

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 056**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/80** (2006.01)  
**G01N 21/78** (2006.01)  
**G01N 21/77** (2006.01)  
**G01N 21/25** (2006.01)  
**G01N 33/48** (2006.01)  
**G01N 33/84** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.01.2012 PCT/US2012/021733**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.07.2013 WO13109267**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2012 E 12865898 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 2805161**

54 Título: **Disposición de detectores para botellas de hemocultivo con sensores colorimétricos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.01.2019**

73 Titular/es:  
**BIOMÉRIEUX INC. (100.0%)  
100 Rodolphe Street  
Durham, North Carolina 27712, US**

72 Inventor/es:  
**CLAY, BRADFORD, G.**

74 Agente/Representante:  
**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 698 056 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

Disposición de detectores para botellas de hemocultivo con sensores colorimétricos

**Antecedentes**

5 Botellas para hemocultivo por la presencia de microorganismos e instrumentos relacionados para el análisis de tales botellas de una manera no invasiva son conocidos en la técnica y se describen en la literatura de patentes. Véanse las Patentes de los Estados Unidos 5.858.769; 5.795.773; 4.945.060; 5.094.955; 5.164.796; 5.217.876; y 5.856.175. Las botellas e instrumentos de las patentes enumeradas con anterioridad se han comercializado con éxito por el cesionario de la presente bajo la marca comercial BacT/ALERT.

10 Las botellas que se describen en estos instrumentos de hemocultivo utilizan sensores colorimétricos colocados en el fondo de la botella y en contacto con los medios de muestra para determinar la presencia/ausencia de crecimiento bacteriano. Una vez que se añade una muestra clínica/industrial al medio de crecimiento líquido presente en la botella y se produce la incubación, la concentración de dióxido de carbono aumenta a medida que aumenta el número de microorganismos; el dióxido de carbono es un subproducto de la respiración del crecimiento bacteriano. Alternativamente, los cambios en el pH del medio que están relacionados con el crecimiento de microorganismos  
15 también pueden ser monitorizados por el sensor. La operación básica del sensor BacT/ALERT y la monitorización de dispositivos electrónicos se describen en la Patente de los Estados Unidos 4.945.060 y también en un artículo de Thorpe et. al. en in "BacT/Alert: an Automated Colorimetric Microbial Detection System" publicado en el Journal of Clinical Microbiology, July 1990, pp. 1608-12.

20 El sistema de detección colorimétrico básico descrito en la patente '060 se muestra en la Figura 1 de las figuras adjuntas. Un Diodo Emisor de Luz roja (LED) (4) brilla sobre la parte inferior de la botella BacT (1). Un sensor colorimétrico (2) se deposita sobre la parte inferior de la botella (1). La luz LED incide sobre el sensor en un ángulo de 45 grados respecto a la superficie inferior de la botella (1). La mayor parte de la luz penetra en la estructura de la botella e incide en el sensor colorimétrico (2). Parte de la luz se refleja en el material de la botella de plástico y el sensor (2) a 45 grados de la superficie inferior de la botella, pero en una dirección opuesta a la luz incidente (por  
25 ejemplo, el ángulo de reflexión es equivalente al ángulo de incidencia). Gran parte de la luz restante es dispersada desde la superficie y el interior del sensor. El sensor (2) cambia su color a medida que el porcentaje de CO<sub>2</sub> en la botella varía de 0% a 100%; el color varía de azul a amarillo, respectivamente. Un fotodetector de silicio (5) "mira fijamente" (es decir, monitoriza continuamente la señal de intensidad dispersada) en la región en el sensor (2) en el que la luz procedente del LED interactúa con el sensor. La intensidad de la luz dispersada que es detectada por el  
30 fotodetector es proporcional al nivel de CO<sub>2</sub> dentro de la botella (1). La Figura 1 también muestra los dispositivos electrónicos asociados que incluyen una fuente de corriente (6), un convertidor de corriente a voltaje (7) y un filtro de paso bajo (8).

35 La Figura 2 es un gráfico de la señal recibida por el fotodetector (5) de la Figura 1. Los datos se recogieron utilizando una sonda de fibra óptica en lugar del fotodetector (5) en la Figura 1. La sonda de fibra óptica se enruta a un espectrómetro de luz visible, que muestra la luz dispersada como una función de la intensidad (Unidades de Reflectancia) y longitud de onda. La forma de cada curva es la convolución de la distribución de la intensidad del LED con la reflectividad del sensor colorimétrico (2) a un nivel de CO<sub>2</sub> especificado.

40 Cuando el fotodetector de silicio (5) de la Figura 1 se sustituye por la sonda de fibra óptica, una fotocorriente es generada por el fotodetector que es proporcional a la señal de longitud de onda integrada que se muestra en la Figura 2. En otras palabras, el fotodetector de silicio (5) integra la respuesta espectral en una fotocorriente. A su vez, esta fotocorriente se convierte en una señal de voltaje usando un amplificador de transimpedancia.

45 Mientras que el sistema de detección BacT/ALERT de la Figura 1 es robusto y se ha utilizado en sistemas de hemocultivo con éxito durante muchos años, tiene ciertas áreas para mejorar. En primer lugar, si la botella de hemocultivo (1) se mueve en la celda (por ejemplo, el desplazamiento en el eje z de manera que se desplaza desde la posición del fotodetector), el sistema (como se implementa actualmente) detecta este movimiento como una  
50 reducción en la intensidad. Sin embargo, esta reducción en la intensidad es interpretada por el instrumento como una reducción del nivel de CO<sub>2</sub> de la botella, que de hecho puede no estar ocurriendo. Dado que este efecto es contrario al efecto del aumento de la reflectividad de una botella a medida que aumenta el contenido de dióxido de carbono (que significa el crecimiento bacteriano), es posible que el sistema trate una botella que se desplaza como una que no presenta ningún crecimiento (es decir, una condición de falsos negativos).

55 Asimismo, a medida que los instrumentos envejecen en el laboratorio clínico, el sistema óptico puede recolectar polvo o materiales ópticos que experimentan transmisividad reducida como una función del tiempo. Por ejemplo, a medida que los plásticos envejecen, su transmisividad se puede reducir por los efectos de la luz, la acumulación de partículas (polvo) o el uso repetido de agentes de limpieza. Estos efectos no afectan lecturas, sino que se manifiestan como una deriva en la respuesta del sistema. Verificaciones de calibración periódica pueden compensar esta deriva. Por lo tanto, existe una necesidad percibida desde hace tiempo, pero no satisfecha, de contar con un monitor en tiempo real de la transmisión en el sistema óptico y con la capacidad de ajustar o compensar algunas de estas fuentes de error, en particular la situación en la que la botella no está completamente instalada en el

receptáculo y no está en una posición nominal o inicial (tiene un desplazamiento del eje Z alejándose de la disposición del detector óptico).

5 Otra técnica anterior de interés incluye las siguientes Patentes de los Estados Unidos: 7.193.717; 5.482.842; 5.480.804; 5.064.282; 5.013.155; 6.096.272; 6.665.061; 4.248.536 y la solicitud de PCT publicada WO 94/26874 publicada el 24 de noviembre de 1994. La Patente de los Estados Unidos 5.094.955 desvela un aparato para monitorizar continuamente cambios en el pH o CO<sub>2</sub> en un espécimen que interactúa con un medio de crecimiento en un recipiente sellado de modo que se realiza monitorización a través de la determinación colorimétrica sin afectar a la integridad del recipiente o su contenido y de una manera esencialmente continua. El cambio en el pH o CO<sub>2</sub> se debe a la presencia de microorganismos en la muestra en un cultivo dentro del recipiente sellado transparente que genera, a través del cambio en el pH o CO<sub>2</sub>, cambios de color en un sensor fijado a la superficie interior del recipiente.

**Sumario**

Se divulga un dispositivo de detección mejorado para una botella de hemocultivo que incorpora sensores colorimétricos.

15 La disposición de detección incluye un fotodetector, un sensor LED y un LED de referencia, y un circuito de control para activar selectiva y alternativamente el sensor LED y el LED de referencia para iluminar el sensor colorimétrico. El sensor LED funciona como el LED de la Figura 1 LED y se utiliza para determinar el cambio en el color del sensor colorimétrico. El fotodetector monitoriza la reflectancia del sensor cuando es iluminado por el sensor LED mediante la monitorización de los cambios de intensidad. El LED de referencia se selecciona para que tenga una longitud de onda de tal manera que las lecturas de intensidad del fotodetector de iluminación por el LED de referencia no se vean afectadas sustancialmente por cambios en el color del sensor colorimétrico. Como tal, el LED de referencia se puede utilizar como una referencia, con las lecturas del fotodetector durante la iluminación por el LED de referencia sustancialmente no afectadas por los cambios en la concentración de CO<sub>2</sub> dentro de la botella. Se ha descubierto que las longitudes de onda en el infrarrojo cercano (pico  $\lambda$  para el LED entre 750 y 950 nm) son adecuadas para el LED de referencia. También se ha descubierto que las longitudes de onda en la porción azul del espectro también son adecuadas para el LED de referencia, en el que el LED tiene un pico  $\lambda$  inferior a aproximadamente 490 nm, como se explicará en mayor detalle a continuación. Los LED de referencia en la porción azul del espectro pueden producir cambios menores en la lectura del sensor colorimétrico, y en particular pueden causar que la señal reflejada desde el sensor colorimétrico bajo iluminación del sensor LED caiga ligeramente bajo condiciones de bajas concentraciones de CO<sub>2</sub> dentro de la botella. Sin embargo, hay otros beneficios que ofrecen los LED de referencia azules, como se explicará más adelante. El pequeño efecto del LED de referencia azul de la señal reflejada desde el sensor LED es suficientemente menor, tal que, en el sentido general, el LED de referencia no afecta sustancialmente la detección de los cambios en el color del sensor colorimétrico en la botella debido a condiciones de crecimiento microbiano en la botella.

35 El LED de referencia es útil para indicar si cambia la distancia entre la botella y el submontaje del detector, si cambian las condiciones de iluminación de ambiente, o si cambia cualquier cosa dentro de la trayectoria óptica física entre el sensor LED, la botella y el fotodetector. Puesto que un cambio en el LED de referencia no es dependiente del estado del sensor colorimétrico, el LED de referencia puede proporcionar información sobre los cambios en el sistema óptico que no están relacionados con el crecimiento de microorganismos de modo que tales cambios no relacionados con el crecimiento del sistema pueden ser discriminados de los cambios relacionados con el crecimiento. Esta característica ayuda a reducir la tasa de falsos positivos en el sistema y mejora la exactitud y fiabilidad de la detección.

45 Durante el uso, el sensor LED y LED de referencia se iluminan alternativa y repetidamente, por ejemplo, de una manera multiplexada por división de tiempo. Las señales del fotodetector de tales iluminaciones secuenciales son alimentadas a un ordenador. El ordenador monitoriza los cambios en la señal del fotodetector cuando se ilumina el LED de referencia; estos cambios indican un cambio en la posición de la botella o el sistema óptico. El ordenador puede compensar las señales de LED de sensor de acuerdo con las relaciones de calibración derivadas entre las señales del sensor LED y LED de referencia, por ejemplo, debido al desplazamiento de la posición de botella en el sistema de detección de una posición inicial o nominal.

50

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una ilustración de una disposición conocida de sensor y detector para botellas de recolección de sangre como se describe en la Patente de los Estados Unidos 4.945.060.

5 La Figura 2 es un trazado de reflectancia de un sensor colorimétrico en un espectrómetro en lugar del fotodetector de la Figura 1 como una función de longitud de onda y concentración de CO<sub>2</sub>.

La Figura 3 es una disposición de sensor y detector para botellas de recolección de sangre de acuerdo con la presente divulgación.

La Figura 4 es un trazado de señales de intensidad del fotodetector de la Figura 3 para iluminación del sensor LED y el LED de referencia del sensor colorimétrico sobre un intervalo de CO<sub>2</sub> de 0-100% presente dentro de la botella.

10 La Figura 5 es un gráfico de señales de intensidad del fotodetector para el sensor LED y el LED de referencia como una función del desplazamiento de la botella desde la posición nominal o inicial en el que la botella está en su posición diseñada próxima al sistema de detección de la Figura 3.

La Figura 6 es un trazado de señales de intensidad del fotodetector para el sensor LED y el LED de referencia como una función del tiempo durante las condiciones de crecimiento microbiano con la botella.

15 La Figura 7 es un diagrama de bloques de los dispositivos electrónicos en operación en la disposición del sensor de la Figura 3.

La Figura 8 es un gráfico del ciclo de trabajo del LED de referencia y sensor de la Figura 3, que muestra el procedimiento de operación de multiplexación por división de tiempo. La anchura de los impulsos que representan el ciclo de trabajo no está a escala; en una realización posible el factor de trabajo es del 33 por ciento: 1/3 del tiempo en que el LED de referencia está iluminado, 1/3 del tiempo en que el sensor LED está iluminado, y un 1/3 del tiempo en que ningún LED está iluminado para permitir llevar a cabo una medición "oscura".

20 La Figura 9 es un trazado de las características espectrales de un sensor colorimétrico de la Fig. 3 como una función de la radiación incidente bajo condiciones de diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub> dentro de la botella.

25 La Figura 10 es un trazado de la señal del fotodetector de la Fig. 3 como una función de la concentración de CO<sub>2</sub> dentro de la botella bajo iluminación por un sensor LED (línea roja) y un LED de referencia de espectro azul (línea azul).

La Figura 11 es un trazado de la señal del fotodetector de la Fig. 3 como una función del desplazamiento de la botella desde una posición inicial bajo iluminación por un sensor LED (línea roja) y un LED de referencia de espectro azul (línea azul).

30 La Figura 12 es un trazado de la señal del fotodetector de la Fig. 3 como una función del tiempo bajo condiciones normales de crecimiento bacteriano dentro de la botella.

**Descripción detallada**

35 La invención implica el uso de LED secundario como una fuente de luz para compensar cambios no de Sensor de Emulsión Líquida (LES) en el sistema óptico. Se muestra en la Figura 3 un diagrama de bloques de la configuración óptica. La configuración es para la prueba de una botella 1, que tiene un LES colorimétrico (sensor) 2 incorporado dentro de la botella 1. La configuración incluye un sensor LED 4, un LED de referencia 10, y un fotodetector 5 que genera señales de intensidad. Ambos LED 4 y 10 están en ángulo a 45 grados en relación a la superficie inferior de la botella como se muestra en la Figura 3. La reflectividad del fondo de la botella y LES 2 se mide de forma secuencial, por medio de un circuito de control (42, Figura 7) que activa selectivamente y alternativamente el sensor LED y el LED de referencia. Por ejemplo, el LED de detección o rojo 4 se enciende y la señal reflejada es medida por el fotodetector 5. Luego, el sensor LED 4 se extingue. Después, se ilumina el LED de referencia 10 y el mismo fotodetector 5 mide la luz reflejada. Luego, se extingue, y el procedimiento se repite. Este enfoque también se denomina esquema multiplexado por división de tiempo, que se muestra en la Figura 8 y se describirá con más detalle a continuación.

45 Como se indicó con anterioridad, los LED 4 y 10 están orientados en un ángulo de 45 grados con respecto al fondo de la botella. Esto es para que la reflexión de la superficie inferior de la botella no está fuertemente acoplada en el fotodetector 5. El ángulo de incidencia = ángulo de reflexión de modo que la luz que incide el fondo de la botella salga a 45 grados y no afecte considerablemente la lectura del fotodetector (dado que la luz dispersada del LES es sólo de interés). Los LED tienen un ángulo de emisión espacial de 15-17 grados; es decir, los LED emiten luz en un cono que se define por Emisión Pico y ángulo de Ancho Completo a la mitad de la potencia máxima; el ángulo del cono está en el intervalo de 15-24 grados.

50 La prueba se realizó en una variedad de colores de LED, y se descubrió que la señal del fotodetector para LED infrarrojo cercano (longitudes de onda pico de 750-950 nm) se vio marginalmente afectada por los cambios de color

de LES. Todas las demás longitudes de onda de luz presentaban un cambio positivo o negativo en la reflectividad cuando el nivel de CO<sub>2</sub> se cambió de 0% a 100%. Este efecto se minimiza en longitudes de onda más allá de aproximadamente 750 nm (LED infrarrojo cercano) como se muestra en la Tabla 1.

5 Tabla 1 - Salida del fotodetector (voltios) con botellas enriquecidas con CO<sub>2</sub> para sensor LED (ROJO) y LED de referencia (IR)

Nivel de CO <sub>2</sub>	Muestras	LED Sensor		LED de Referencia	
		Media	Desv. Est.	Media	Desv. Est.
0%	390	0,65838	0,00045	2,32539	0,00045
2%	390	0,84627	0,00048	2,25763	0,00048
15%	390	1,29105	0,00047	2,40419	0,00048
100%	390	1,92822	0,00063	2,29345	0,00050

10 La Figura 4 muestra el equivalente gráfico de la Tabla 1. Las lecturas del fotodetector para el sensor de referencia se trazan como la línea 20 y las lecturas del fotodetector para el sensor LED se trazan como la línea 22. Un gran aumento en la señal de LED rojo 22 se observa en el gráfico (cambia de aproximadamente 0,6 voltios a casi 2 voltios) a medida que el nivel de dióxido de carbono en la botella se incrementa de 0% de CO<sub>2</sub> a 100% de CO<sub>2</sub>. Al mismo tiempo, la señal de LED de referencia 20 cambia de 2,32 voltios a 2,29 voltios (un cambio de 30 mV), por lo que es muy estable en el transcurso del cambio de color de LES.

15 Con el fin de estudiar los cambios en la señal óptica como una función de la posición de la botella en relación con el sistema óptico, se construyó un dispositivo de calibración/prueba que consiste en un micrómetro digital que está unido a la botella BacT/ALERT. La botella se coloca primero en la posición normal (inicial) en el estante de montaje de BacT/ALERT para que esté lo más cerca del sistema óptico como sea posible. Se toman lecturas de reflectancia, después la botella se desplaza mediante el ajuste del micrómetro. El micrómetro proporciona pequeños ajustes precisos en el desplazamiento del eje z (es decir, mueve la botella alejándola del sistema óptico), de modo que puedan cuantificarse los efectos de desplazamiento. El cambio normalizado en la señal óptica como una función del desplazamiento se muestra gráficamente en la Figura 5, nuevamente con la señal del fotodetector para iluminación del LED de referencia trazada como línea 20 y la señal del fotodetector para el sensor LED trazada como línea 22. Se observa que el desplazamiento provoca un desplazamiento lineal en las señales recibidas por el fotodetector. Aunque la señal de sensor LED 22 y la señal de LED de referencia 20 tienen diferentes pendientes de cambio, cada una es lineal, de modo que puede desarrollarse una relación para compensar los cambios en la señal de LED como una función de los cambios en la salida del detector LED de referencia, por ejemplo, debido al desplazamiento de la botella desde una posición inicial o nominal. Las ecuaciones se calcularon para los gráficos de la Figura 5; las ecuaciones se enumeran a continuación en la Tabla 2 junto con la bondad del parámetro de ajuste (R<sup>2</sup>).

TABLA 2

30 Salida del detector (Señal) =  $0,2652 - 0,2554x$  R<sup>2</sup> = 0,9963

Salida del detector (Referencia) =  $0,5621 - 0,2384x$  R<sup>2</sup> = 0,9999

Donde x = la distancia de desplazamiento lineal (en pulgadas)

En consecuencia, mediante la esquematización del cambio de intensidad de la salida del LED de referencia, puede determinarse un valor de desplazamiento. Mediante la aplicación de ese valor a la salida del LED de señal, la cantidad de reducción de intensidad se puede cuantificar y compensar.

35 Una prueba adicional de las capacidades de la disposición de detector de la Figura 3 se realizó mediante la inyección de un inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* en la botella de hemocultivo y la monitorización del sensor colorimétrico utilizando las ópticas del sensor LED y el LED de referencia mientras que la levadura crece en la botella. La Figura 6 muestra la curva de crecimiento – latencia de la levadura, se muestran las fases de crecimiento exponenciales y estacionarias. Durante el crecimiento (y los cambios en la respuesta del sensor LES), se observa que la señal del LED de referencia 20 no presenta cambios, mientras que la señal del sensor LED 22 cambia debido al cambio en la concentración de CO<sub>2</sub> como resultado del crecimiento microbiano. La planeidad de la curva 20 verifica la insensibilidad de las lecturas del fotodetector durante la iluminación del LED de referencia a los cambios en el color de LES. Verifica además su capacidad de monitorizar los cambios en el sistema óptico sin ser afectado por el crecimiento bacteriano.

45 La Figura 7 es un diagrama de bloques de los dispositivos electrónicos 30 para la realización de la Figura 3. Los dispositivos electrónicos 30 incluyen un "nido óptico" 32 que consiste en el sensor LED 4, el LED de referencia 10, y

el fotodetector 5. La salida del fotodetector se convierte en una señal digital en un convertidor A/D 34 y se alimenta a un sistema de adquisición de datos 36. El sistema de adquisición de datos envía señales a un tablero de control de LED 42, que incluye circuitos de control y controladores de LED que envían señales a través de los conductores 44 y 46 que causa que los LED 4 y 10 se iluminen de una manera multiplexada por división de tiempo. Las señales del fotodetector del sistema de adquisición de datos se envían a un ordenador 38, que puede ser parte del instrumento que incorpora el nido óptico 32 de la Figura 7. (Se omiten en la Figura los dispositivos electrónicos incidentales tal como filtros y convertidores de corriente a voltaje, pero pueden estar presentes en los dispositivos electrónicos).

La memoria 40 almacena las constantes y relaciones de calibración entre las salidas de LED referencia y señal, derivadas de curvas tales como la Figura 5 que se explican con anterioridad en la Tabla 2. Por ejemplo, la memoria 40 almacena una relación de calibración entre las señales de intensidad para el sensor LED como una función de la distancia de la botella desde la posición inicial (trazado 22 en la Figura 5); el ordenador 38 compensa una caída en las señales de intensidad del sensor LED debido a que la botella está colocada a cierta distancia de la posición inicial de acuerdo con las relaciones de calibración para el sensor LED y el LED de referencia.

La Figura 8 es un gráfico del ciclo de trabajo del LED de referencia 10 y el sensor LED 4 de la Figura 3, que muestra el procedimiento de operación de multiplexación por división de tiempo. Los estados de encendido y apagado del LED se muestran en la línea 50; los estados de encendido y apagado del LED de referencia se muestran en la línea 42. La anchura de los impulsos que representan el ciclo de trabajo no está a escala y puede variar. En una realización posible el factor de trabajo es del 33 por ciento: 1/3 del tiempo en que el LED de referencia está iluminado, 1/3 del tiempo en que el sensor LED está iluminado, y un 1/3 del tiempo en que ningún LED está iluminado para permitir llevar a cabo una medición "oscura".

La compensación para el polvo, deriva, cambios en el sistema óptico, y envejecimiento de los materiales ópticos en la trayectoria del haz también es posible con la disposición de la Figura 3. Puesto que estos se producen durante un tiempo prolongado (se espera una duración de meses), estarían cambiando muy lento. La compensación se consigue por el guardado de puntos de datos de la calibración inicial (por ejemplo, derivados de la Figura 5) y la comparación de las señales del fotodetector para los niveles de emisión de LED IR 10 a valores iniciales para compensar los mecanismos de degradación en el sistema óptico. Este cambio también se aplica al sensor LED 4. Para eventos de deriva de tiempo más corto, los cambios se monitorizan en el LED IR 10 que debe ser muy estable durante el ciclo de crecimiento de las bacterias; cualquier cambio en el rendimiento de LED IR causa ajustes consiguientes en las lecturas del fotodetector del sensor LED, por ejemplo, utilizando relaciones de calibración almacenadas.

#### LED de referencia de espectro azul

Como se indicó con anterioridad, también se ha descubierto que el LED de referencia 10 (Fig. 3) con una longitud de onda pico de iluminación inferior a aproximadamente 490 nm también es adecuado para las presentes disposiciones de detección. En una realización, el LED de referencia tiene una longitud de onda pico de iluminación entre aproximadamente 328 y 470 nm. En una realización actualmente preferida, el LED de referencia tiene una longitud de onda pico de iluminación entre aproximadamente 450 y 470 nm. El LED azul OVLFB3C7 de Optek Technology con una longitud de onda pico de 460 nm, una distribución de Lorentz de intensidad de iluminación, y una anchura espectral de aproximadamente 25 nm (435 a 485 nm total) es un ejemplo de un LED de referencia adecuado.

Este LED de referencia particular produce un cambio menor en las lecturas del sensor colorimétrico (2, Fig. 3) cuando el sensor 2 cambia de color de azul a amarillo bajo condiciones de aumento del crecimiento microbiano y concentración de CO<sub>2</sub> dentro de la botella. Con el LED de referencia azul 10, la señal reflejada desde el sensor 2 cae ligeramente en los bajos valores de CO<sub>2</sub> (predominantemente entre 0 y 5%). Aunque el pequeño cambio en la señal no es ideal para una referencia, el hecho de que caiga en lugar de aumentar proporciona información útil. En particular, si ambas señales del fotodetector (5, Figs. 1, 3) durante la iluminación de los LED de referencia y sensor va en la misma dirección, es indicativo de una condición de error. El aumento de la señal del fotodetector durante la iluminación del sensor LED mientras la señal del LED azul (referencia) disminuye o no cambia es el estado normal. Véase la Fig. 12. No debe nunca ocurrir una condición de disminución de señal del fotodetector bajo iluminación de sensor LED mientras aumenta la señal del fotodetector bajo iluminación de LED azul (referencia), a menos que el sistema esté operando de forma errática.

La longitud de onda azul del LED de referencia también tiene algunas características con interacción con el sensor colorimétrico 2 (Figs. 1, 3) que pueden proporcionar datos adicionales. La Fig. 9 muestra las características espectrales del sensor 2 como una función de la longitud de onda incidente en una línea en el gráfico. La serie de líneas corresponde a la respuesta espectral del sensor como una función del nivel de CO<sub>2</sub> en la botella BacT 1 (es decir, cada línea es el espectro en un nivel de CO<sub>2</sub> discreto). El LED de detección (4, Fig. 3) opera en la región 635-640 nm o roja del espectro óptico; se puede observar que esta corresponde a una región de gran cambio en la señal a medida que cambia el nivel de CO<sub>2</sub>.

Nótese que en la Fig. 9, el cambio de señal en diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub> en la región azul (inferior a aproximadamente 490 nm) es mucho más pequeño que el cambio de señal a 635 nm, lo que indica que un LED de referencia azul no resulta en un efecto sustancial en la salida del sensor colorimétrico cuando cambia la

concentración de CO<sub>2</sub>. La Fig. 10 muestra los cambios en las señales del fotodetector para dos LED (LED de referencia o azul y el sensor LED o “rojo”) como una función de CO<sub>2</sub> en las botellas BacT/ALERT. Nótese que la señal del fotodetector bajo condiciones de iluminación por la señal de LED azul (referencia) de hecho cae ligeramente a medida que la concentración de CO<sub>2</sub> aumenta en la botella, mientras que la señal del fotodetector aumenta sustancialmente bajo condiciones de iluminación por el sensor LED a medida que la concentración de CO<sub>2</sub> aumenta en la botella. Esta información de pendiente opuesta se puede utilizar para ayudar a discriminar los cambios en el sensor colorimétrico versus los cambios en el sistema. Bajo una condición de operación normal, la señal del fotodetector para la iluminación de LED rojo o sensor aumenta si hay crecimiento bacteriano en la botella (aumento del nivel de CO<sub>2</sub> en la botella). La señal del fotodetector para la señal de LED de azul (referencia) disminuye ligeramente. Esta información indica un estado normal de la botella. Esto se muestra en la Fig. 12.

En el caso en que haya un desplazamiento físico de la botella en su celda incubadora de su posición nominal o inicial, o se produzca algún otro cambio imprevisto en el sistema óptico, la señal del fotodetector durante la iluminación del sensor LED 4 se reduce como se muestra en la Fig. 11. De manera similar, dado que la distancia entre la botella y el fotodetector cambia, la señal del fotodetector durante la iluminación por el LED azul (referencia) también se reduce, como también se muestra en la Fig. 11. Por lo tanto, en lugar de un aumento de la señal roja y una disminución de la señal azul, el sistema registra una disminución de ambas señales - y el cambio de azul es una disminución más grande en la señal que la normalmente experimentada con el crecimiento bacteriano (compárese la línea “azul” en la Fig. 11 con la línea “azul” en la Fig. 10). Por lo tanto, hay dos indicadores de una condición anormal. La Tabla 3 muestra las condiciones que se producen a partir de las tendencias de los datos de los dos LED. La situación en la que aumenta la señal del fotodetector de LED azul (referencia) y rojo (sensor) puede ser causada por una botella colocada en una celda en la incubadora, pero no empujada a la parte inferior de la celda a su posición inicial. Después, si la botella se mueve más adentro en su celda de mantenimiento se reduce la distancia entre la botella y el fotodetector 5, por lo que aumentan ambas señales.

Tabla 3

Relación de señales de LED con tendencia generada

	Disminución de señal de LED azul	Aumento de señal de LED azul
Aumento de señal de LED rojo	Condición NORMAL	Movimiento de botella
Disminución de señal de LED rojo	Movimiento de botella o cambios de señal óptica	Condición de fallo

Nota: En la Tabla 3, “señal de LED azul” significa salida de señal del fotodetector 5 durante la iluminación del sensor colorimétrico por el LED de referencia azul 10, Fig. 3; “señal de LED rojo” significa salida de señal del fotodetector 5 durante la iluminación del sensor colorimétrico por el sensor LED rojo 4, Fig. 3.

Si bien la discusión anterior de las Figs. 9-11 se refiere a un LED de referencia con longitud de onda pico de 465 nm, son posibles LED de referencia con otras longitudes de onda de pico inferiores a aproximadamente 490 nm. También se han probado LED de 428 nm para uso como un LED de referencia. Los LED de 428 nm generan más cambio en la señal azul a medida que aumenta la concentración de CO<sub>2</sub> en la botella en comparación con el LED de referencia de 465 nm. Si bien esto no implica de por sí demasiada preocupación, con algunas botellas pueden surgir otras cuestiones que tienen que ser tratadas. Algunas botellas están construidas como una capa de policarbonato de múltiples capas con varias capas de nylon entre las capas interiores y exteriores de policarbonato. Durante la fabricación, para proporcionar la inspección visual de la capa de nylon y confirmar que es una capa sólida de nylon hasta las paredes de la botella, el plástico nylon se impregna con un fluoróforo. Si el LED de referencia es mucho más corto en longitud de onda que 428 nm, el fluoróforo en el plástico nylon puede ser activado por el LED de referencia, lo que causa el aumento del ruido en la señal del fotodetector. En longitudes de onda más cortas, fotones de mayor energía pueden degradar los plásticos en el sistema óptico y las longitudes de onda más cortas pueden ser un peligro para los ojos de los operadores del sistema si no se toman precauciones (tal como el uso de gafas de protección adecuadas al inspeccionar el sistema óptico durante la iluminación por el LED de referencia). La degradación del plástico puede mejorar por la selección de materiales UV compatibles.

En teoría, las disposiciones del detector de la presente divulgación funcionan incluso cuando la botella 1 es opaca. El sistema óptico debe funcionar sin cambios en la señal a menos que cambie el sistema óptico. Sin embargo, con longitudes de onda más cortas para el LED de referencia (inferiores a 400 nm) puede ocurrir la activación de fluoróforos biológicos presentes en la muestra, lo que causa ruido en la señal detectada. En la actualidad, se encuentran disponibles LED en longitud de onda de emisión tan baja como de 240 nm; sin embargo, la potencia es baja y son costosos. Los LED de referencia de aproximadamente 365 nm pueden ser un límite inferior práctico utilizando los dispositivos electrónicos existentes para ganancia de la señal en los canales de detección y referencia dado que los LED por debajo de esta longitud de onda típicamente no tienen una gran potencia óptica. En cualquier caso, los LED en las regiones más bajas (más cortas) del espectro pueden hacerse funcionar utilizando materiales

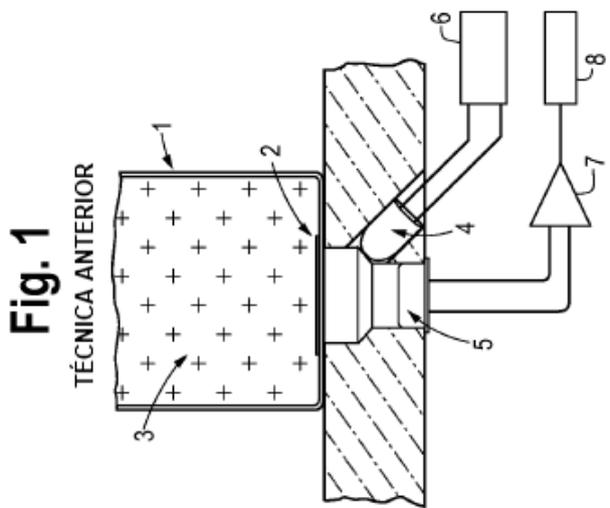
adecuados, dispositivos electrónicos para manipular valores de señal inferiores y procedimientos conocidos para la eliminación del ruido en una señal de fotodetector, por ej., de fuentes diferentes al sensor colorimétrico tal como la botella, los fluoróforos presentes en el material de la botella, o la autofluorescencia en la propia muestra.

5 Todas las cuestiones relativas al ámbito de la invención se han de determinar por referencia a las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

1. Una disposición de detección que comprende:
  - una botella de hemocultivo (1) que incorpora un sensor colorimétrico (2) sujeto al cambio de color debido a cambio en el pH o CO<sub>2</sub> de un medio de muestra dentro de la botella de hemocultivo,
  - 5 un sensor LED (4) que ilumina el sensor colorimétrico;
  - un LED de referencia (10) que ilumina el sensor colorimétrico;
  - un circuito de control (42) para activar selectivamente y alternativamente el sensor LED y el LED de referencia; y
  - 10 un fotodetector (5), el fotodetector que mide la reflectancia desde el sensor colorimétrico durante la iluminación selectiva y alterna del sensor colorimétrico con el sensor LED y el LED de referencia y que genera señales de intensidad;
  - en el que el LED de referencia se selecciona para que tenga una longitud de onda pico de iluminación de tal manera que las señales de intensidad del fotodetector de iluminación por el LED de referencia no se vean afectadas sustancialmente por cambios en el color del sensor colorimétrico, y en el que la longitud de onda pico de iluminación del LED de referencia es inferior a aproximadamente 490 nm;
  - 15 dicha disposición de detección comprende además un ordenador que recibe las señales de intensidad, el ordenador incluye una memoria (40) que almacena una relación de calibración entre las señales de intensidad para el LED de referencia como una función de la distancia de la botella desde una posición inicial en relación con la disposición de detección.
- 20 2. La disposición de detección de la reivindicación 1 en la que el LED de referencia tiene una longitud de onda pico de iluminación entre aproximadamente 328 y 470 nm.
3. La disposición de detección de la reivindicación 1 en la que el LED de referencia tiene una longitud de onda pico de iluminación entre aproximadamente 450 y 470 nm.
4. La disposición de detección de la reivindicación 1, en la que la memoria además almacena una relación de calibración entre señales de intensidad para el sensor LED como una función de la distancia de la botella desde la posición inicial y en la que el ordenador compensa una caída en las señales de intensidad desde el sensor LED debido a que la botella está colocada a cierta distancia de la posición inicial de acuerdo con las relaciones de calibración para el sensor LED y el LED de referencia.
- 25 5. Un procedimiento para la detección de sensor colorimétrico (2) incorporado en una botella de hemocultivo (1), el sensor colorimétrico está sujeto a cambios de color debido a cambios en el pH o CO<sub>2</sub> de un medio de muestra dentro de una botella de hemocultivo, el procedimiento comprende las etapas de:
  - proporcionar una botella de hemocultivo que incorpora el sensor colorimétrico;
  - iluminar alternativa y repetidamente el sensor colorimétrico con un sensor LED (4) y un LED de referencia (10);
  - 35 medir la reflectancia del sensor colorimétrico debido a la iluminación del sensor colorimétrico por el sensor LED y el LED de referencia con un fotodetector (5), el fotodetector genera en respuesta señales de intensidad;
  - en el que el LED de referencia se selecciona para que tenga una longitud de onda pico de iluminación de tal manera que las señales de intensidad del fotodetector de iluminación por el LED de referencia no se vean afectadas sustancialmente por cambios en el color del sensor colorimétrico y en el que la longitud de onda pico de iluminación del LED de referencia es inferior a aproximadamente 490 nm;
  - 40 dicho procedimiento comprende además la etapa de almacenar en la memoria del ordenador una relación de calibración entre señales de intensidad para el LED de referencia como una función de la distancia de la botella desde una posición inicial en relación con el sensor LED, el LED de referencia y el fotodetector.
- 45 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el LED de referencia tiene una longitud de onda pico de iluminación entre aproximadamente 328 y 470 nm.
7. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el LED de referencia tiene una longitud de onda pico de iluminación entre aproximadamente 450 y 470 nm.

8. El procedimiento de la reivindicación 5, que comprende además la etapa de almacenar en la memoria del ordenador una relación de calibración entre señales de intensidad para el sensor LED como una función de la distancia de la botella desde una posición inicial en relación con el sensor LED, el LED de referencia y el fotodetector.
- 5 9. El procedimiento de la reivindicación 8, que comprende además la etapa de compensar una caída en las señales de intensidad desde el sensor LED debido a que la botella está colocada a cierta distancia de la posición inicial de acuerdo con las relaciones de calibración para el sensor LED y el LED de referencia.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la etapa de compensación comprende la etapa de determinar un valor de desplazamiento para la botella por el uso de la relación de calibración para el LED de referencia y el uso de la relación de calibración para el sensor LED para ajustar la señal de intensidad del fotodetector para corregir el desplazamiento de la botella por el valor de desplazamiento.
- 10



UNIDADES  
DE REFLECTANCIA

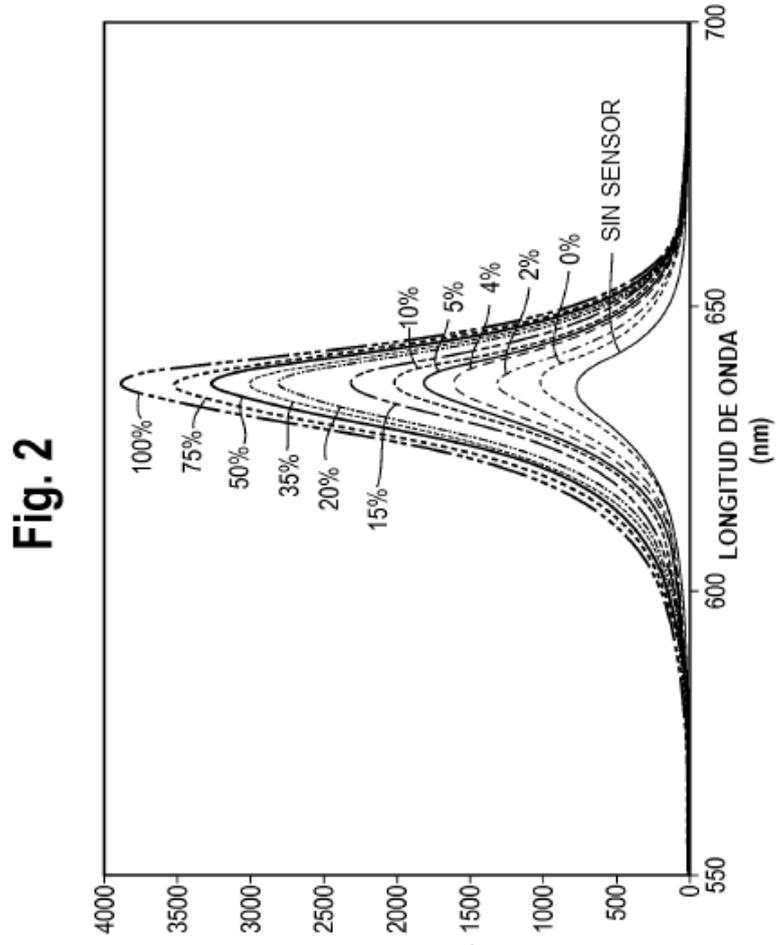


Fig. 3

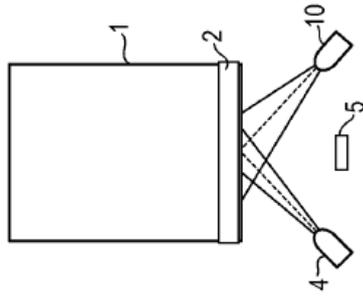
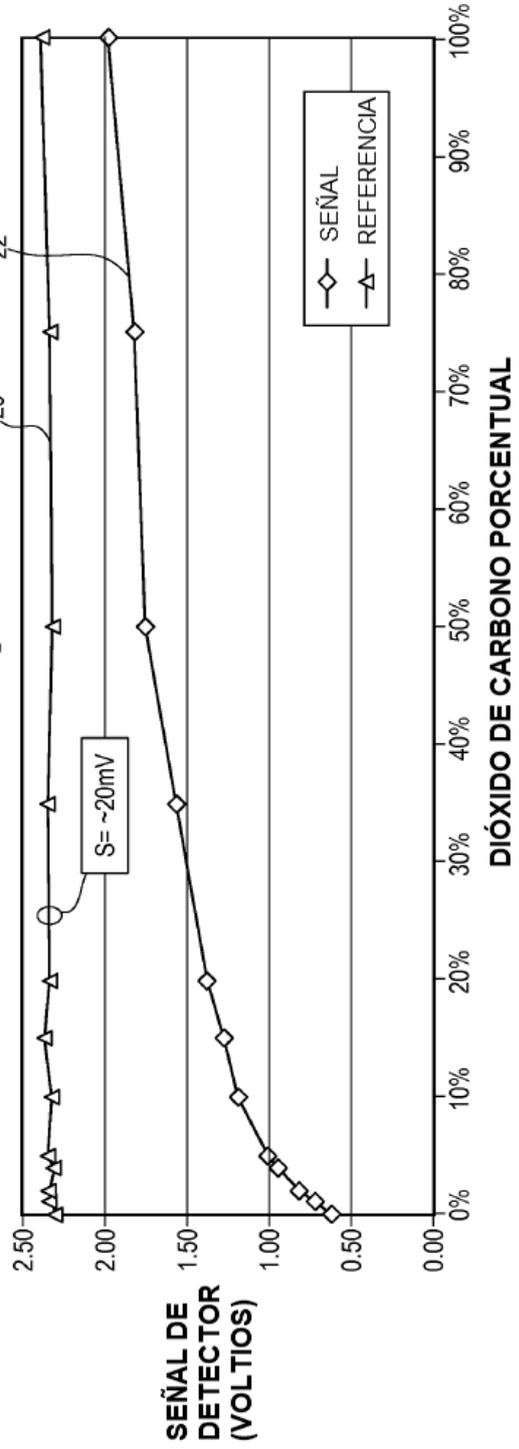


Fig. 4



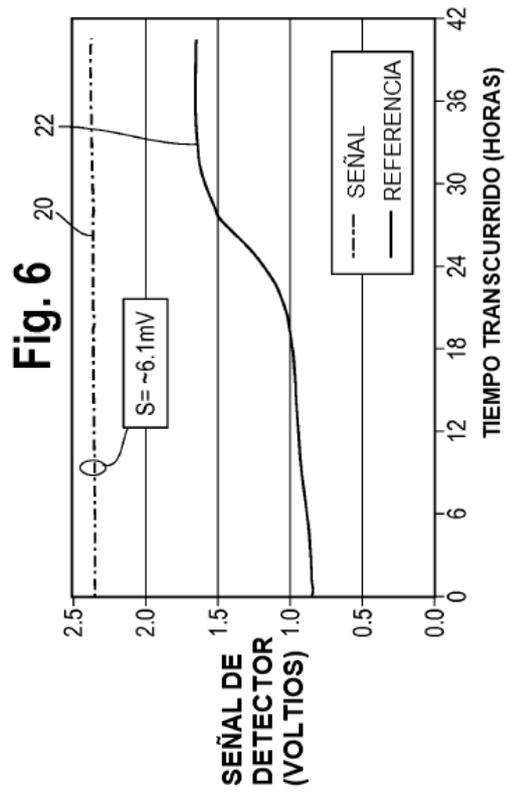
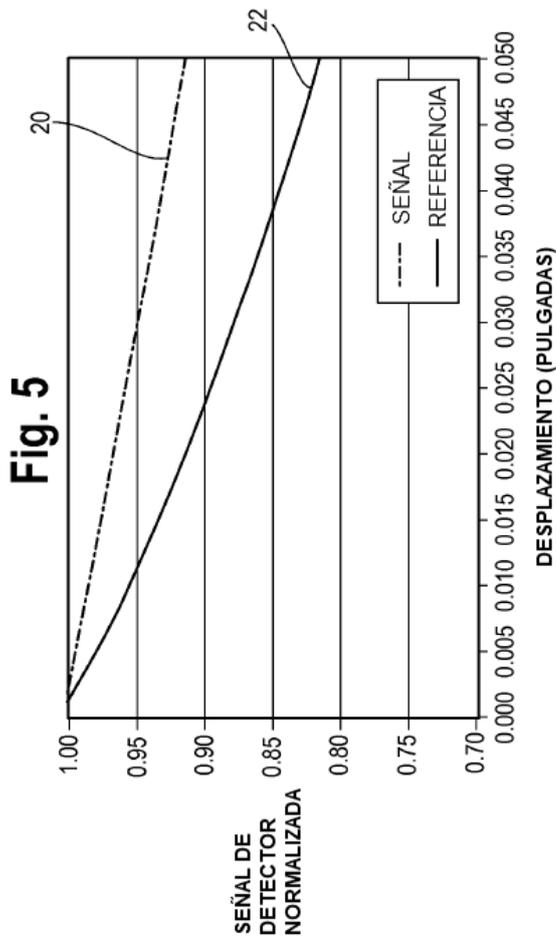


Fig. 7

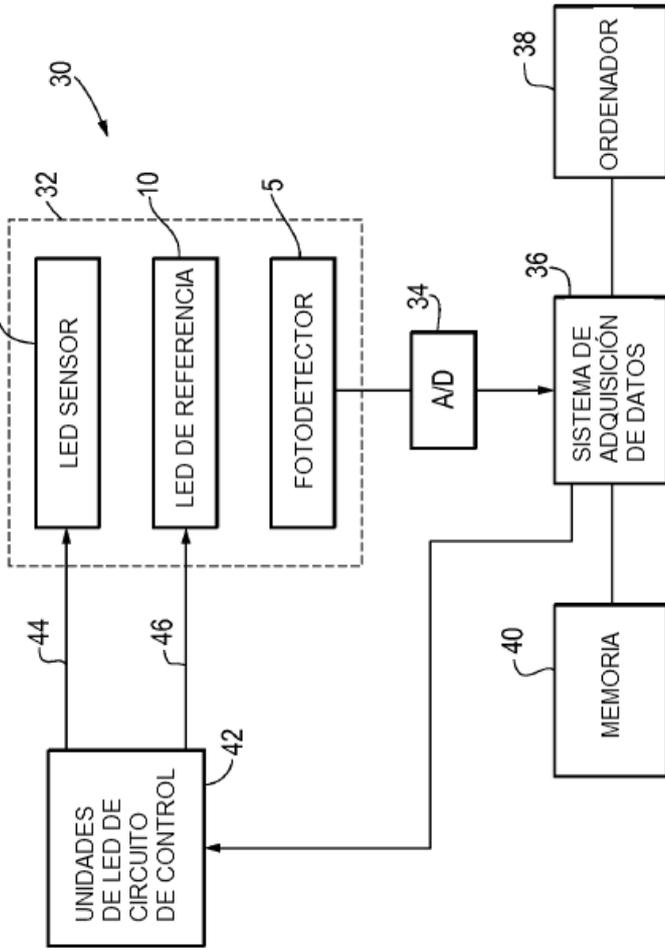


Fig. 8

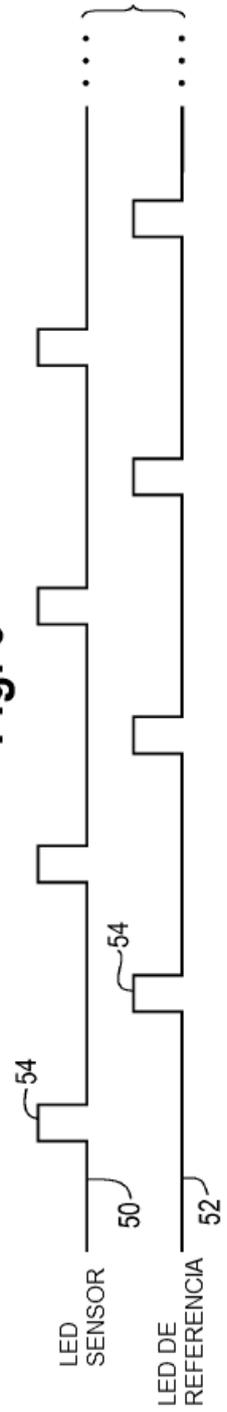


Fig. 9

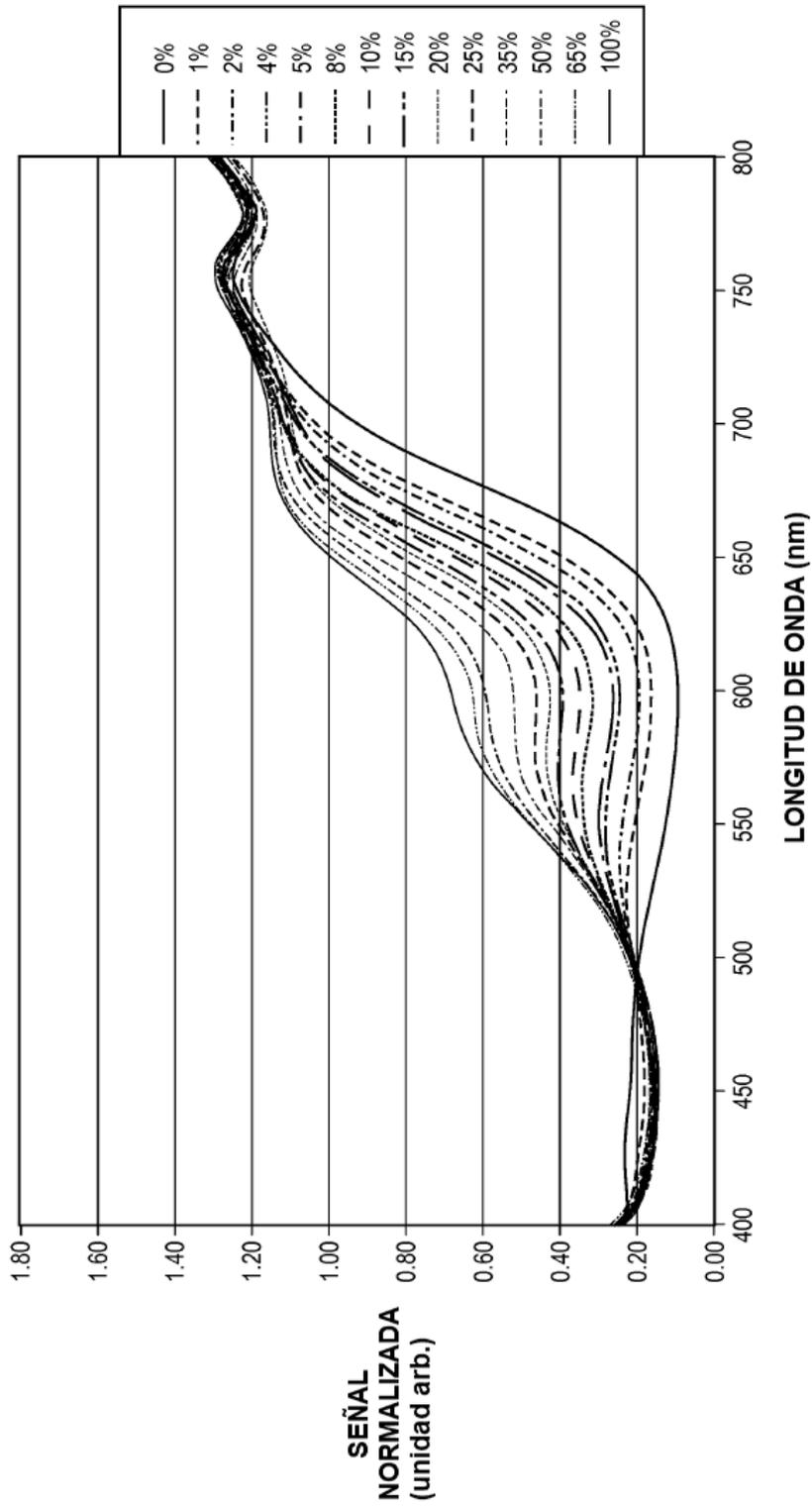


Fig. 10

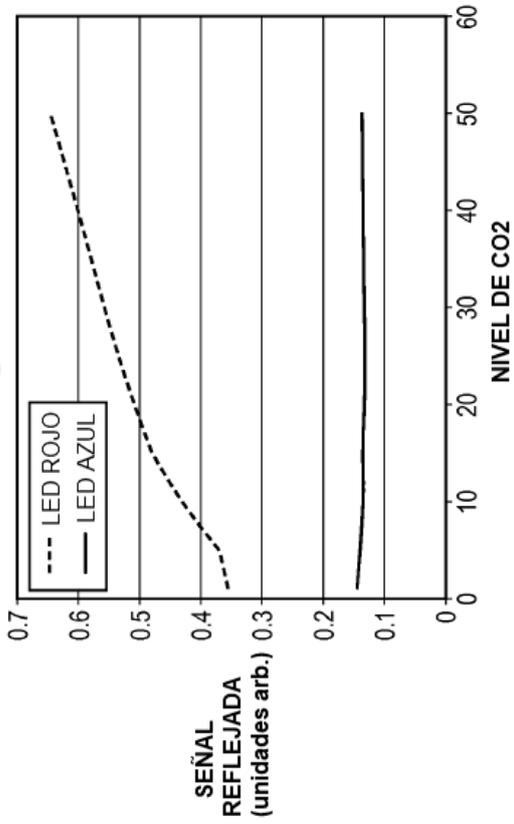
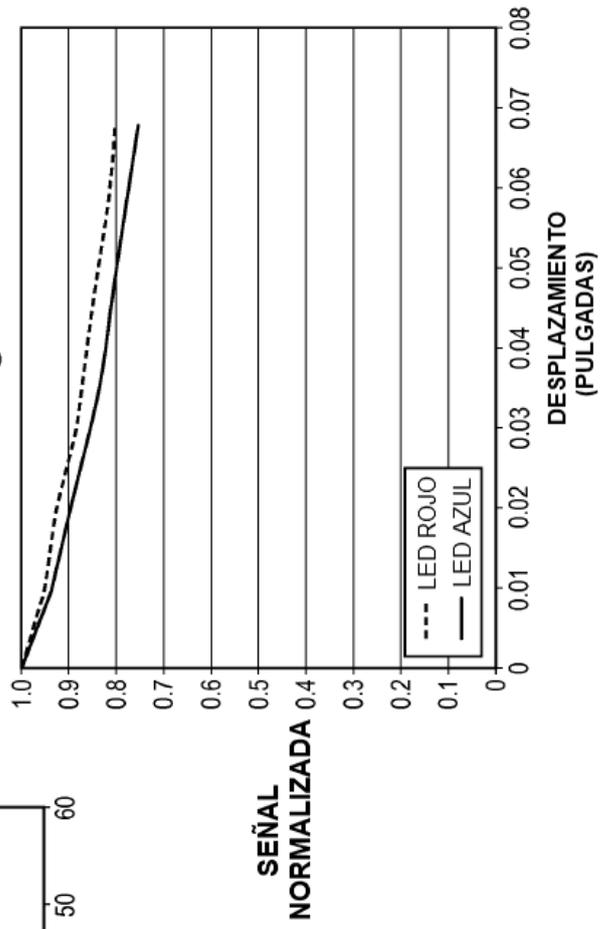


Fig. 11



**Fig. 12**

