo para tomar una muestra, agentes adicionales y software para llevar a cabo cualquier combinación de los métodos divulgados en esta memoria. Los juegos comprenderán, por lo tanto, uno o más de estos reactivos en unos medios contenedores adecuados.

Los componentes de los juegos distintos del software, los vasos y el sistema radiométrico o no radiométrico pueden estar envasados, bien en medios acuosos o bien en forma liofilizada. Los medios contenedores adecuados de los juegos incluirán, generalmente, al menos un vial, un tubo de ensayo, un frasco, una botella, una jeringuilla u otros medios contenedores dentro de los cuales puede emplazarse un componente, y, preferiblemente, en la proporción adecuada. En el caso de que haya más de un componente en el juego, el juego también contendrá, generalmente, un segundo, tercer u otros recipientes adicionales dentro de los cuales pueden emplazarse separadamente los componentes adicionales. Sin embargo, pueden encontrarse en el interior de un vial diversas combinaciones de componentes. Los juegos de la presente invención también incluirán, por lo común, unos medios para contener los recipientes de reactivos en confinamiento cerrado para su venta comercial. Tales recipientes pueden incluir recipientes de plástico moldeados por inyección o por soplado, en confinamiento cerrado para su venta comercial.

#### 6. EJEMPLO

Se ha desarrollado un método que permite un grado de fiabilidad incrementado en la notificación del estado positivo de un vaso en un sistema de cultivo de sangre. El método expuesto en esta memoria ejemplifica el uso de este método en el sistema de cultivo BACTEC<sup>®</sup> Blood (sistema de cultivo de sangre BACTEC<sup>®</sup>). El sistema de cultivo BACTEC<sup>®</sup> Blood se sirve de sensores fluorescentes que informan de cambios que se producen en el sistema cuando tiene lugar un metabolismo microbiano. Se aplican entonces algoritmos a la secuencia de datos de señal que se han concebido para constatar cambios en la señal con el tiempo que son indicativos de la presencia de microorganismos en crecimiento. Se le notifica al usuario cuándo el sistema constata la evidencia del crecimiento (cambio de estado en un vial positivo), y el vaso es entonces tratado para confirmar la presencia de un organismo (ensayos de mancha de Gram y de subcultivo realizados en un medio dispuesto en una placa), antes iniciar procedimientos para comenzar la identificación del organismo y determinaciones de la susceptibilidad antimicrobiana. El sistema de la técnica anterior informa de un estado de presunto positivo, en tanto en cuanto el sistema no tiene manera de cuantificar la fiabilidad de la determinación positiva. La presente invención descrita en esta memoria se ha servido de la diferencia de velocidades del cambio metabólico y de la extensión del cambio para proporcionar información acerca de la fiabilidad en un cambio de estado positivo, siguiendo un criterio por cada vaso individual. La transformación de datos de la invención puede ser aplicada a datos de crecimiento metabólico o celular de una manera que proporciona fiabilidad en el estado positivo de un vaso y que elimina esencialmente la posibilidad de falsas determinaciones negativas como las que existen en la actualidad en los sistemas de cultivo de sangre.

Datos que se recogieron con el sistema de cultivo BACTEC<sup>®</sup> Blood se utilizan como ejemplo de la aplicación de la transformación de datos de la invención que se ilustra en la Figura 3 y en los ejemplos proporcionados de la utilidad de la presente invención. El sistema BACTEC<sup>®</sup>, tal como se ha descrito anteriormente, se sirve de sensores fluorescentes para supervisar los cambios en la actividad metabólica en el seno del cultivo a través de una corriente de datos de señal de fluorescencia compensados que son recogidos a intervalos de diez minutos desde un sensor situado dentro del reactivo de cultivo. Los datos utilizados en este ejemplo se recogieron de los instrumentos BACTEC<sup>®</sup>, bien utilizados en estudios de cultivos inseminados internamente, o bien recogidos durante una evaluación clínica del sistema. Los datos fueron clasificados y recogidos en una base de datos en Becton Dickinson, que incluye la identificación del vaso (por números de secuencia y accesión), un registro de los datos de inoculación, la cantidad de sangre de la muestra (se trata de un sistema de cultivo en sangre), y el resultado con la identificación del microorganismo encontrado en el vaso (la identificación del organismo fue proporcionada por las dependencias clínicas, en el caso de datos externos). Se aplicó subsiguientemente el algoritmo ilustrado en la Figura 3 para el análisis. La utilidad de esta información es para determinar si un cultivo situado en un vaso contiene una pluralidad de microorganismos.

Las transformaciones de datos de la invención comenzaron con una normalización inicial de la señal del vaso hacia una salida específica (su estado inicial al entrar en el sistema), tal y como se ha descrito anteriormente en combinación con las etapas 302 y 304 de la Figura 3. Todos los datos subsiguientes se representaron como un porcentaje de esa señal inicial, que fue estandarizado al 100 por ciento en estos análisis, como se ha subrayado en las etapas 306 y 308 de la Figura 3. Las mediciones de datos normalizadas por la señal inicial se denominaron valores relativos de normalización. En condiciones teóricas ideales, un valor relativo de normalización de 125

significa que el metabolismo microbiano provocó que la fluorescencia medida por el sensor BACTEC® aumentase el 25 por ciento con respecto a la medición inicial. El siguiente valor que se computó fue la primera derivada del valor de NR, ya que este cambia con el tiempo, según se ha destacado en las etapas 310 y 312 de la Figura 3. Este valor era el valor de velocidad de transformación (RT –“rate of transformation”–), y el valor de RT de base empleado en este ejemplo utiliza un límite de periodicidad de 70 minutos. Cualquier valor de RT dado representaba la velocidad del cambio porcentual de la señal de fluorescencia a lo largo de los setenta minutos antes de su cálculo. El siguiente valor que se computó fue el ART o valor de cambio de velocidad promedio, según se ha destacado en las etapas 314 y 316 de la Figura 3. Este fue calculado como la media de los 7 valores de valor de cambio de velocidad promedio (ART) que se habían calculado, y se le hizo actuar como función de suavización del valor de RT.

En las Figuras 4, 5 y 6 se presentan ejemplos de los parámetros que se computaron para determinar si un cultivo se había infectado con microorganismos. Se analizó un cultivo de *Escherichia coli* utilizando estas métricas cuantitativas (los valores relativos normalizados 50, los valores 62 de transformación de velocidad y los valores de transformación relativos promedio 66). El cultivo contenía tres mililitros de sangre humana obtenida de un sujeto al que se inoculó una suspensión de *E. coli* (55 CFU), y se introdujo en un instrumento BACTEC® 9000. El identificador 4942 únicamente identifica el cultivo del que se ha informado en las Figuras 4, 5 y 6, y puede ser utilizado para vincular los datos a una base de datos de investigación y desarrollo BACTEC®. La Figura 4 muestra una representación gráfica de valores relativos de normalización a lo largo del tiempo. El vaso se introdujo en el instrumento y los efectos de la temperatura relacionados con el equilibrio en el vaso fueron observados durante aproximadamente la primera hora. La señal se estabilizó y se observó que un fondo se incrementaba del 94 por ciento al 95 por ciento de la señal inicial durante la primera hora (esta velocidad era debida a la actividad de la sangre). En la representación gráfica relativa de normalización (Figura 4), el crecimiento se hizo visible a partir de las ocho horas y prosiguió hasta 15 horas, con un valor de NR de valor final cercano a 126. En la Figura 5 se ha proporcionado la representación gráfica de valores de transformación relativos promedio 66 a lo largo del tiempo, basada en la velocidad de cambio promedio de los valores 62 de transformación de velocidad de la Figura 4 a lo largo del tiempo. Cada valor de transformación relativo promedio (ART) 66 es una medida de la velocidad de cambio promedio, y el máximo ART para este cultivo fue 1.158, alcanzado en 12,8 horas en el seno del cultivo. Ello representa esta máxima velocidad alcanzada en el cambio del sensor, promediada en el cultivo a lo largo de un periodo de una hora. Es esta una interpretación gráfica que muestra los siguientes instantes críticos: el instante de aceleración inicial 602 (movimiento desde un valor cero), el instante de máxima aceleración 604 (el máximo), en el que la aceleración alcanza su máximo (cortando el punto de valor cero), el instante de máxima deceleración (el mínimo) 606, y el final de la curva de crecimiento 608 (en el que la velocidad de cambio retorna al valor cero).

El sistema BACTEC® aplica una serie de algoritmos a los datos de señal que pueden activar el sistema para que identifique un vaso con un estado positivo basándose en la aparición de un “codo” o en la presencia de un cambio en la velocidad o en la aceleración en la secuencia de los datos. No se intenta calificar esta determinación para añadir fiabilidad a este cambio de estado. Es posible añadir confianza al algoritmo de detección de la técnica anterior contando el número de veces que se arrancan un conjunto de algoritmos para un vaso en el protocolo. Cuantas más veces se haya arrancado un algoritmo para indicar un estado positivo, mayor fiabilidad se tendrá entonces en el cambio de estado a positivo. Si bien esto aumentará, ciertamente, la fiabilidad en el resultado para muchos cultivos, se basa en un método indicador que está limitado a su capacidad para proporcionar, de una manera adecuada y robusta, la fiabilidad deseada en cualquier determinación, en un sistema de diagnóstico. Como ejemplo de ello, en la evaluación clínica externa del medio Aerobic plus modificado, se observó un cultivo con un falso negativo cuando se utilizaban algoritmos de detección de microorganismos convencionales, en lugar de los algoritmos divulgados en la presente invención. Se encontró que el cultivo contenía *Enterococcus faecalis* cuando se sometió a subcultivo al final del protocolo. Se inspeccionaron los datos y se determinó que dos sucesos de apertura de puerta (a 7,0 y 7,9 horas del protocolo), en los que se abrió literalmente la puerta al sistema BACTEC® (con sucesos de transitorio de temperatura concomitantes que afectaron a la temperatura), compensaron los datos de señal y provocaron que los algoritmos de detección de la técnica anterior fallaran. La aplicación de la transformación de ART a los datos habría permitido una detección robusta (posiblemente, retardada tanto como 2 horas). Además, aplicando un umbral basado en los datos de ART (de forma conservadora, y considerando un valor de ART de 100 o mayor como positivo), este vaso habría sido detectado por el sistema en cada lectura subsiguiente durante hasta catorce horas en el protocolo (positivo del instrumento en cada ciclo de ensayo durante tanto como 5 horas). El uso tanto de la transformación de ART como de la de NR (con umbral positivo) podría haberse prolongado por el periodo de detección positiva, posiblemente hasta el final del protocolo. Lo importante es que el uso de estas transformaciones proporciona un grado muy alto de fiabilidad de que el vaso es positivo, incluso en vasos que se han detectado como falso negativo en el sistema en curso. Las Figuras 7, 8 y 9 muestran datos para un cultivo que se encontró que contenía *Enterococcus faecalis* cuando fue sometido a subcultivo al final del protocolo. Los datos de estas Figuras establecen que los métodos de la invención divulgados en esta memoria también detectan esta infección por microorganismos. La Figura 7 es una representación gráfica de una señal fluorescente compensada frente al tiempo, para un falso negativo clínico de *Enterococcus faecalis*. La Figura 8 es una representación gráfica de una señal fluorescente compensada frente al tiempo para un falso negativo clínico de *Enterococcus faecalis*. La Figura 8 es una representación gráfica de valores relativos normalizados frente al tiempo, para un falso negativo clínico de *Enterococcus faecalis*. La Figura 9 es una representación gráfica de una transformación de velocidad promedio frente al tiempo, para un falso negativo clínico de *Enterococcus faecalis*. Utilizando los métodos de la presente

invención, se habría encontrado que el cultivo contiene microorganismos.

**REIVINDICACIONES**

1.- Un método para determinar si un cultivo situado dentro de un vaso contiene una pluralidad de microorganismos, de tal manera que el método comprende:

- 5 (A) calcular un valor relativo de normalización para cada medición respectiva de una pluralidad de mediciones de un estadio biológico del cultivo contenido en el vaso, tomadas en diferentes instantes temporales comprendidos entre un primer instante de tiempo y un segundo instante de tiempo, entre (i) la respectiva medición y (ii) un estadio biológico inicial del cultivo, tomado en un instante de tiempo inicial, con lo que se forma una pluralidad de valores relativos de normalización;
- 10 (B) determinar, para cada intervalo de tiempo fijo predeterminado respectivo, instantes temporales entre el primer instante de tiempo y el segundo instante de tiempo, una primera derivada de los valores relativos de normalización para mediciones del estadio biológico dentro del respectivo intervalo fijo predeterminado de instantes temporales, con lo que se forma una pluralidad de valores de transformación de velocidad, de tal manera que la pluralidad de valores de transformación de velocidad comprende una pluralidad de conjuntos de valores de transformación de velocidad, de tal modo que cada respectivo conjunto de valores de transformación de velocidad de la pluralidad de conjuntos de valores de transformación de velocidad es para un conjunto diferente de instantes temporales contiguos comprendidos entre el primer instante de tiempo y el segundo instante de tiempo;
- 15 (C) suministrar como salida, para cada conjunto respectivo de valores de transformación de velocidad de la pluralidad de conjuntos de valores de transformación de velocidad, un valor de transformación relativo promedio como medida de la tendencia central de cada uno de los valores de transformación de velocidad del respectivo conjunto de valores de transformación de velocidad, con lo que se computa una pluralidad de valores de transformación relativos promedio;
- 20 (D) obtener (i) un primer resultado basándose en una determinación acerca de si algún valor de transformación relativo promedio de la pluralidad de valores de transformación relativos promedio excede un primer valor de umbral, o (ii) un segundo resultado basándose en una determinación acerca de si una extensión del crecimiento exhibido por el cultivo excede un segundo valor de umbral; y
- 25 (E) utilizar el primer resultado o el segundo resultado para determinar si el cultivo del interior del vaso contiene la pluralidad de microorganismos.

2.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, de tal manera que el método comprende, adicionalmente:

- 35 (F) suministrar como salida el primer resultado, el segundo resultado, o una determinación acerca de si el cultivo del interior del vaso contiene la pluralidad de microorganismos, a un dispositivo de interfaz de usuario, a un monitor, a un medio de almacenamiento legible por computadora, a una memoria legible por computadora, o a un sistema informático local o remoto; o presentar visualmente el primer resultado, el segundo resultado, o la determinación acerca de si el cultivo del vaso contiene la pluralidad de microorganismos.

3.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el primer instante de tiempo es cinco o más minutos después del instante de tiempo inicial, y el instante de tiempo final es treinta o más horas después del instante de tiempo inicial, o en el cual el primer instante de tiempo es entre 0,5 horas y 3 horas después del instante de tiempo inicial, y el instante de tiempo final es entre 4,5 horas y veinte horas después del instante de tiempo inicial.

4.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la medida de la tendencia central de los valores de transformación de velocidad del primer conjunto de valores de transformación de velocidad de la pluralidad de conjuntos de valores de transformación de velocidad, comprende:

- 50 una media geométrica de cada uno de los valores de transformación de velocidad del primer conjunto de valores de transformación de velocidad,  
una media aritmética de cada uno de los valores de transformación de velocidad del primer conjunto de valores de transformación de velocidad,  
55 una mediana de cada uno de los valores de transformación de velocidad del primer conjunto de valores de transformación de velocidad,  
una moda de cada uno de los valores de transformación de velocidad del primer conjunto de valores de transformación de velocidad.

5.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual las mediciones de la pluralidad de mediciones del estadio biológico del cultivo se toman, cada una de ellas, del cultivo a un intervalo de tiempo periódico entre el primer instante de tiempo y el segundo instante de tiempo, de tal manera que el intervalo de tiempo periódico es un lapso de tiempo comprendido entre un minuto y veinte minutos, o entre cinco minutos y quince minutos.

6.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el estadio biológico inicial del cultivo se determina por una salida de fluorescencia de un sensor que está en contacto con el cultivo, de tal modo que la magnitud de la

salida de fluorescencia del sensor se ve, preferiblemente, afectada por la concentración de CO<sub>2</sub>, la concentración de O<sub>2</sub> o el pH.

5 7.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual se encuentran en la pluralidad de mediciones del estadio biológico del cultivo entre 10 y 50.000 mediciones, preferiblemente entre 100 y 5.000 mediciones y, más preferiblemente, entre 150 y 5.000 mediciones del estadio biológico del cultivo del interior del vaso.

10 8.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que cada respectivo intervalo fijo predeterminado de instantes temporales de la etapa (B) consiste en cada uno de los valores de transformación de velocidad para instantes temporales comprendidos en una ventana temporal entre el primer instante de tiempo y el segundo instante de tiempo, y en el en cual la ventana temporal es un periodo de tiempo que está comprendido entre veinte minutos y diez horas, y/o en el cual cada intervalo fijo predeterminado respectivo de instantes temporales de la etapa (B) consiste en valores de transformación de velocidad para todos los instantes temporales comprendidos dentro de una ventana temporal entre el primer instante de tiempo y el segundo instante de tiempo en la que se midió un estadio biológico del cultivo del interior del vaso, y en el cual la duración de la ventana temporal es un periodo de tiempo que está comprendido entre veinte minutos y dos horas, y/o en el cual cada respectivo intervalo fijo predeterminado de instantes temporales de la etapa (B) consiste en valores de transformación de velocidad para todos los instantes temporales contenidos en una ventana temporal entre el primer instante de tiempo y el segundo instante de tiempo en la que se midió un estadio biológico del cultivo del interior del vaso, y en el cual la duración de la ventana temporal es un periodo de tiempo que está comprendido entre treinta minutos y noventa minutos.

25 9.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual cada conjunto de valores de transformación de velocidad de la pluralidad de valores de transformación de velocidad consiste en entre cuatro y veinte, preferiblemente entre cinco y quince, valores de transformación de velocidad contiguos.

10.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual existen entre cinco y quinientos, preferiblemente entre veinte y cien, valores de transformación relativos promedio en la pluralidad de valores de transformación relativos promedio.

30 11.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el volumen del cultivo está comprendido entre 1 ml y 40 ml, preferiblemente entre 2 ml y 10 ml.

35 12.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el vaso contiene una composición detectora en comunicación de fluido con el cultivo, de tal manera que la composición detectora comprende un compuesto luminiscente que exhibe un cambio en sus propiedades luminiscentes cuando es irradiado con luz que contiene longitudes de onda que provocan que dicho compuesto luminiscente emita luminiscencia al ser expuesto al oxígeno, de tal modo que la presencia de la composición detectora no es destructiva para el cultivo, y de manera que el estadio biológico inicial del cultivo es medido irradiando dicha composición detectora con luz que contiene longitudes de onda que provocan que dicho compuesto luminiscente emita luminiscencia; y observando la intensidad luminosa de la luminiscencia procedente de dicho compuesto luminiscente mientras se irradia dicha composición detectora con dicha luz.

45 13.- El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el cual dicho compuesto luminiscente está contenido en el seno de una matriz que es relativamente impermeable al agua y a los solutos no gaseosos, pero que presenta una alta permeabilidad al oxígeno, de modo que dicha matriz comprende, preferiblemente, caucho o plástico.

14.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la extensión del crecimiento (EG) es el valor relativo de normalización máximo de la pluralidad de valores relativos de normalización.

50 15.- El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual la extensión del crecimiento se determina por la ecuación:

$$EG = NR_{\text{tras\_crecimiento}} - NR_{\text{crecimiento\_mínimo}}$$

55 donde NR<sub>tras\_crecimiento</sub> es un valor relativo de normalización de la pluralidad de valores relativos de normalización que se utilizó en el cálculo de (i) el primer valor de transformación relativo promedio que sigue a un valor de transformación relativo promedio máximo, (ii) un valor de transformación relativo promedio máximo, o (iii) un primer valor de transformación relativo promedio que precede al valor de transformación relativo promedio máximo de la pluralidad de valores de transformación relativos promedio; y NR<sub>crecimiento\_mínimo</sub> es un valor relativo de normalización de la pluralidad de valores relativos de normalización que se utilizó en el cálculo del primer valor de transformación relativo promedio con el fin de conseguir un tercer valor de umbral.

60 16.- El método de acuerdo con la reivindicación 15, en el cual el tercer valor de umbral es un valor entre 5 y 100, preferiblemente entre 25 y 75.

65

- 5 17.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se considera que el cultivo del interior del vaso contiene la pluralidad de microorganismos cuando un valor de transformación relativo promedio de la pluralidad de valores de transformación relativos promedio excede dicho primer valor de umbral, y/o en el cual se considera que el cultivo del interior del vaso contiene la pluralidad de microorganismos cuando la extensión del crecimiento exhibido por el cultivo excede dicho segundo valor de umbral.
- 10 18.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de uso (E) determina que el cultivo contiene la pluralidad de microorganismos, y en el cual la pluralidad de microorganismos son bacterias de la familia Enterobacteriaceae.
- 15 19.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de uso (E) determina que el cultivo contiene la pluralidad de microorganismos, y en el cual la pluralidad de microorganismos es (i) Enterobacteriaceae, (ii) Staphylococcaceae, (iii) Streptococcus o (iv) Acinetobacter.
- 20 20.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de uso (E) determina que el cultivo contiene la pluralidad de microorganismos, y en el cual la pluralidad de microorganismos es *Alishewanella*, *Alterococcus*, *Aquamonas*, *Aranicola*, *Arsenophonus*, *Azotivirga*, *Blochmannia*, *Brenneria*, *Buchnera*, *Bubvicia*, *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* o *Yokenella*.
- 25 21.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de uso (E) determina que el cultivo contiene la pluralidad de microorganismos, y en el cual la pluralidad de microorganismos es una única especie de Staphylococcaceae seleccionada de entre el grupo consistente en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus pettenkofferi*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus warneri* y *Staphylococcus xylosum*.
- 30 22.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de uso (E) determina que el cultivo contiene la pluralidad de microorganismos, y en el cual la pluralidad de microorganismos es *Staphylococcus aureus* o *staphylococci* negativos en coagulasa.
- 35 23.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de uso (E) determina que el cultivo contiene la pluralidad de microorganismos, y en el cual la pluralidad de microorganismos es una única especie de Streptococcus seleccionada de entre el grupo consistente en *S. agalactiae*, *S. bovis*, *S. mutans*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. suis*, *Streptococcus viridans* y *Streptococcus uberis*.
- 40 24.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de uso (E) determina que el cultivo contiene la pluralidad de microorganismos, y en el cual la pluralidad de microorganismos es aeróbica o anaeróbica.
- 45 25.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el estadio biológico inicial del cultivo se mide por unos medios colorimétricos, unos medios fluorométricos, unos medios nefelométricos o unos medios infrarrojos, y/o en el cual cada estadio biológico de la pluralidad de mediciones del estadio biológico se determina por unos medios colorimétricos, unos medios fluorométricos, unos medios nefelométricos, o unos medios infrarrojos.
- 50 26.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el cultivo es un cultivo de sangre obtenido de un sujeto.
- 55 27.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de obtención (D) obtiene el primer resultado y la etapa de uso (E) utiliza el primer resultado para determinar si el cultivo contiene la pluralidad de organismos, y/o en el cual la etapa de obtención (D) obtiene el segundo resultado y la etapa de uso (E) utiliza el segundo resultado para determinar si el cultivo contiene la pluralidad de organismos, y/o en el cual la etapa de obtención (D) obtiene el primer resultado y el segundo resultado, y la etapa de uso (E) utiliza el primer resultado y el segundo resultado para determinar si el cultivo contiene la pluralidad de organismos.
- 60 28.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el primer valor de umbral es un valor comprendido entre 50 y 200, preferiblemente entre 75 y 125, más preferiblemente entre 112 y 140 y, de la forma más preferida, entre 113 y 118.
- 65 29.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la extensión del crecimiento se determina por la ecuación:

$$EG = NR_{\max} - NR_{\text{inicial}}$$

en la cual  $NR_{\max}$  es el máximo valor relativo de normalización de la pluralidad de valores relativos de normalización;

y  $NR_{inicial}$  es una medición del estadio biológico inicial.

30.- El método de acuerdo con la reivindicación 29, en el cual el segundo valor de umbral es un valor comprendido entre 12 y 40, y, preferiblemente, entre 13 y 18.

31.- Un aparato para determinar si un cultivo situado dentro de un vaso contiene una pluralidad de microorganismos, de tal manera que el aparato comprende un procesador, un sensor para mediciones de un estadio biológico del cultivo, y una memoria conectada al procesador, de tal manera que la memoria comprende: un primer valor de umbral; un segundo valor de umbral; y un módulo de determinación de cultivo, que comprende:

(A) instrucciones electrónicamente codificadas para calcular un valor relativo de normalización para cada medición respectiva de una pluralidad de mediciones de un estadio biológico del cultivo contenido en el vaso, tomadas en diferentes instantes temporales entre un primer instante de tiempo y un segundo instante de tiempo, entre (i) la medición respectiva y (ii) un estadio biológico inicial del cultivo tomado en un instante de tiempo inicial, con lo que se forma una pluralidad de valores relativos de normalización;

(B) instrucciones codificadas electrónicamente para determinar, para cada respectivo intervalo fijo predeterminado de instantes temporales entre el primer instante de tiempo y el segundo instante de tiempo, una primera derivada de los valores relativos de normalización para mediciones del estadio biológico dentro del respectivo intervalo fijo predeterminado de instantes temporales, con lo que se forma una pluralidad de valores de transformación de velocidad, de tal manera que la pluralidad de valores de transformación de velocidad comprende una pluralidad de conjuntos de valores de transformación de velocidad, de modo que cada conjunto respectivo de valores de transformación de velocidad de la pluralidad de conjuntos de valores de transformación de velocidad es para un conjunto diferente de instantes temporales contiguos comprendidos entre el primer instante de tiempo y el segundo instante de tiempo;

(C) instrucciones codificadas electrónicamente para computar, para cada conjunto respectivo de valores de transformación de velocidad de la pluralidad de conjuntos de valores de transformación de velocidad, un valor de transformación relativo promedio como una medida de la tendencia central de cada uno de los valores de transformación de velocidad del respectivo conjunto de valores de transformación de velocidad, con lo que se computa una pluralidad de valores de transformación relativos promedio;

(D) instrucciones codificadas electrónicamente para obtener (i) un primer resultado basándose en una determinación acerca de si algún valor de transformación relativo promedio de la pluralidad de valores de transformación relativos promedio excede un primer valor de umbral, o (ii) un segundo resultado basándose en una determinación acerca de si una extensión del crecimiento exhibido por el cultivo excede un segundo valor de umbral; y

(E) instrucciones codificadas electrónicamente para utilizar el primer resultado o el segundo resultado con el fin de determinar si el cultivo del interior del vaso contiene la pluralidad de microorganismos.

32.- Un medio legible por computadora que almacena un producto de programa informático para determinar si un cultivo dispuesto dentro de un vaso contiene una pluralidad de microorganismos, ejecutable por una computadora, de tal manera que el producto de programa informático comprende: un primer valor de umbral; un segundo valor de umbral; y un módulo de determinación de cultivo, que comprende:

(A) instrucciones electrónicamente codificadas para calcular un valor relativo de normalización para cada medición respectiva de una pluralidad de mediciones de un estadio biológico del cultivo contenido en el vaso, tomadas en diferentes instantes temporales entre un primer instante de tiempo y un segundo instante de tiempo, entre (i) la medición respectiva y (ii) un estadio biológico inicial del cultivo tomado en un instante de tiempo inicial, con lo que se forma una pluralidad de valores relativos de normalización;

(B) instrucciones codificadas electrónicamente para determinar, para cada respectivo intervalo fijo predeterminado de instantes temporales entre el primer instante de tiempo y el segundo instante de tiempo, una primera derivada de los valores relativos de normalización para mediciones del estadio biológico dentro del respectivo intervalo fijo predeterminado de instantes temporales, con lo que se forma una pluralidad de valores de transformación de velocidad, de tal manera que la pluralidad de valores de transformación de velocidad comprende una pluralidad de conjuntos de valores de transformación de velocidad, de modo que cada conjunto respectivo de valores de transformación de velocidad de la pluralidad de conjuntos de valores de transformación de velocidad es para un conjunto diferente de instantes temporales contiguos comprendidos entre el primer instante de tiempo y el segundo instante de tiempo;

(C) instrucciones codificadas electrónicamente para computar, para cada conjunto respectivo de valores de transformación de velocidad de la pluralidad de conjuntos de valores de transformación de velocidad, un valor de transformación relativo promedio como una medida de la tendencia central de cada uno de los valores de transformación de velocidad del respectivo conjunto de valores de transformación de velocidad, con lo que se computa una pluralidad de valores de transformación relativos promedio;

(D) instrucciones codificadas electrónicamente para obtener (i) un primer resultado basándose en una determinación acerca de si algún valor de transformación relativo promedio de la pluralidad de valores de transformación relativos promedio excede un primer valor de umbral, o (ii) un segundo resultado basándose en una determinación acerca de si una extensión del crecimiento exhibido por el cultivo excede un segundo

valor de umbral; y

(E) instrucciones codificadas electrónicamente para utilizar el primer resultado o el segundo resultado con el fin de determinar si el cultivo del interior del vaso contiene la pluralidad de microorganismos.

5 33.- Un método para determinar si un cultivo situado dentro de un vaso contiene una pluralidad de microorganismos, de tal modo que el método comprende:

10 (A) obtener una pluralidad de mediciones del estadio biológico del cultivo, de tal manera que cada medición de la pluralidad de mediciones se toma en un instante temporal diferente entre un primer instante de tiempo y un segundo instante de tiempo;

15 (B) determinar, para cada respectivo intervalo fijo predeterminado de instantes temporales entre el primer instante de tiempo y el segundo instante de tiempo, una primera derivada de las mediciones del estadio biológico en el respectivo intervalo fijo predeterminado de instantes temporales, con lo que se forma una pluralidad de valores de transformación de velocidad, de tal manera que la pluralidad de valores de transformación de velocidad comprende una pluralidad de conjuntos de valores de transformación de velocidad, de tal modo que cada conjunto respectivo de valores de transformación de velocidad de la pluralidad de conjuntos de valores de transformación de velocidad es para un conjunto diferente de instantes temporales contiguos comprendidos entre el primer instante de tiempo y el segundo instante de tiempo;

20 (C) computar, para cada conjunto respectivo de valores de transformación de velocidad de la pluralidad de conjuntos de valores de transformación de velocidad, un valor de transformación relativo promedio como una medida de la tendencia central de cada uno de los valores de transformación de velocidad del respectivo conjunto de valores de transformación de velocidad, con lo que se computa una pluralidad de valores de transformación relativos promedio;

25 (D) obtener (i) un primer resultado basándose en una determinación acerca de si algún valor de transformación relativo promedio de la pluralidad de valores de transformación relativos promedio excede un primer valor de umbral, o (ii) un segundo resultado basándose en una determinación acerca de si una extensión del crecimiento exhibido por el cultivo excede un segundo valor de umbral; y

30 (E) utilizar el primer resultado o el segundo resultado para determinar si el cultivo del interior del vaso contiene la pluralidad de microorganismos.



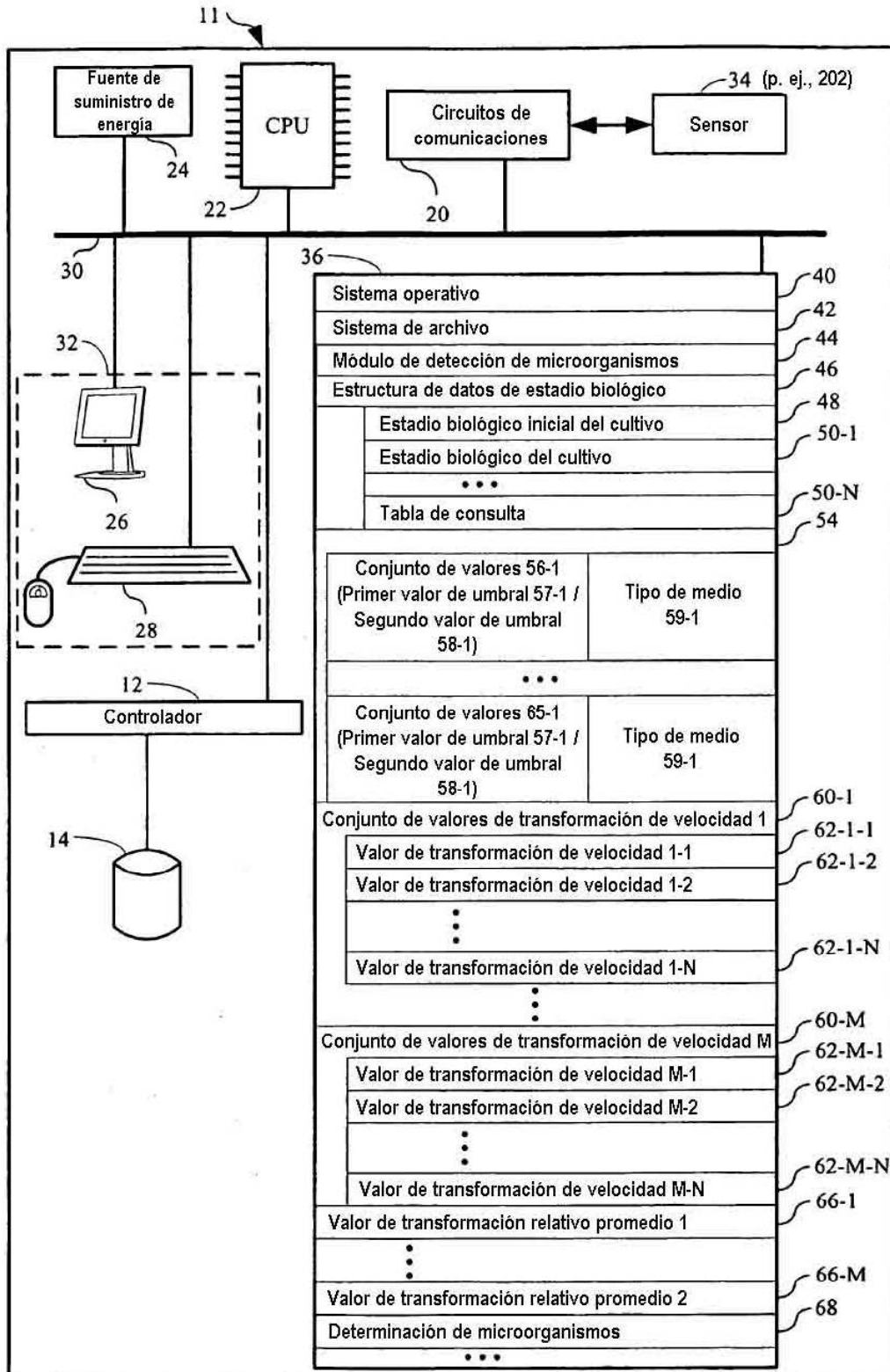


Fig. 1

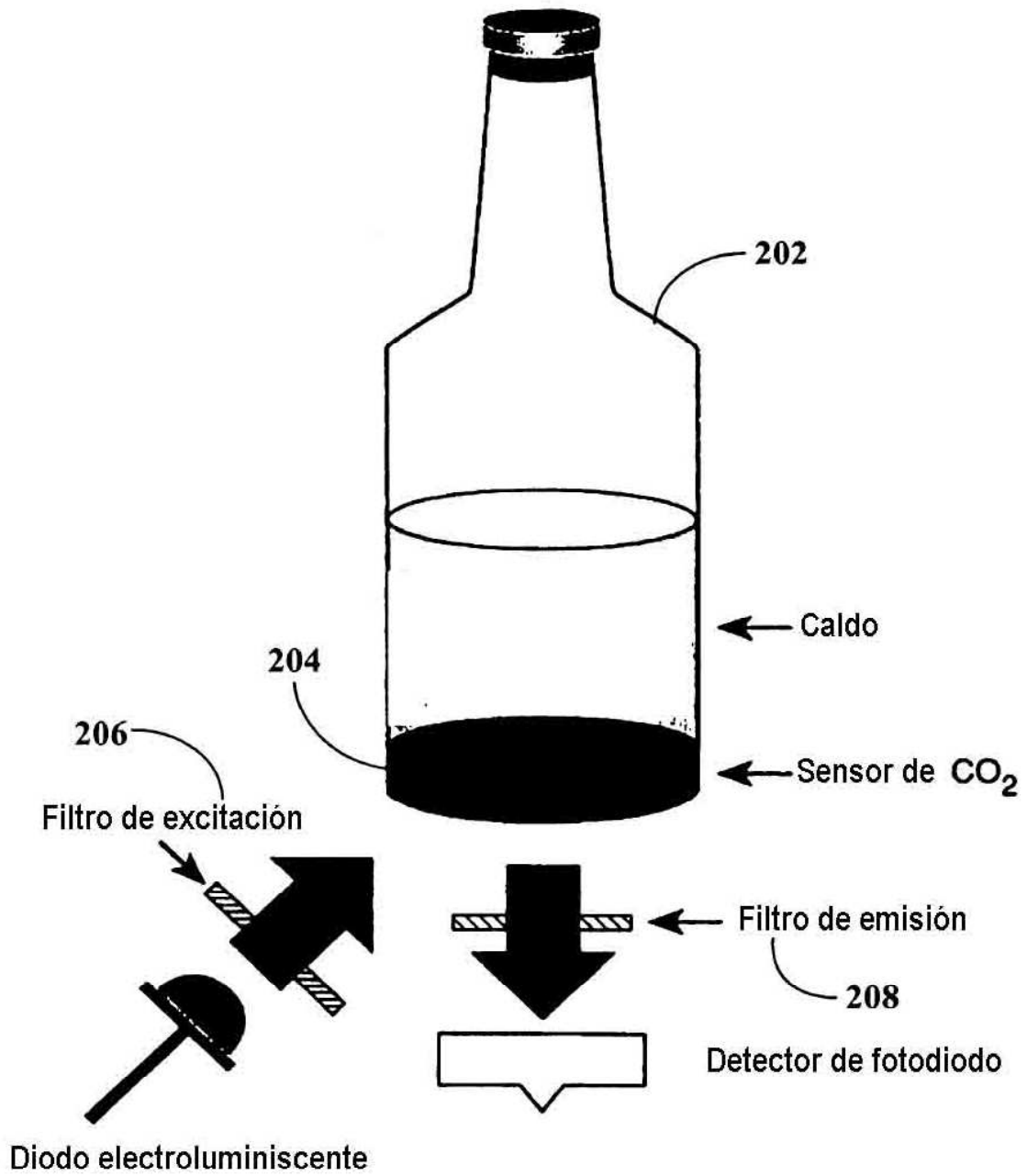


Fig. 2

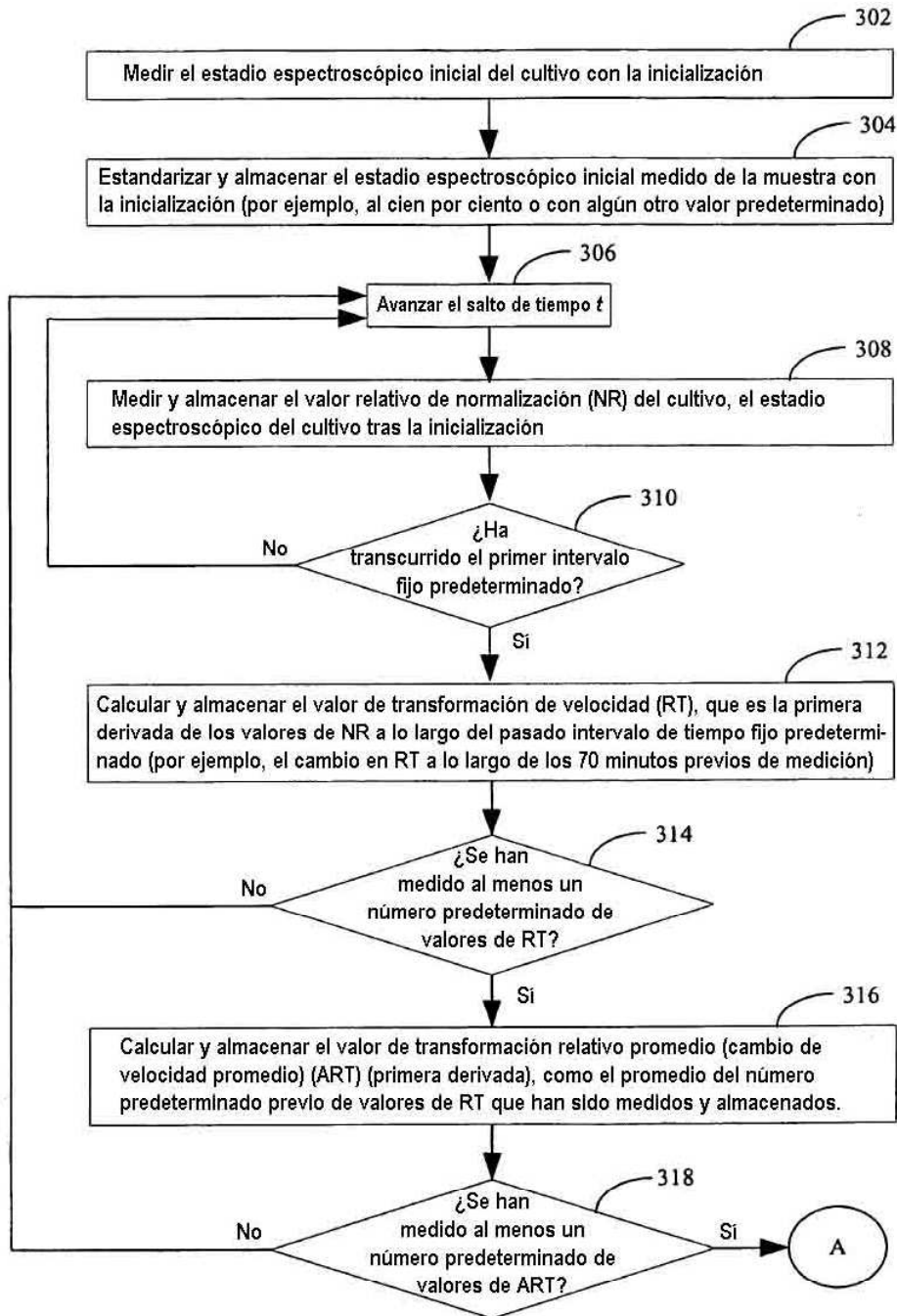


Fig. 3A

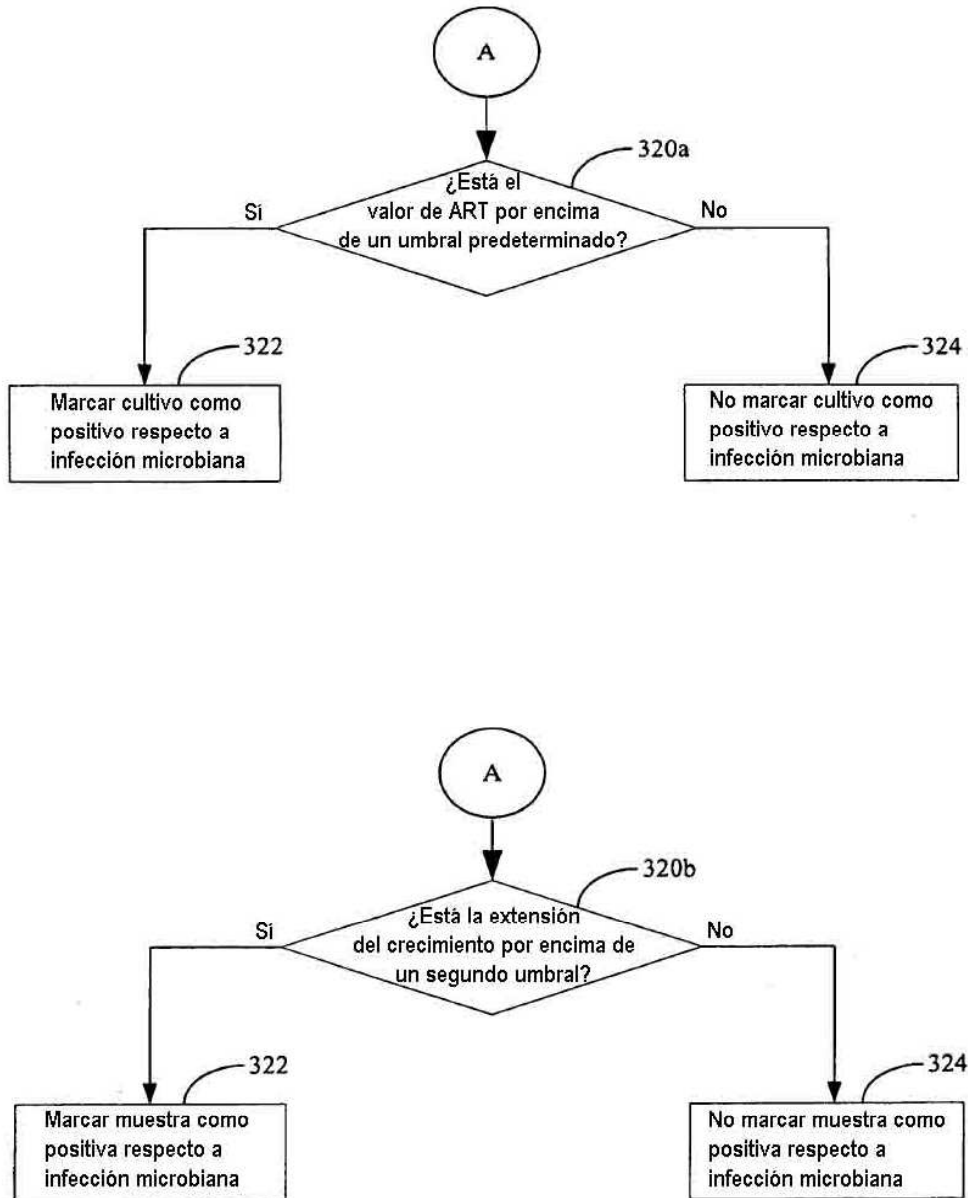


Fig. 3B

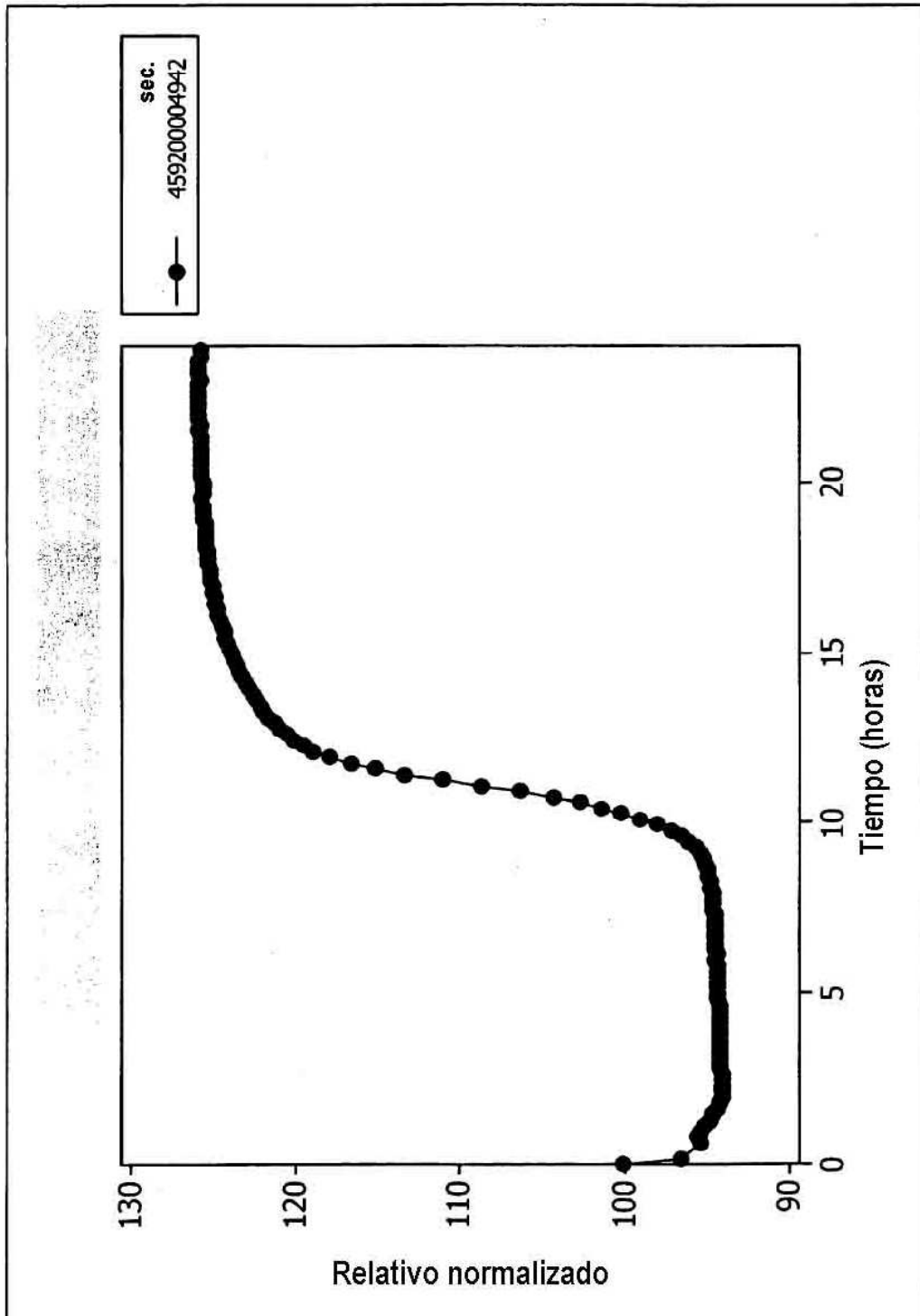


Fig. 4

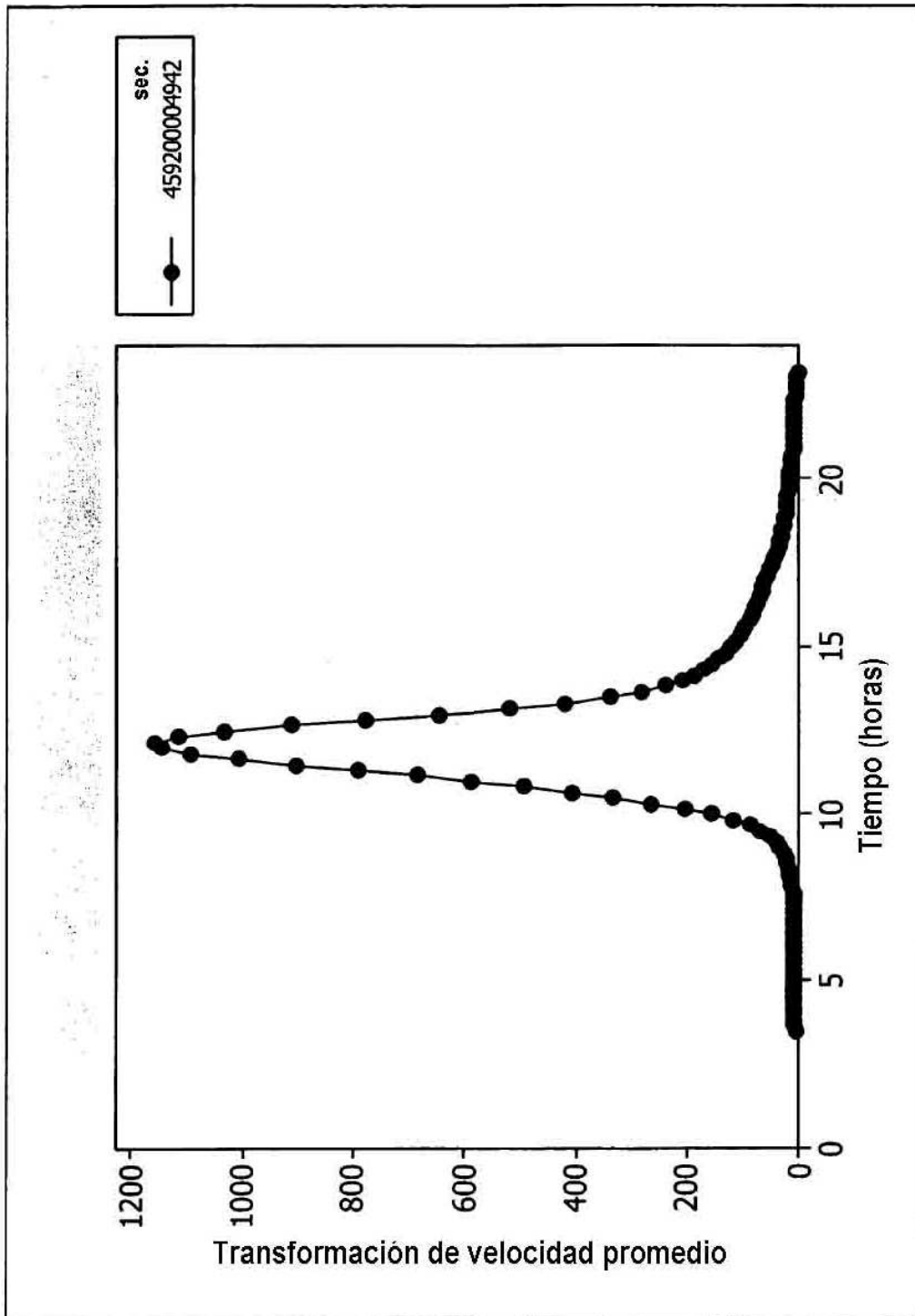


Fig. 5

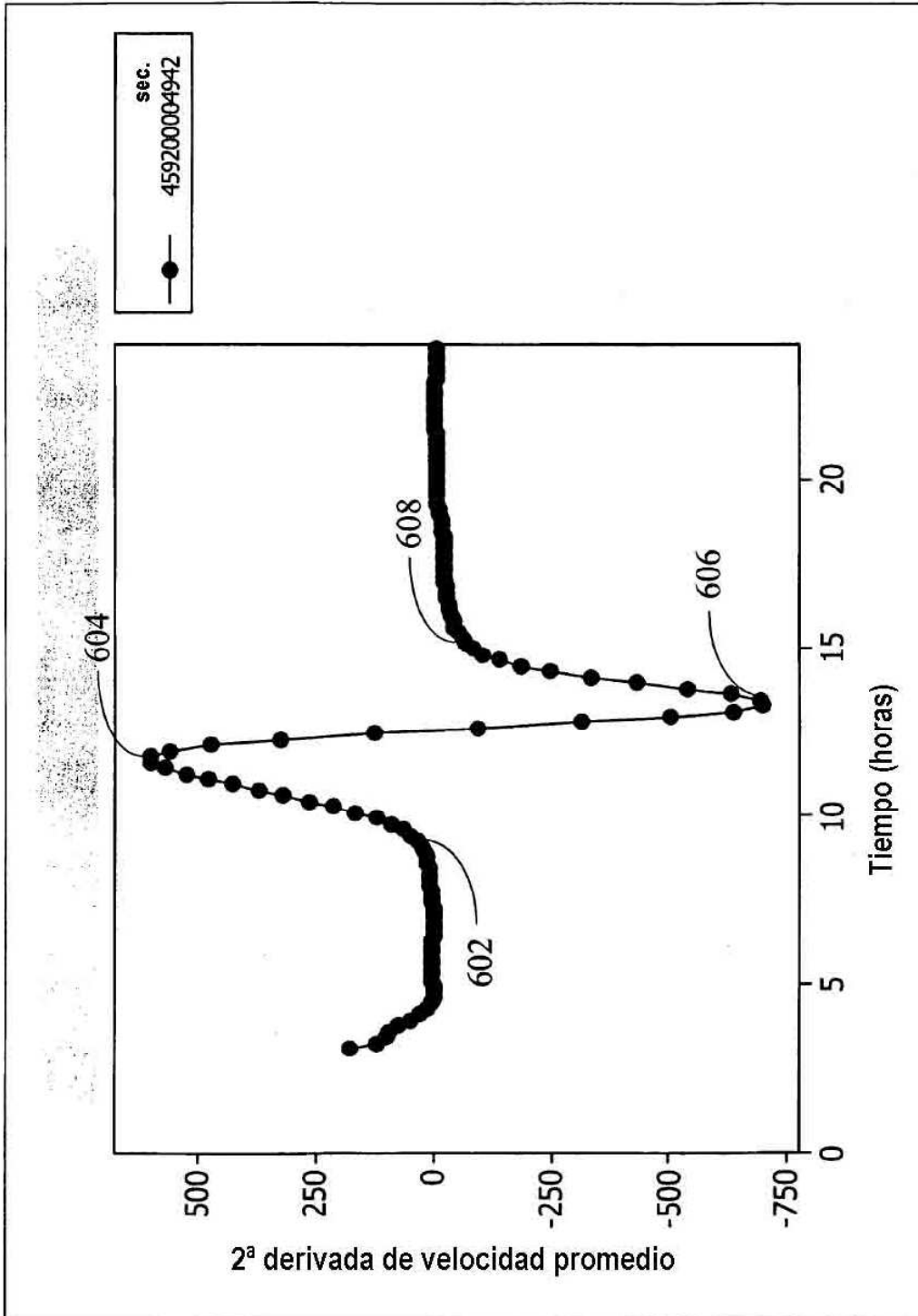


Fig. 6

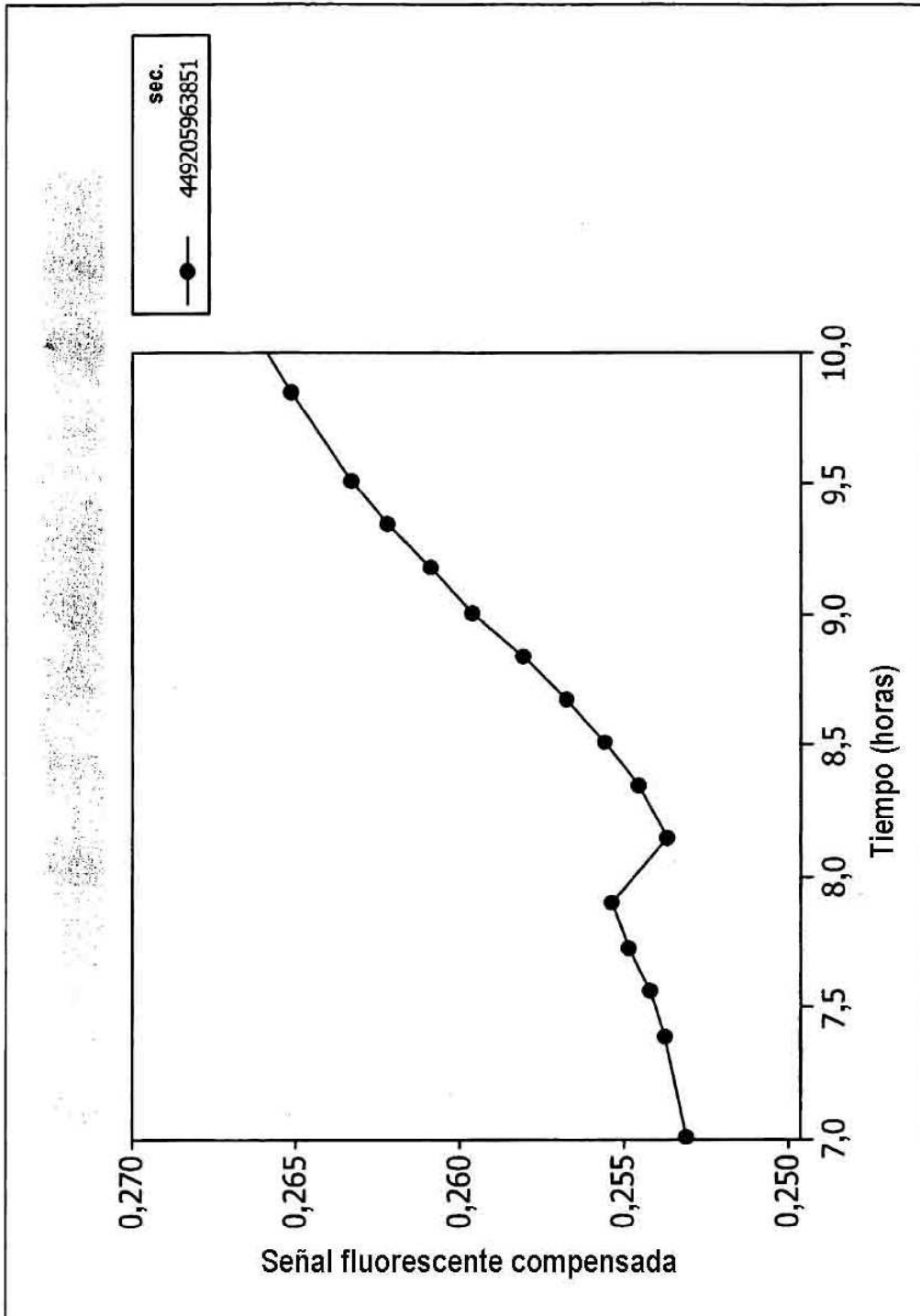


Fig. 7



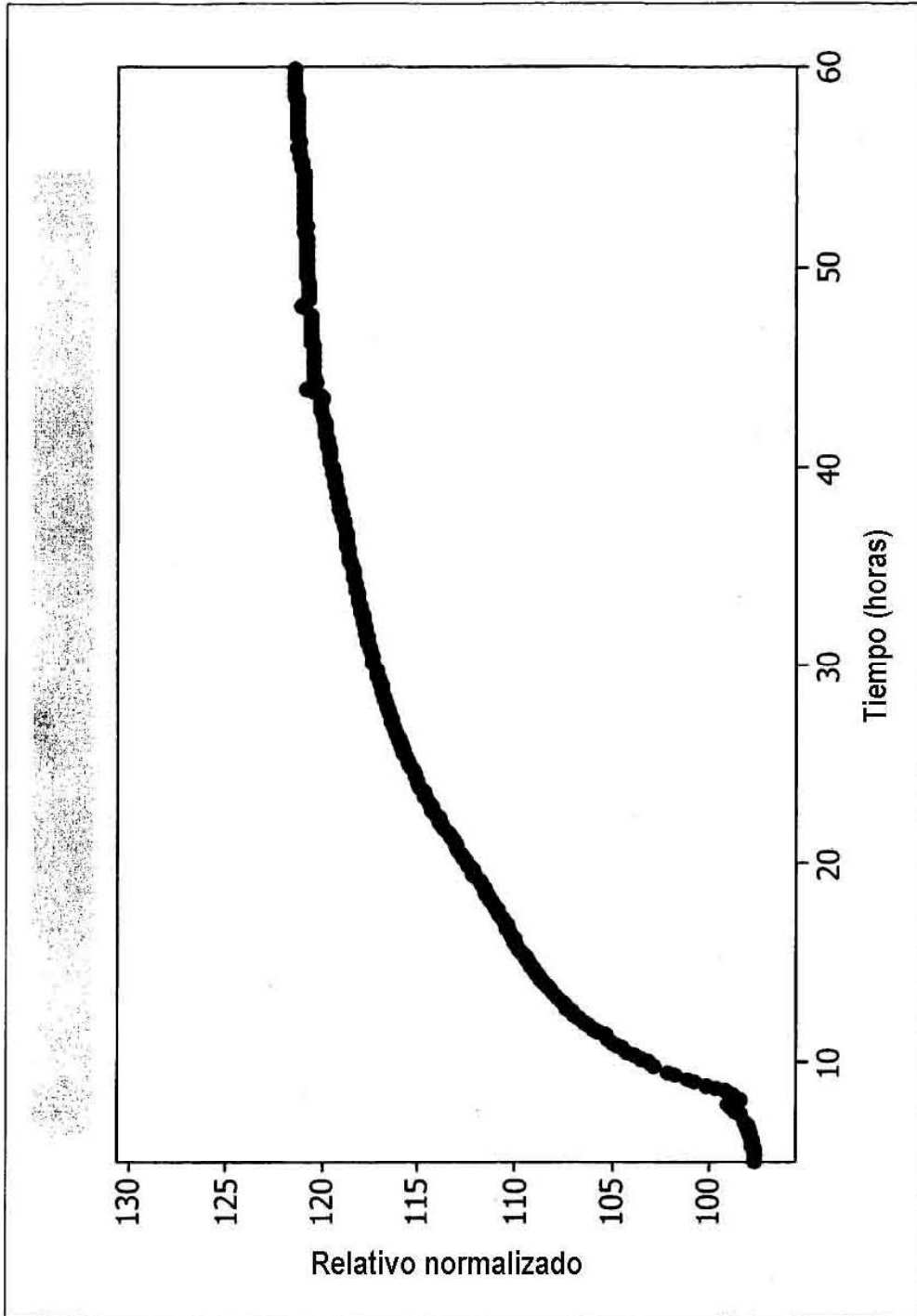


Fig. 8

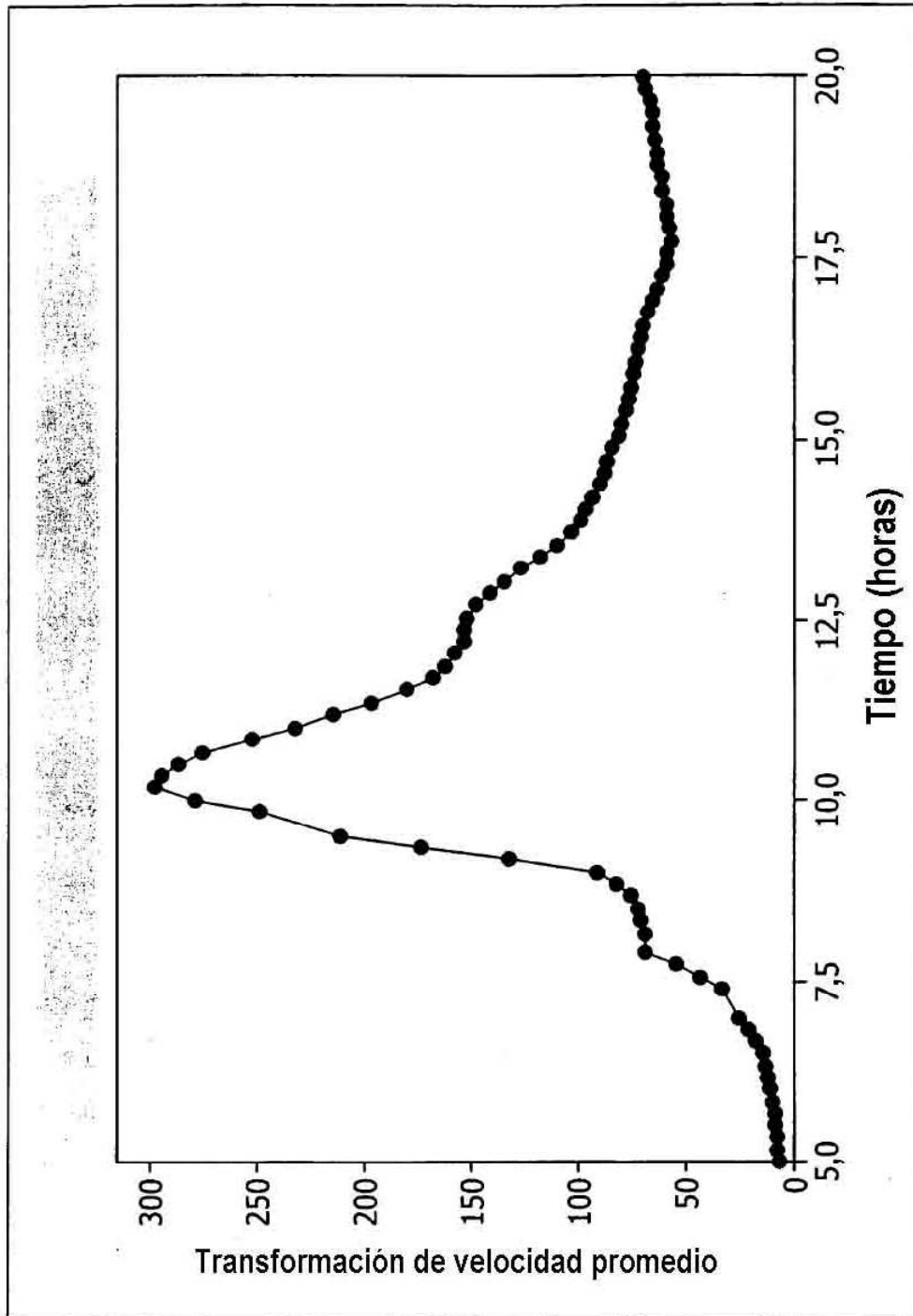


Fig. 9