

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 694**

51 Int. Cl.:

G01N 21/51 (2006.01)

G01N 21/90 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.08.2005 PCT/US2005/029058**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.03.2006 WO06023470**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2005 E 05786400 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 1779094**

54 Título: **Aparato para la realización de mediciones ópticas en botellas de hemocultivo**

30 Prioridad:

19.08.2004 US 602639 P

19.08.2004 US 602641 P

19.08.2004 US 602655 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.03.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BERNDT, KLAUS, W.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 703 694 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

Aparato para la realización de mediciones ópticas en botellas de hemocultivo

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la Invención:

La presente invención se refiere en general al campo de la detección basada en el crecimiento de microorganismos en recipientes sellables, tales como botellas de hemocultivo. La presente invención se refiere específicamente a un sistema y método para realizar mediciones ópticas en un recipiente sellable que se puede usar para distinguir rápidamente hemocultivos positivos de hemocultivos negativos, y determinar la combinación de volumen de sangre y hematocrito en un recipiente sellable.

Descripción de la técnica relacionada:

15 Normalmente, la presencia de agentes biológicamente activos, como bacterias o micobacterias en el fluido corporal de un paciente se determina utilizando viales de cultivo. Se inyecta una pequeña cantidad de fluido corporal a través del tabique de goma que lo contiene en el vial estéril que contiene un medio de cultivo. El vial se incuba a 37°C y se controla el crecimiento bacteriano. Los métodos conocidos detectan preferiblemente cambios en el contenido de dióxido de carbono de las botellas de cultivo, que es un subproducto metabólico del crecimiento bacteriano. Los cambios en la concentración de dióxido de carbono generalmente se controlan utilizando sensores químicos dispuestos en las paredes internas de las botellas de cultivo. Los sensores químicos responden a los cambios en la concentración de dióxido de carbono cambiando su color o cambiando su intensidad de fluorescencia (ver, por ejemplo, Thorpe et al. "Bact/Alert: Un sistema automatizado colorimétrico de detección de microbios", J. Clin. Microbiol., julio de 1990, págs. 1608-12, y las patentes de EE.UU. nº 4.945.060, 5.217.875, 5.266.486, 5.372.936 y 5.580.784). También se ha sugerido emplear cambios dependientes del dióxido de carbono y/o dependientes del oxígeno en el tiempo de vida de la fluorescencia de los materiales sensores fluorescentes (ver, por ejemplo, las patentes de EE. UU. Números 5.593.854, 5.686.300, 6.074.870 y 6.080.574).

30 Sin embargo, estos y otros métodos conocidos generalmente no tienen en cuenta ciertos factores relevantes para la fiabilidad de la detección. Estos factores incluyen un volumen de sangre suficientemente grande para la detección y la cuestión de cualquier retraso entre la extracción y la detección.

Con respecto al factor del volumen de sangre, para la recuperación oportuna y eficiente de bacterias de muestras de sangre, se ha encontrado que se requiere un volumen de sangre suficientemente grande (ver, por ejemplo, Jonsson et al. "Aspectos teóricos de la detección de bacteriemia como una función del volumen de hemocultivo", APMIS 1993 (101:595-601); Mermel et al. "Detección de bacteriemia en adultos - Consecuencias de cultivar un volumen inadecuado de sangre", Annals Internal Med 1993 (119:270-272); Arpi et al. "Importancia del volumen de sangre cultivada en la detección de bacteriemia", Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1989 (8:838-842); Isaacman et al. "Efecto del número de hemocultivos y el volumen de sangre sobre detección de bacteriemia en niños " J Pediatr 1996 (128:190-195); Li et al. "Efectos del volumen y la periodicidad en los hemocultivos", J Clin Microbiol 1994 (32:2829-2831); Wilson et al. "Evaluación controlada de botellas de hemocultivo anaeróbico estándar Bact / Alert y anaeróbico FAN para la detección de bacteriemia y fungemia", J Clin Microbiol 1995 (33:2265-2270); Wormser et al. "Mejora del rendimiento de hemocultivos en pacientes con enfermedad de Lyme temprana", J Clin Microbiol 1998 (36:296-298); y Shafazand et al. "Hemocultivos en la unidad de cuidados críticos: mejora de la utilización y el rendimiento", Chest 2002 (122:1727-1736)).

50 La necesidad de emplear un gran volumen de sangre en botellas de cultivo surge porque, dependiendo de las especies de microorganismos, la cantidad de unidades formadoras de células por ml de sangre del paciente puede ser muy baja. En la práctica, y dependiendo del estado de un paciente, se utilizan con frecuencia cantidades de sangre más pequeñas que las óptimas, lo que tiene un impacto negativo en la fiabilidad de dichas pruebas.

Hasta este momento, sin embargo, no se ha introducido en el mercado ningún método de rutina para la determinación del volumen de sangre. El pesaje del recipiente de la muestra después de llenar y sustraer un peso promedio se ha utilizado en algunos estudios (ver Mensa et al. "Rendimiento de hemocultivos en relación con el volumen de sangre cultivada en botellas BACTEC 6A", Med Clin (Barcelona) 1997 (108:521-523)). Sin embargo, debido a la variabilidad en el peso de los recipientes individuales, este método de pesaje sufre errores sustanciales, en particular si se trata de un volumen de sangre bajo.

60 Como saben los expertos en la técnica, el metabolismo de la sangre, independientemente de cualquier actividad bacteriana dentro del recipiente, contribuye al aumento observado en el crecimiento de la concentración de dióxido de carbono y, puede, por lo tanto, causar falsos positivos en los resultados de los cultivos. La magnitud de este artefacto depende del volumen de sangre, ya que la magnitud es mayor cuanto mayor es el volumen de sangre. Como consecuencia, se hace un gran esfuerzo hacia la optimización de sofisticados algoritmos de detección en un intento por lograr un tiempo de detección más corto y se evitan falsos positivos en los resultados de los cultivos (ver, por ejemplo, Marchandin et al. "Detección cinética para botellas de hemocultivo positivos utilizando el sistema automatizado VITAL", J Clin Microbiol 1995 (33:2098-2101) y Chapin et al. "Comparación de los sistemas de

hemocultivo BACTEC 9240 y Difco ESP para la detección de organismos de viales cuya entrada se retrasó ", J Clin Microbiol 1996 (34:543-549)).

5 Con respecto al factor de tiempo de retraso, los recipientes de hemocultivo, una vez que se han inoculado con la sangre de un paciente, deben preferiblemente cargarse de inmediato en un sistema de detección de hemocultivo instrumentado. Sin embargo, es bien sabido que con frecuencia se produce un tiempo de retraso sustancial entre el tiempo de la inoculación y el tiempo de incubación en un instrumento. En algunos países, se pueden esperar tiempos de retraso de hasta 48 horas. Este fenómeno de "entrada retrasada del recipiente" puede causar serios problemas si, durante el período de tiempo de retraso, el recipiente de hemocultivo experimenta temperaturas elevadas que ya pueden soportar el crecimiento bacteriano. Como consecuencia, el recipiente ya puede ser "positivo" (es decir, puede contener una población de microorganismos completamente desarrollada), cuando el recipiente llega al instrumento de detección. Por supuesto, no sería aconsejable incubar el recipiente, esperar el equilibrio térmico a 35 grados Celsius, y luego monitorear el recipiente para detectar un crecimiento bacteriano adicional. En cambio, sería de gran ventaja si se pudiera revisar rápidamente la botella entrante para detectar posibles "positividades" y, si ya es positivo, redirigir el recipiente a un instrumento que realice una identificación de microorganismos para que se puedan seleccionar los antibióticos apropiados para el tratamiento del paciente.

20 Además, si un recipiente de hemocultivo "retrasado" ya contiene una población de microorganismos completamente desarrollada en el momento en que llega a un sistema de detección instrumentado, el sensor del sistema no verá una oscilación momentánea típica. Por lo tanto, el sistema solo puede confiar en niveles de señal de detección absolutos. Dependiendo de las características de rendimiento del método de detección, esto representa un desafío mayor que en condiciones de monitoreo típicas, en particular si se esperan botellas de cultivo con cantidades de sangre muy variables.

25 Por consiguiente, existe una necesidad de sistemas y métodos capaces de distinguir rápidamente hemocultivos positivos de hemocultivos negativos y de determinar la combinación del volumen de sangre y el hematocrito de una muestra de sangre después de la extracción del cuerpo humano.

30 El documento US 5.770.394 describe un método y un aparato para detectar bacterias en botellas de hemocultivo con un sensor químico disuelto directamente en el medio de cultivo.

35 El documento US 6.239.869 B1 describe un dispositivo para la detección de impurezas de dispersión difusa en recipientes que tienen una pared transparente con una fuente de luz. La fuente de luz produce uno o más haces de luz para iluminar la pared y un dispositivo de detección óptico produce una imagen de la pared iluminada por detección de campo oscuro.

COMPENDIO DE LA INVENCION

40 El sistema de la invención se define por la reivindicación independiente 1. El método de la invención se define por la reivindicación independiente 18.

45 Según una realización de la presente invención, un aparato realiza mediciones ópticas en un recipiente que comprende una muestra líquida, por ejemplo, una mezcla de medios de crecimiento y sangre. El aparato está equipado con una fuente óptica capaz de dirigir un haz de luz sobre una pared del recipiente en una ubicación predeterminada, de manera que el haz se desvía de una normal a la pared de la botella en la ubicación por un ángulo, generando así una distribución espacial asimétrica de la luz retrodispersada desde cualquier mezcla de medios de crecimiento y sangre en el recipiente cerca de la ubicación, un dispositivo de imágenes para visualizar la distribución espacial de la luz retrodispersada desde la mezcla de medios de crecimiento y sangre en el recipiente cerca de la ubicación, generalmente en un plano, en donde el dispositivo de imágenes está ubicado de manera que los haces de luz reflejados por las interfaces de las paredes externa e interna del recipiente no entren en el dispositivo de imágenes, y un detector de imágenes.

50 En una realización adicional, el detector de imágenes está conectado a un sistema de análisis de datos para extraer características analíticas de la distribución de luz espacial asimétrica, y para proporcionar datos. Dichas características y datos pueden usarse, en un aspecto, para caracterizar el estado de la mezcla de medios de crecimiento y sangre en relación con la presencia o ausencia de una población de microorganismos desarrollados dentro del recipiente sellable, o en relación con la combinación del hematocrito y la cantidad de sangre presente dentro del recipiente sellable.

60 Según una realización adicional de la presente invención, un método para realizar mediciones ópticas en recipientes sellables comprende proporcionar un recipiente que comprende una muestra líquida, dirigiendo un haz de luz sobre una pared del recipiente en una primera ubicación, en donde el haz de luz se desvía desde una normal a la pared del recipiente en la primera ubicación por un primer ángulo, generando así una distribución espacial asimétrica de la luz retrodispersada desde la muestra cerca de la primera ubicación, detectando al menos partes de la distribución espacial asimétrica de la luz retrodispersada generalmente en un plano, mientras que sustancialmente evitando detectar partes de los haces de luz reflejados por las interfaces de las paredes externa e interna del recipiente, y extrayendo características analíticas de la distribución espacial asimétrica de la luz retrodispersada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1A ilustra esquemáticamente la disposición óptica en un primer aparato según una realización de la presente invención que tiene un fotodetector de imágenes;

5 La figura 1B ilustra detalles de la iluminación de una muestra en un aparato según la figura 1;

La figura 1C ilustra una vista detallada de un haz de luz entrante que incide y se refracta a través de la pared de una botella de hemocultivo;

La figura 2A muestra una vista lateral de una presentación de datos tridimensionales (3D) que ilustra una distribución de luz retrodispersada combinada que comprende una distribución de luz retrodispersada

10 espacial asimétrica y un fenómeno de retrodispersión desde un haz de luz entrante generado en una interfaz pared-líquido interna según una realización de la presente invención;

La figura 2B muestra una presentación de datos tridimensionales en perspectiva que ilustra la distribución de luz retrodispersada combinada que comprende la distribución de luz retrodispersada espacial asimétrica y el fenómeno de retrodispersión desde el haz de luz entrante generado en una interfaz pared-líquido interna

15 según una realización de la presente invención;

La figura 2C ilustra, como una línea discontinua, las ubicaciones dentro de un hemocultivo líquido donde un primer grupo de fotones son retrodispersados, para el caso donde un haz de luz entrante coincide con la normal a la pared de vidrio en la ubicación del impacto según una realización de la presente invención;

La figura 2D ilustra, como una línea discontinua, las ubicaciones dentro de un hemocultivo líquido donde un primer grupo de fotones se retrodispersados, para el caso donde un haz de luz entrante se desvíe de la normal a la pared de vidrio en la ubicación del impacto por un ángulo Ω según una realización de la presente invención;

La figura 2E es una gráfica del número de fotones, Y, que experimenta un primer evento de retrodispersión, versus la distancia de proyección, X a lo largo de la interfaz pared-líquido interna para el ejemplo retrodispersado ilustrado en la figura 2C;

25 La figura 2F es una gráfica del número de fotones, Y, que experimenta un primer evento de retrodispersión, versus la distancia de proyección, X a lo largo de la interfaz pared-líquido interna para el ejemplo retrodispersado como se ilustra en la figura 2D;

La figura 3A ilustra esquemáticamente la disposición óptica en un segundo aparato según una realización de la presente invención que tiene un fotodetector en movimiento;

30 La figura 3B ilustra esquemáticamente un aparato de medición óptica de hemocultivo completo según una realización de la presente invención;

La figura 4 es una gráfica que ilustra múltiples grabaciones de la distribución espacial de la luz retrodispersada en una botella de hemocultivo según una realización de la presente invención;

35 La figura 5 es un gráfico que ilustra varias características gráficas distintas en una distribución de luz espacial registrada que son adecuadas para el análisis de datos según una realización de la presente invención;

La figura 6 es un gráfico que ilustra los mismos datos que en la figura 5, pero en una representación semi-logarítmica;

La figura 7A-7C son gráficos que ilustran la intensidad en el punto de impacto de la luz versus el tiempo, la medición de la amplitud máxima en la mitad del máximo de la intensidad versus el tiempo y la pendiente del gráfico de la intensidad versus la posición X versus el tiempo, respectivamente, para dos botellas de hemocultivo, una primera botella de hemocultivo que contiene una muestra de control de sangre de 1 ml y una segunda botella de hemocultivo que contiene 1 ml de sangre con E-coli, durante un período de aproximadamente 144 horas;

45 Las figuras 8A-8C son gráficos que ilustran los mismos parámetros de las figuras 7A-7C, pero para una primera botella de hemocultivo que contiene 5 ml de sangre y una segunda botella de hemocultivo que contiene 5 ml de sangre con E coli;

Las figuras 9A-9C son gráficos que ilustran los mismos parámetros de las figuras 7A-7C, pero para una primera botella de hemocultivo que contiene 10 ml de sangre y una segunda botella de hemocultivo que contiene 10 ml de sangre con E coli;

50 La figura 10 es una gráfica que ilustra múltiples grabaciones de la distribución espacial de la luz retrodispersada en botellas de hemocultivo llenas de cantidades variables de sangre entre 0,5 ml y 10 ml;

La figura 11 es un gráfico que ilustra los mismos datos que en la figura 4, pero en representación semi-logarítmica;

55 La figura 12 es una gráfica que ilustra la pendiente versus el volumen de sangre según lo medido en doce botellas de cultivo llenas de sangre de tres valores de hematocrito diferentes;

La figura 13 es una gráfica que ilustra la pendiente versus el producto del volumen de sangre y el hematocrito según lo medido en doce botellas de cultivo llenas de sangre de tres valores de hematocrito diferentes;

La figura 14 es una gráfica que ilustra los datos de la figura 10, pero con flechas dobles agregadas que indican el rango de incertidumbre en la determinación del volumen de llenado solo;

60 La figura 15 es un gráfico que ilustra la intensidad de retrodispersión medida para el punto de impacto del láser versus el volumen de sangre, según se determina en doce botellas de cultivo llenas de sangre de tres valores de hematocrito diferentes;

La figura 16 es un gráfico que ilustra la intensidad de retrodispersión medida en el punto de impacto del láser versus el producto del volumen de sangre y el hematocrito según lo medido en doce botellas de cultivo llenas de sangre de tres valores diferentes de hematocrito;

65

La figura 17 es una gráfica que ilustra el valor de las integrales sobre las grabaciones de la distribución espacial de la luz retrodispersada como se muestra en la figura 4 en doce botellas de hemocultivo llenas de cantidades variables de sangre;

La figura 18 es un gráfico que ilustra la inversa de la amplitud máxima en la mitad del máximo ("1/AMMM") de las grabaciones de la distribución espacial de la luz retrodispersada en doce botellas de hemocultivo versus el producto del volumen de sangre y hematocrito;

La figura 19 es un gráfico que ilustra la inversa de la distancia a lo largo del eje X entre el punto de impacto del láser, PIL, que se muestra en la figura 42, y el máximo, MAX, de las grabaciones de la distribución espacial de la luz retrodispersada en botellas de hemocultivo versus el producto de volumen de sangre y hematocrito;

La figura 20 es un gráfico que ilustra la intensidad en el punto de impacto de la luz versus el tiempo para una primera botella de hemocultivo que contiene una muestra de control de 1 ml de sangre fresca y una segunda botella de hemocultivo que contiene una muestra de sangre de 1 ml y un cultivo desarrollado de E coli durante un período de tiempo de aproximadamente 5 días;

La figura 21 es una gráfica que ilustra la amplitud máxima en la mitad del máximo (AMMM) de la distribución espacial de la luz retrodispersada versus el tiempo para una primera botella de hemocultivo que contiene una muestra de control de 1 ml de sangre fresca y una segunda botella de hemocultivo que contiene una muestra de sangre de 1 ml y un cultivo desarrollado de E coli durante un período de tiempo de aproximadamente 5 días;

La figura 22 es un gráfico que ilustra la pendiente de la distribución espacial de la luz retrodispersada versus el gráfico de tiempo a lo largo del tiempo para una primera botella de hemocultivo que contiene una muestra de control de 1 ml de sangre fresca y una segunda botella de hemocultivo que contiene una muestra de 1 ml de sangre y un cultivo desarrollado de E coli durante un período de tiempo de aproximadamente 5 días;

La figura 23 es una gráfica que ilustra varias características gráficas distintas en una distribución de luz espacial registrada que son adecuadas para el análisis de datos según una realización de la presente invención;

La figura 24 es un gráfico que ilustra los mismos datos que en la figura 23, pero en representación semi-logarítmica;

La figura 25 es un gráfico que ilustra la intensidad en el punto de impacto de la luz versus el tiempo para una primera botella de hemocultivo que contiene una muestra de control de 5 ml de sangre fresca y una segunda botella de hemocultivo que contiene una muestra de sangre de 5 ml y un cultivo desarrollado de E coli durante un período de tiempo de aproximadamente 5 días;

La figura 26 es una gráfica que ilustra la amplitud máxima en la mitad del máximo (AMMM) de la distribución espacial de la luz retrodispersada versus el tiempo para una primera botella de hemocultivo que contiene una muestra de control de 5 ml de sangre fresca y una segunda botella de hemocultivo que contiene una muestra de 5 ml de sangre y un cultivo desarrollado de E coli durante un período de tiempo de aproximadamente 5 días;

La figura 27 es un gráfico que ilustra la pendiente de la distribución espacial de la luz retrodispersada versus el gráfico del tiempo a lo largo del tiempo para una primera botella de hemocultivo que contiene una muestra de control de 5 ml de sangre fresca y una segunda botella de hemocultivo que contiene una muestra de 5 ml de sangre y un cultivo desarrollado de E coli durante un período de tiempo de aproximadamente 5 días;

La figura 28 es un gráfico que ilustra la intensidad en el punto de impacto de la luz versus el tiempo para una primera botella de hemocultivo que contiene una muestra de control de 10 ml de sangre fresca y una segunda botella de hemocultivo que contiene una muestra de sangre de 10 ml y un cultivo desarrollado de E coli durante un período de tiempo de aproximadamente 5 días;

La figura 29 es una gráfica que ilustra la amplitud máxima en la mitad del máximo (AMMM) de la distribución espacial de la luz retrodispersada versus el tiempo para una primera botella de hemocultivo que contiene una muestra de control de 10 ml de sangre fresca y una segunda botella de hemocultivo que contiene una muestra de sangre de 10 ml y un cultivo desarrollado de E coli durante un período de tiempo de aproximadamente 5 días;

La figura 30 es una gráfica que ilustra la pendiente de la distribución espacial de la luz retrodispersada versus el gráfico del tiempo a lo largo del tiempo para una primera botella de hemocultivo que contiene una muestra de control de 10 ml de sangre fresca y una segunda botella de hemocultivo que contiene una muestra de sangre de 10 ml y un cultivo desarrollado de E coli durante un período de tiempo de aproximadamente 5 días;

La figura 31 es un gráfico que ilustra el cambio en la distribución de la retrodispersión para una botella de hemocultivo negativa (es decir, una botella de hemocultivo de control) que se convierte en una botella de hemocultivo con un cultivo de E coli completamente desarrollado para 10 ml de sangre fresca;

La figura 32 es un gráfico bidimensional (2D) que ilustra el AMMM versus la intensidad de retrodispersión en el punto de impacto de la luz (IEPIL) para seis botellas de hemocultivo, una primera (botella de control) que contiene 1 ml de sangre fresca, una segunda que contiene 1 ml de sangre y un cultivo desarrollado de E coli, una tercera (botella de control) que contiene 5 ml de sangre fresca, una cuarta que contiene 5 ml de sangre y un cultivo desarrollado de E coli, una quinta (botella de control) que contiene 10 ml de sangre fresca y una sexta que contiene 10 ml de sangre y un cultivo desarrollado de E coli, registrado durante un período de tiempo de aproximadamente 6 días;

La figura 33 es un gráfico 2D que ilustra la PE versus la IEPIL para seis botellas de hemocultivo, una primera (botella de control) que contiene 1 ml de sangre fresca, una segunda que contiene 1 ml de sangre y un cultivo

desarrollado de E coli, una tercera (botella de control) conteniendo 5 ml de sangre fresca, una cuarta que contiene 5 ml de sangre y un cultivo desarrollado de E coli, una quinta (botella de control) que contiene 10 ml de sangre fresca y una sexta que contiene 10 ml de sangre y un cultivo desarrollado de E coli, registrado durante un tiempo período de aproximadamente 6 días;

La figura 34 es un gráfico tridimensional (3D) que ilustra la PE versus el AMMM versus la IEPIL para seis botellas de hemocultivo, una primera (botella de control) que contiene 1 ml de sangre fresca, una segunda que contiene 1 ml de sangre y un cultivo desarrollado de E coli, una tercera (botella de control) que contiene 5 ml de sangre fresca, una cuarta que contiene 5 ml de sangre y un cultivo desarrollado de E coli, una quinta (botella de control) que contiene 10 ml de sangre fresca y una sexta que contiene 10 ml de sangre y un cultivo desarrollado de E coli, registrado durante un período de tiempo de aproximadamente 6 días;

La figura 35 ilustra las mediciones de una característica analítica procesada Q5 de la distribución de retrodispersión para cuatro botellas de hemocultivo, una primera (botella de control) que contiene 5 ml de sangre fresca, una segunda que contiene 5 ml de sangre con cultivos desarrollados de E coli, una tercera (botella de control) que contiene 10 ml de sangre fresca y una cuarta que contiene 10 ml de sangre con cultivos desarrollados de E coli, durante un período de tiempo de aproximadamente 6 días;

La figura 36 ilustra un segundo conjunto de mediciones de la característica analítica procesada Q5 de la distribución de retrodispersión para seis botellas de hemocultivo, una primera (botella de control) que contiene 1 ml de sangre fresca, una segunda que contiene 1 ml de sangre con cultivos desarrollados de E coli, una tercera (botella de control) que contiene 5 ml de sangre fresca, una cuarta que contiene 5 ml de sangre con cultivos desarrollados de E coli, una quinta (botella de control) que contiene 10 ml de sangre fresca y una sexta que contiene 10 ml de sangre con cultivos desarrollados de E coli, durante un período de tiempo de aproximadamente 6 días;

La figura 37 es un gráfico que ilustra los valores medios del parámetro de post-proceso Q5 de la distribución de retrodispersión para seis botellas de hemocultivo, una primera (botella de control) que contiene 1 ml de sangre fresca, una segunda que contiene 1 ml de sangre con cultivos desarrollados de E coli, una tercera (botella de control) que contiene 5 ml de sangre fresca, una cuarta que contiene 5 ml de sangre con cultivos desarrollados de E coli, una quinta (botella de control) que contiene 10 ml de sangre fresca y una sexta que contiene 10 ml de sangre con cultivos desarrollados de E coli e incluyen además líneas discontinuas que representan una extrapolación hacia 15 ml de sangre para las muestras de control y las muestras que contienen sangre con cultivos desarrollados de E coli;

La figura 38 es un diagrama de flujo que ilustra un método que determina la presencia o ausencia de una población de microorganismos desarrollados según una realización de la presente invención;

La figura 39 es un gráfico 3D que ilustra los valores medios de 6 días de una característica analítica IEPIL y las características analíticas procesadas P1 y Q1 según una realización de la presente invención; y

La figura 40 es un gráfico 2D que ilustra el parámetro de post-procesamiento Q5 de la distribución de retrodispersión versus el tiempo para una serie de botellas de hemocultivo de control y botellas que contienen muestras de sangre con E coli desarrollado, S epidermidis y estreptococos del Grupo B para diversas cantidades desde 2 a 12 ml, durante un período de tiempo de aproximadamente seis días;

La figura 41 ilustra esquemáticamente un aparato según una realización de la presente invención similar al aparato de la figura 1A, pero con un dispositivo de imágenes en forma de una matriz de fibras ópticas;

La figura 42 ilustra esquemáticamente un aparato según una realización de la presente invención similar al aparato de la figura 41, pero con una fibra óptica para dirigir la luz sobre el hemocultivo;

La figura 43A ilustra una modificación del aparato de medición óptica de hemocultivo según una realización de la presente invención;

La figura 43B ilustra una vista detallada del aparato de la figura 43A;

La figura 44A ilustra un tercer aparato de medición óptica de hemocultivo para practicar el método según una realización de la presente invención que tiene dos fotodetectores para medir la intensidad de luz re-emergiendo de la botella de hemocultivo en dos ubicaciones diferentes;

La figura 44B ilustra un diagrama de bloques esquemático de un sistema de medición óptica de hemocultivo para practicar el método según una realización de la presente invención que tiene dos fotodetectores dispuestos en dos ubicaciones en la botella de hemocultivo; y

La figura 45 es un gráfico que ilustra datos que representan la relación de intensidad medida en el aparato ilustrado en las figuras 44A y 44B, por lo que los dos fotodetectores se colocaron lejos del punto de impacto del láser en posiciones angulares de aproximadamente 90 grados y aproximadamente 135 grados a lo largo de la circunferencia de la botella.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Ahora se describirán en detalle varias realizaciones de la presente invención con referencia a los dibujos adjuntos. En los dibujos, los elementos iguales o similares se denotan con los mismos números de referencia, aunque se representen en dibujos diferentes.

El aparato para realizar mediciones ópticas en recipientes sellables que incluyen hemocultivos, según una realización de la presente invención, incluye un recipiente que contiene una muestra líquida, típicamente un recipiente sellable, y típicamente un recipiente cilíndrico que contiene una mezcla de medios de crecimiento y sangre. En una realización preferida, el recipiente sellable es una botella de hemocultivo. Para realizar una medición, es ventajoso dar la vuelta al recipiente dos o tres veces para generar una suspensión homogénea. La suspensión es

entonces sustancialmente estable durante un período prolongado de tiempo, como un cuarto de hora o incluso más. Los medios de hemocultivo avanzados pueden contener perlas de resina que absorben los antibióticos. En este caso, se prefiere un período de espera de unos segundos después de girar una botella antes de realizar cualquier medición. Este corto período de tiempo es suficiente para que las perlas se asienten. El recipiente es ópticamente transparente a la longitud de onda de la luz utilizada.

En una realización, el aparato para realizar mediciones ópticas incluye una fuente óptica adaptada para dirigir un haz de luz sobre la pared del recipiente. El haz de luz se desvía de una normal a la pared del recipiente por un cierto ángulo, generando una distribución espacial asimétrica de la luz retrodispersada del líquido en el recipiente cerca de la ubicación conocida. El aparato de esta realización incluye además un dispositivo de imágenes para visualizar la distribución espacial de la luz retrodispersada de la mezcla de medios de crecimiento y sangre en la botella cerca de la ubicación conocida, típicamente en un plano. El dispositivo de imágenes está ubicado ventajosamente de modo que los haces de luz reflejados por las interfaces de las paredes externa e interna de la botella no entren en el dispositivo de imágenes.

El aparato según una realización de la presente invención incluye además un fotodetector en el plano, adecuado para registrar al menos partes de la distribución espacial de imágenes de la luz retrodispersada. El fotodetector está típicamente conectado con un sistema de análisis de datos para extraer características analíticas de la distribución de luz espacial asimétrica, y para proporcionar datos. Las características y los datos pueden ser útiles para caracterizar el estado de la mezcla de medios de crecimiento y sangre en relación con la presencia o ausencia de una población de microorganismos desarrollados dentro del recipiente, o en relación con la combinación del hematocrito y la cantidad de sangre presente en el interior de la botella.

La figura 1A ilustra esquemáticamente la disposición óptica de un aparato según una realización de la presente invención que tiene un detector de imágenes. El término "detector de imágenes" se refiere a cualquier fotodetector, o sus equivalentes, adecuado para registrar una distribución de luz espacial unidimensional o bidimensional.

En la figura 1A, se muestra una botella (1) de hemocultivo que contiene una interfaz (2) aire-pared externa, una interfaz (3) pared-líquido interna, un tabique (4) de goma típico y la suspensión líquida (5) de hemocultivo (por ejemplo, una mezcla de medios de crecimiento y sangre). La fuente óptica (6) dirige un haz de luz (7) hacia una lente (8) que enfoca el haz de luz (7) en un punto pequeño en la interfaz (2) aire-pared en un punto de impacto (9) del haz primario. En el punto de impacto (9) del haz primario, el haz de luz (7) se refracta hacia un punto en la interfaz (3) pared-líquido interna. El punto en la interfaz (3) pared-líquido interna donde el haz de luz (7) refractado golpea es el punto de impacto (11) del haz secundario. En el punto de impacto (11) del haz secundario, el haz de luz (7) se refracta nuevamente a la suspensión líquida (5), en donde los fotones transportados por el haz de luz (7) experimentan múltiples eventos de dispersión y absorción, lo que resulta en una distribución espacial de fotones retrodispersados que son re-emitidos por la suspensión líquida (5). Dentro de la intensidad y distribución de la distribución espacial de los fotones retrodispersados, se puede extraer información sobre el contenido de la suspensión líquida (5).

Según esta realización, cerca de la distribución espacial de fotones retrodispersados que son reemitidos por la suspensión líquida (5) se encuentran un dispositivo de imágenes (12) y un fotodetector (13). El dispositivo de imágenes (12) puede ser, por ejemplo, una lente simple, una lente cilíndrica, una lente objetivo o una matriz de fibras ópticas en las que las entradas de fibra se colocan cerca de la interfaz de la pared externa de la botella, y las salidas de fibra de dicho conjunto están cerca del lector DCA (24). Dicha disposición de fibra óptica se denomina frecuentemente "configuración de enfoque de proximidad. Otros dispositivos de enfoque de luz que operan de una manera sustancialmente similar también se pueden usar en lugar del dispositivo de imágenes (12). El dispositivo de imágenes (12) genera una imagen de la distribución de la luz espacial en un plano de imagen, donde el fotodetector (13), adecuado para registrar al menos partes de la distribución espacial de la imagen de la luz retrodispersada, se coloca. El fotodetector (13) puede ser, por ejemplo, una cámara optoelectrónica, una cámara 2D digital, una matriz de dispositivos de carga acoplada (DCA) bidimensional (2D), una matriz DCA lineal o puede ser un fotodetector "sin imágenes" que se mueve a lo largo de un eje para registrar al menos partes de la distribución de luz. Alternativamente, el fotodetector (13) puede ser un fotodetector estacionario "sin imágenes", en el que un dispositivo de imágenes (12) se mueve a lo largo de un eje para registrar partes de la distribución de la luz. También se pueden usar otros dispositivos de medición y captación de luz que funcionan sustancialmente de la misma manera en lugar del fotodetector (13).

Como se ilustra en las figuras 1A y 1B, el haz de luz (7) se dirige hacia la pared de la botella (1) de hemocultivo de tal manera que el haz de luz (7) se desvía de una normal (10) a la pared de la botella en el punto de impacto (9) del haz primario por un cierto ángulo. El haz de luz (7) puede orientarse de manera que se propague dentro de un plano sustancialmente perpendicular al eje de simetría de la botella. El haz de luz (7) también puede orientarse de manera que se propague dentro de un plano sustancialmente paralelo al eje de simetría de la botella. Estas dos orientaciones del haz producen una distribución de luz espacial sustancialmente regular que facilita el posterior análisis de datos. También son posibles otras orientaciones del haz, siempre que el haz de luz (7) se desvíe de la normal a la pared de la botella en la ubicación del punto de impacto (9) del haz primario en un ángulo conocido. En la configuración mostrada en la figura 1A, el punto de impacto (9) del haz primario en el cual el haz de luz (7) incide

en la botella (1) está en una parte cilíndrica de la botella. En realizaciones alternativas de la presente invención, sin embargo, el haz de luz (7) también puede dirigirse hacia una parte no cilíndrica de la botella (1) (por ejemplo, la parte del cuello cónico de la botella (1)), o hacia la parte inferior de botella (1).

5 En el aparato de la figura 1A, el haz de luz (7) se dirige hacia la parte cilíndrica de la botella y está orientado de manera que se propaga dentro de un plano sustancialmente perpendicular al eje de simetría de la botella. En esta realización, el ángulo θ entre el haz de luz (7) y la normal (10) a la pared de la botella es de aproximadamente 45 grados. Los ángulos entre cero y 90 grados son posibles, pero en una realización de la presente invención, el ángulo θ oscila entre aproximadamente 25 grados y aproximadamente 45 grados. En otra realización de la presente
10 invención, el ángulo θ es de aproximadamente 35 grados.

Hay varias razones por las que el haz de luz (7) no se dirige, de manera ventajosa, en ángulo recto a la pared de la botella de hemocultivo. Primero, el haz de luz (7), cuando se encuentra con la interfaz aire-pared en el punto de impacto (9) del haz primario, genera una fuerte reflexión hacia atrás debido a la diferencia en el índice de refracción entre el aire y cualquier material de pared de la botella. Al utilizar un ángulo θ no cero, el dispositivo de imágenes (12) se puede colocar de manera que el haz de luz (14) reflejado por la interfaz de la pared externa de la botella en el punto de impacto (9) del haz primario no entre en el dispositivo de imágenes (12). Lo mismo se aplica a una segunda reflexión posterior que se origina en la interfaz (3) de la pared interna del líquido en el punto de impacto (11) del haz secundario. Esta segunda reflexión posterior es menos intensiva que la reflexión posterior desde la interfaz (2) aire-pared externa, ya que la diferencia en el índice de refracción entre cualquier material de pared de la botella y la muestra de hemocultivo líquido es menor.

Una segunda razón para dirigir el haz de luz (7) en un ángulo oblicuo sobre la pared de la botella es que no solo el haz de luz (14) reflejado crea un reflejo especular que se origina en el punto de impacto (9) del haz primario, sino también un fenómeno de retrodispersión impredecible (retrodispersión) (26) como se ilustra en la figura 1B. Esta retrodispersión (26) tiene su origen en pequeñas imperfecciones en la interfaz (2) aire-pared externa de la botella (1), como grietas pequeñas o incluso impurezas como huellas dactilares y polvo. La imprevisibilidad significa que su intensidad variará ampliamente, incluso entre múltiples grabaciones en la misma botella. La retrodispersión (26) se genera en una región cónica relativamente amplia y, en consecuencia, ingresa al dispositivo de imágenes (12), lo que provoca señales de error similares a picos en el fotodetector (13). Si el haz de luz (7) se dirige a una incidencia normal en la botella (1), la señal de error similar a un pico se registraría muy cerca del centro de la distribución espacial de fotones retrodispersados que representan las señales de interés. Esta región, que contiene información valiosa sobre el estado de la suspensión líquida (5), se vería muy afectada por la señal de error similar a un pico, y no sería posible realizar mediciones confiables.

Dirigir el haz de luz (7) sobre la pared de la botella bajo un ángulo oblicuo supera sustancialmente el problema discutido anteriormente. Como se ilustra esquemáticamente en la figura 1B, el haz de luz (7) que llega a un ángulo en la interfaz (3) pared-líquido interna en la ubicación (11) causa una distribución (15) de luz de retrodispersión espacial asimétrica que muestra un pico (17), un flanco (18) de decaimiento lento en el lado alejado del haz de luz (7) entrante, y un flanco (27) de decaimiento rápido en el lado del haz de luz (7) entrante. Significativamente, la retrodispersión (26), que se genera en la interfaz de la pared externa en el punto de impacto (9) del haz primario se detecta mediante un dispositivo de imágenes (12) y un fotodetector (13) orientado a lo largo de la dirección (16) y posicionado en el borde de la distribución (15) de luz de retrodispersión espacial asimétrica. La distribución (15) de luz retrodispersada espacial asimétrica y la retrodispersión (26) se combinan para formar la distribución de luz (200) retrodispersada combinada que se describe con mayor detalle a continuación.

La retrodispersión (26) se detecta en una posición en el lado del flanco (27) de decaimiento rápido de la distribución (15) de retrodispersión espacial asimétrica, es decir, hacia la dirección del haz de luz (7) entrante. En consecuencia, el pico (17), el flanco (18) de decaimiento lento y el flanco (27) de decaimiento rápido no son perturbados por la retrodispersión (26), y se pueden realizar mediciones confiables. Esta situación se ilustra con más detalle en las figuras 2A y 2B.

La figura 2A muestra una vista lateral de una presentación de datos 3D que ilustra una distribución de luz (200) retrodispersada combinada que comprende una distribución (15) de luz de retrodispersión asimétrica generada en la interfaz (3) pared-líquido interna y una retrodispersión (26) estrecha con un pico (30) del haz de luz (7) entrante generado en la interfaz (2) aire-pared externa. La figura 2B muestra una presentación de datos 3D en perspectiva que ilustra la misma distribución de luz (200) retrodispersada combinada como se muestra en la figura 2A. Como se puede ver en las figuras 2A y 2B, la retrodispersión (26) de la figura 1B está lo suficientemente alejada de la distribución (15) de luz asimétrica de la retrodispersión para que no se vea afectado su análisis.

Una tercera razón para dirigir el haz de luz (7) hacia la pared de la botella bajo un ángulo oblicuo se ilustra en las figuras 2C, 2D, 2E y 2F. La figura 2C ilustra, como una línea discontinua (29A), las ubicaciones dentro de la suspensión líquida (5) desde donde los primeros fotones son retrodispersados, en este caso cuando el haz de luz (7) entrante coincide con la normal a la pared de vidrio de la botella (1) en el punto de impacto (9) del haz primario y el punto de impacto (11) del haz secundario en la interfaz (3) pared-líquido interna. El dispositivo de imágenes (12) y el fotodetector (13) en la figura 1A, en este caso, recibirían fotones de retrodispersión que tienen sus raíces en los

5 primeros fotones de retrodispersión que están ubicados en la misma posición X a lo largo de la pared de la botella en la figura 2C. La figura 2E muestra esquemáticamente el número de fotones, Y, que experimentan un primer evento de retrodispersión, versus la proyección X a lo largo de la interfaz pared-líquido para la situación como se ilustra en la figura 2C. La distribución de luz registrada de la figura 2E muestra una curva sólida que corresponde a un volumen de sangre alto y una curva discontinua que corresponde a un volumen de sangre bajo.

10 En contraste con el caso de la incidencia normal, la figura 2D ilustra las ubicaciones dentro de la suspensión líquida (5) desde donde los primeros fotones son retrodispersados como una línea discontinua (29B). En esta configuración, el haz de luz (7) entrante se desvía de la normal a la pared de vidrio en el punto de impacto (9) del haz primario en un ángulo θ . Como un experto en la técnica puede apreciar, el haz de luz (7) llega a la interfaz (2) pared-aire externa en un ángulo θ y se refracta en la pared de la botella en un ángulo diferente de acuerdo con la ley de Snell para la refracción de la luz. Por lo tanto, el haz de luz (7) llega a la interfaz (3) pared-líquido interna en un ángulo Ω , que es más pequeño que θ , pero depende de él. La figura 1C ilustra la relación entre los ángulos θ y Ω , el haz de luz (7) entrante y la normal (10) a la pared de la botella. El dispositivo de imágenes (12) y el fotodetector (13) en la figura 1A reciben fotones de retrodispersión que tienen sus raíces en los primeros fotones retrodispersados que se ubican en múltiples posiciones X a lo largo de la pared de la botella en la interfaz (3) pared-líquido interna como se muestra en la figura 2D. La figura 2F muestra esquemáticamente la cantidad de fotones Y que experimentan un primer evento de retrodispersión, versus la proyección, X, a lo largo de la interfaz (3) pared-líquido interna para la situación como se ilustra en la figura 2D. Nuevamente, la curva sólida en la figura 2F corresponde a un volumen de sangre alto, y la curva discontinua corresponde a un volumen de sangre bajo. Para un volumen de sangre alto, se producen más eventos de dispersión por unidad de longitud. En consecuencia, se observa una alta intensidad de retrodispersión cerca del punto de impacto (11) del haz secundario en la interfaz (3) pared-líquido interna, pero la intensidad de retrodispersión decae relativamente rápido al aumentar la distancia en la dirección X desde el punto de impacto (11) del haz secundario debido a la mayor tasa de dispersión. Para un volumen de sangre bajo, se producen menos eventos de dispersión por unidad de longitud. En consecuencia, se observa una intensidad de retrodispersión más baja cerca del punto de impacto (11) del haz secundario en la interfaz (3) pared-líquido interna, pero más fotones no dispersos son capaces de propagarse más profundamente y hacia un lado en la suspensión líquida (5), y la intensidad de retrodispersión decae relativamente lentamente a medida que aumenta la distancia en la dirección X desde el punto de impacto (11) del haz secundario en la interfaz (3) pared-líquido interna. Por lo tanto, el aparato según una realización de la presente invención, como se describió anteriormente, que dirige el haz de luz (7) hacia la botella (1) en incidencia oblicua, se diferencia a un grado mucho más alto de confiabilidad entre botellas (1) de bajos y altos volúmenes de sangre.

35 La figura 3A ilustra esquemáticamente la disposición óptica en un segundo aparato según una realización de la presente invención que tiene un fotodetector en movimiento. El segundo aparato (60) parcial es similar al primer aparato (50) parcial representado en la figura 1A, con la excepción de que el fotodetector (13) en la figura 1A se reemplaza por un fotodetector (19) simple como un fotodiodo. El fotodetector (19) simple está blindado por medio de una placa (20) opaca que tiene una ranura (21) estrecha. Al mover el fotodetector (19) simple, a lo largo de la dirección de la primera flecha (22) doble, parte de la distribución (15) de luz de retrodispersión espacial asimétrica que se muestra en la figura 1B se puede registrar a lo largo de un eje. Se pueden lograr los mismos resultados dejando que el fotodetector (19) permanezca estacionario en una posición y moviendo el dispositivo de imágenes (12) en lugar de la segunda flecha doble 28.

45 La figura 3B ilustra esquemáticamente un aparato de medición óptica de hemocultivo completo según una realización de la presente invención. Además de los elementos mostrados en la figura 1A, la fuente óptica (6) se muestra en una realización ejemplar de la presente invención como un láser conectado con una fuente de alimentación del controlador láser (controlador láser) (23). El fotodetector (13), en una realización ejemplar de la presente invención, es una cámara DCA, conectada a un lector DCA (24) dedicado. Ambos dispositivos, el controlador láser (23) y el lector DCA (24) están conectados a un ordenador (25) que controla el funcionamiento del aparato (70), para registrar datos, realizar análisis de datos y presentar los resultados de las mediciones al usuario.

55 Además, como un experto en la técnica puede apreciar, el ordenador (25) se puede conectar a una red (LAN, WAN, internet inalámbrica o cualquier otro tipo de red) de modo que uno o más usuarios puedan usar el aparato (70) de forma remota, o recibir datos como resultado de manipulaciones propias o ajenas del aparato (70).

60 De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, un aparato (70) completo de medición óptica de hemocultivo puede comprender una fuente óptica que emite luz dentro del intervalo de longitud de onda de aproximadamente 500 nm a 1500 nm. Preferiblemente, el rango de longitud de onda es el rango de aproximadamente 600 nm a 1200 nm. Una realización más específica de la presente invención utiliza una fuente óptica que emite luz dentro del intervalo de longitud de onda de aproximadamente 600 nm a 760 nm. Se han obtenido resultados ventajosos usando un aparato (70) según una realización de la presente invención con una fuente óptica que emite luz, dentro del intervalo de longitud de onda de aproximadamente 640 nm a 720 nm. La fuente óptica puede ser un láser, un diodo emisor de luz o cualquier otra fuente óptica que emita una luz de suficiente potencia óptica dentro de los rangos de longitud de onda dados anteriormente. Una realización ejemplar de la presente invención utiliza un láser semiconductor, que emite aproximadamente 5 mW de potencia a una longitud de onda de aproximadamente 640 nm.

Según otra realización de la presente invención, el sistema (70) completo de medición óptica de hemocultivo puede utilizar el segundo aparato (60) parcial de medición óptica de hemocultivo en el que se utiliza un fotodiodo en movimiento como el fotodetector (19) simple. El aparato (60) comprende además un haz de luz (7) periódico de intensidad modulada y un dispositivo de detección síncrono. Un ejemplo de un dispositivo de detección síncrono es un voltímetro de bloqueo. El voltímetro de bloqueo logra resultados de medición robustos ya que los artefactos debidos a la luz extraviada, la luz de la habitación restante y el efecto de la corriente oscura del fotodiodo pueden eliminarse. Lo mismo es posible incluso para matrices de detectores lineales o 2D.

Ejemplo 1 la figura 4 ilustra grabaciones múltiples de la distribución espacial de la luz dispersada en una botella de hemocultivo que se obtuvieron utilizando el aparato ilustrado en la figura 3A. La fuente óptica (6) es un láser que emite una potencia de aproximadamente 5 mW a una longitud de onda de aproximadamente 633 nm. El haz de luz (7) se desvía de una normal a una pared de la botella en un ángulo de aproximadamente 35 grados. Se usó un fotodiodo PN como el fotodetector (19) simple, y se usó una abertura de ranura estrecha (21). El haz de luz (7) se cortó utilizando un cortador óptico (no se muestra), y la señal del fotodetector (19) simple se detectó y grabó con un amplificador de bloqueo modelo SR850 DSP Stanford Research. Se montó un fotodetector (19) simple en una etapa de traducción motorizada para registrar la distribución (15) de luz de retrodispersión espacial asimétrica a lo largo de una dirección X perpendicular al eje de simetría de la botella de hemocultivo, correspondiente a una distancia de 16 mm de la pared de la botella. (Todos los ejemplos a continuación utilizan este mismo aparato). Las botellas de hemocultivo usadas en las ilustraciones presentadas en este documento eran botellas de vidrio cilíndricas disponibles comercialmente como botellas BACTEC® rellenas con medios de hemocultivo BACTEC® Standard/10 Aerobic/F de Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, New Jersey, USA). Los datos de algunas de las botellas utilizadas se reflejan en múltiples ejemplos y figuras.

Para lograr los resultados ilustrados en la figura 4, se agregaron 5 ml de sangre fresca a una botella de hemocultivo aeróbico, y se realizaron múltiples grabaciones en diferentes ubicaciones de la botella durante un período prolongado de tiempo, un tiempo igual a 3, 8, 13, 25, 32 y 49 horas. Como se puede ver en las múltiples gráficas de la figura 4, la distribución (15) de luz de retrodispersión espacial asimétrica es sustancialmente estable durante el período de tiempo de 49 horas. Como se puede ver en la figura 4, no importa cuándo se registre la distribución de la retrodispersión durante este período de tiempo de 49 horas, se obtienen gráficas sustancialmente idénticas. Sin embargo, en contraste con la distribución (15) de luz de retrodispersión espacial asimétrica, la señal (30) de error similar a un pico debida al fenómeno (26) de la retrodispersión muestra una variación significativa en su amplitud de una grabación a la siguiente (ver, por ejemplo, la variación en amplitudes para 30A, 30B y 30C). Como esta señal (30) de error similar a un pico está lo suficientemente lejos a la izquierda de la distribución (15) de luz de retrodispersión espacial asimétrica, sin embargo, tales variaciones no tienen impacto en las mediciones sobre la distribución (15) de luz de retrodispersión espacial asimétrica.

La figura 5 muestra una de las distribuciones (15) de luz de retrodispersión espacial asimétrica de la figura 4, e ilustra varios parámetros característicos distintos que se utilizan para diferenciar las botellas de hemocultivo positivas y negativas, y para determinar la combinación del hematocrito y el volumen de sangre. El término "PIL" en la figura 5 se refiere al "punto de impacto de la luz" e indica la intensidad de retrodispersión en una posición especial en la distribución (15) de luz de retrodispersión espacial asimétrica, el punto de impacto (11) del haz secundario. El término "IEPIL" se refiere a la intensidad de retro-dispersión en el punto de impacto de la luz. "AMMM" se refiere a "Amplitud máxima en la mitad del máximo" y "MAX" se refiere al máximo del perfil. El término "IMAX" representa la intensidad máxima de retro-dispersión medida en la distribución de la retro-dispersión espacial. "PE" se refiere a "pendiente". La pendiente de la distribución (15) de luz de retrodispersión espacial asimétrica en el flanco (18) de decaimiento lento es de interés, y la presentación semi logarítmica de los datos en la figura 6 ilustra cómo se puede determinar la pendiente con alta precisión.

Las características analíticas adicionales que se pueden usar en el método según las realizaciones de la presente invención comprenden parámetros que se derivan del análisis de la distribución espacial completa de la distribución (15) de retrodispersión espacial asimétrica. Dichas características pueden incluir el número de píxeles en una imagen bidimensional de la distribución (15) de retrodispersión espacial asimétrica que tiene una intensidad de píxeles que excede un umbral dado, o la suma de todas las intensidades de píxeles en una imagen bidimensional de la distribución (15) de retrodispersión espacial asimétrica, entre otros. Además, las "características analíticas procesadas" adicionales de la distribución (15) de la retrodispersión espacial asimétrica pueden generarse mediante combinaciones matemáticas de dos o más de las características analíticas. Los ejemplos de esto se discutirán con mayor detalle a continuación.

Los parámetros característicos mostrados en las figuras 5 y 6 dependen de la cantidad de glóbulos rojos en una botella de cultivo. Esto ocurre porque cuanto mayor es el número de glóbulos rojos, más corta es la distancia entre los eventos de dispersión para los fotones que se propagan dentro de la muestra líquida. Más eventos de dispersión por unidad de longitud tiene un impacto en la distribución de retrodispersión observada. El número de glóbulos rojos se determina por la combinación del volumen de llenado de sangre y el valor del hematocrito. Los parámetros característicos mostrados en las figuras 5 y 6 también dependen de si una población de microorganismos desarrollados está presente o ausente. En presencia de microorganismos, la hemoglobina dentro de los glóbulos

rojos se "desoxigena" debido al metabolismo de los microorganismos. En las longitudes de onda del haz de luz que se usa típicamente en el sistema, el coeficiente de absorción de la hemoglobina cambia sustancialmente durante la desoxigenación. Por lo tanto, muchos más fotones se absorben cuando una botella de cultivo se vuelve positiva (es decir, hay bacterias presentes), lo que tiene un impacto en la distribución (15) de luz de retrodispersión espacial asimétrica observada. Los efectos del volumen de sangre y la presencia o ausencia de una población de microorganismos desarrollados se ilustran en las figuras 7A-9C.

Ejemplo 2 las figuras 7A-7C ilustran gráficas de la intensidad del punto de impacto de la luz versus el tiempo, la medición de la amplitud máxima en la mitad del máximo de intensidad versus el tiempo, y la pendiente de la gráfica de la intensidad versus la posición X con respecto al tiempo, respectivamente, para dos botellas de hemocultivo, una primera botella de hemocultivo que contiene una muestra de control de sangre de 1 ml y una segunda botella de hemocultivo que contiene 1 ml de sangre con E coli, durante un período de aproximadamente 144 horas.

Ejemplo 3 las figuras 8A-8C ilustran gráficos similares de los mismos parámetros de las figuras 7A-7C, pero para una primera botella de hemocultivo que contiene 5 ml de sangre y una segunda botella de hemocultivo que contiene 5 ml de sangre con E coli.

Ejemplo 4 las figuras 9A-9C ilustran gráficos similares de los mismos parámetros de las figuras 7A-8C, pero para una primera botella de hemocultivo que contiene 10 ml de sangre y una segunda botella de hemocultivo que contiene 10 ml de sangre con E coli. Como se ve en las figuras 7A-9C, existen las mismas dependencias para las botellas de hemocultivo que contienen 5 y 10 ml que en las botellas de hemocultivo que contienen solo 1 ml, como se comentó inmediatamente antes.

La figura 10 es una gráfica que ilustra múltiples grabaciones de la distribución espacial de la luz retrodispersa en botellas de hemocultivo llenas con cantidades variables de sangre entre 0,5 ml y 10 ml. La figura 10 ilustra múltiples grabaciones de la distribución espacial de la luz retro-dispersada en botellas de hemocultivo llenas con cantidades variables de sangre entre 0,5 ml y 10 ml que se obtuvieron usando el aparato del Ejemplo 1.

La figura 11 muestra los datos de la figura 10 en una presentación semi-logarítmica. Como se puede ver, el flanco (18) que disminuye lentamente de la figura 1B toma la forma de una línea recta, lo que es ventajoso para determinar un valor de pendiente.

La presente invención proporciona, en un aspecto, para un método para determinar el volumen y el valor del hematocrito de una muestra de sangre usando un aparato tal como se describe en el presente documento. En una realización, se obtienen valores de calibración pregrabados para características analíticas extraídas. Las características analíticas extraídas de una muestra se obtienen y se comparan con los valores de calibración para determinar el volumen y el valor del hematocrito para una muestra. En el método según algunas realizaciones de la presente invención, un haz de luz (7) se dirige hacia la interfaz (pared) (2) aire-pared externa de una botella (1) de hemocultivo en un punto de impacto (9) del haz primario de tal manera que el haz de luz (7) se desvíe de una normal (10) a la pared (2) de la botella en el punto de impacto (9) del haz primario en un ángulo Θ entre aproximadamente cero y 90 grados. Si el ángulo Θ se vuelve muy pequeño, la distribución (15) de luz de retrodispersión espacial asimétrica generada se vuelve más y más simétrica. Una distribución espacial simétrica también transporta información sobre el estado de la suspensión (5) líquida y puede usarse según una realización de la presente invención. Se pueden lograr mejores resultados, sin embargo, con un ángulo mayor Θ como se describe anteriormente. Por lo tanto, el método según una realización ejemplar particular emplea un ángulo Θ entre aproximadamente 25 y 45 grados. Si el haz de luz (7) sale de un láser y se dirige a una incidencia normal sobre el punto de impacto (9) del haz primario en la pared de la botella (2), entonces el haz de luz (7) se reflejará de nuevo en la láser (6).

Como se usó anteriormente en este documento, el término "AMMM" significa " amplitud máxima en la mitad de IMAX". Dado que, como se muestra en la figura 2B, la distribución espacial asimétrica de la luz retrodispersada se extiende en dos dimensiones, podemos diferenciar entre un "AMMMX", medido a lo largo del eje X, y un "AMMMY", medido a lo largo de la Y eje. El eje Y está orientado a lo largo de la pared de la botella dentro de un plano perpendicular a la pared de la botella y comprende la posición de IMAX, pero se extiende perpendicular al eje X.

El término "AMMM*" significa "amplitud máxima en la mitad del IEPIL". De manera similar a como se describe anteriormente, "AMMMX*", se puede medir a lo largo del eje X, y "AMMMY*", se puede medir a lo largo de la dirección Y que es paralela al eje Y en un plano que comprende la posición de IEPIL, con la dirección Y como se describe anteriormente.

Como se usó anteriormente en este documento, el término "PE" significa "pendiente". La pendiente de la distribución (15) de retrodispersión espacial asimétrica en el flanco (18) de decaimiento lento es interesante, y la presentación semi-logarítmica de los datos en la figura 6 ilustra cómo se puede determinar la pendiente con alta precisión. Como puede verse en la presentación semi-logarítmica en la figura 7, el flanco (18) de decaimiento lento exhibe una sección extendida que corresponde a una línea recta que se puede "ajustar" con una línea recta. Por razones prácticas, la pendiente se define como la inversa de la distancia a lo largo del eje X de una distribución (15) de

retrodispersión espacial asimétrica registrada sobre la cual la intensidad disminuye en un factor dado. Debido a que la pendiente como se define arriba se mide a lo largo del eje X, usamos el término "PEX". Por razones prácticas, se prefiere un valor de 10 para PEX, pero, como puede apreciar un experto en la técnica, también se puede usar cualquier otra definición de pendiente sin apartarse del alcance de la presente invención.

Similar a la amplitud, una pendiente también se define como medida a lo largo del eje Y. El término de pendiente "PEY" se define como el inverso de la distancia a lo largo del eje Y de la distribución (15) de retrodispersión espacial asimétrica registrada sobre la cual la intensidad disminuye en un factor dado. En una realización ejemplar, se puede usar un factor de 10, aunque, como se indicó anteriormente, con otras definiciones de la pendiente, otros factores son igualmente viables.

Otra medida de pendiente es "PEY*" que se mide a lo largo de una dirección Y paralela al eje Y en un plano que comprende la posición de IEPIL. PEY* se define como la inversa de la distancia a lo largo de la dirección Y de la distribución (15) de retrodispersión espacial asimétrica registrada sobre la cual la intensidad disminuye en un factor dado. En una realización ejemplar, se puede usar un factor de 10, aunque, como se indicó anteriormente, con otras definiciones de la pendiente, otros factores son igualmente viables.

Ejemplo 6 la figura 12 es un gráfico que ilustra la pendiente frente al volumen de sangre medido en doce botellas de cultivo llenas de sangre de tres valores de hematocrito diferentes. Cada punto de datos representa una botella de cultivo diferente.

La figura 13 es una gráfica que ilustra la pendiente frente al producto del volumen de sangre y el hematocrito medido en las doce botellas de cultivo. Cada punto de datos representa una botella de cultivo diferente. Las tablas de inserción indican cómo se ha generado el producto mencionado anteriormente en las doce botellas de cultivo. Como puede verse en el gráfico ilustrado en la figura 13, el valor de la pendiente se puede expresar en función del volumen de sangre y el producto del hematocrito mencionados anteriormente. La línea discontinua en la figura 13 corresponde al mejor ajuste

$$Y = K * X^M \quad (1)$$

donde Y = PE representa la pendiente, $K = 5,70 * 10^{-3}$ es una primera constante, $X = VOL * HCT$ es el producto del volumen de sangre (VOL) y del valor del hematocrito (HCT), y $M = 0,72$ es una segunda constante. Basándose en los datos que se muestran en la figura 13, la combinación (aquí el producto) de VOL y HCT se puede determinar midiendo la pendiente PE y calculando el valor de VOL * HCT según la ecuación

$$VOL * HCT = \left(\frac{PE}{K} \right)^{\frac{1}{M}} \quad (2)$$

El así-llamado artefacto "fondo de sangre" en una curva de crecimiento bacteriano, que es una consecuencia del metabolismo de los glóbulos rojos dominantes, es proporcional al volumen de llenado de sangre, VOL, y proporcional al valor del hematocrito, HCT. En otras palabras, el artefacto de fondo de la sangre es proporcional al producto VOL * HCT que se correlaciona con la cantidad de glóbulos rojos en una botella de hemocultivo determinada. El enfoque según la ecuación (2) para determinar el producto VOL * HCT es, por lo tanto, un procedimiento muy útil para el diseño de algoritmos de detección optimizados, como se explicó anteriormente. Si el producto es alto, debe esperarse un gran fondo de sangre, y el algoritmo de detección debe ser robusto. Si el producto es bajo, se puede esperar un pequeño fondo de sangre y el algoritmo de detección puede ser más sutil. Los algoritmos, una vez determinados según los métodos descritos en este documento, se pueden usar para determinar el volumen de sangre o el valor del hematocrito para una muestra determinada.

Como se mencionó anteriormente, el volumen de una muestra de sangre rellena en una botella de cultivo debe ser razonablemente alto, preferiblemente alrededor de 10 ml. La necesidad de emplear un gran volumen de sangre en botellas de cultivo surge del hecho de que, dependiendo de las especies de microorganismos, el número de unidades formadoras de células por ml de sangre del paciente puede ser muy bajo. En la práctica, y dependiendo del estado del paciente, se utilizan con frecuencia cantidades de sangre más pequeñas que las óptimas, lo que puede tener un impacto negativo en la fiabilidad de tales pruebas. En este contexto, un procedimiento para determinar el volumen de llenado real de la sangre del paciente en cada botella cargada en un instrumento sería sin duda una gran ventaja. Si la pendiente PE se determina según una realización de la presente invención, el volumen de sangre en sí no se puede determinar con precisión. Esto se ilustra en la figura 14, que muestra en forma de flechas dobles el rango de volumen posible para un valor de pendiente dado. Como lo ilustra la figura 14, sin embargo, la longitud de las flechas dobles se hace más corta y más corta cuanto menor es el volumen de llenado de sangre. Por lo tanto, la incertidumbre en la determinación del volumen de llenado de sangre se vuelve pequeña dentro del rango de bajo volumen. Por lo tanto, el método según una realización de la presente invención es adecuado para identificar botellas de hemocultivo verdaderamente "poco llenas", es decir, botellas que han recibido menos de 1 ml de muestra de sangre. Vale la pena mencionar que en el extremo de alto volumen de la escala no

existe una necesidad crítica de conocer el volumen de llenado con precisión, ya que la probabilidad de que la muestra de sangre contenga al menos un microorganismo es relativamente alta. En el extremo de bajo volumen, existe la posibilidad de que el pequeño volumen de sangre seleccionado no contenga un organismo, lo que daría como resultado un cultivo falso negativo.

Ejemplo 7 la figura 15 es un gráfico que ilustra la intensidad de retrodispersión medida para el punto de impacto del láser versus el volumen de sangre según se determina en doce botellas de cultivo llenas de sangre de diferentes valores del hematocrito. La figura 15 muestra la intensidad de retrodispersión, IEPIL, medida para el punto de impacto del láser versus el volumen de sangre. Cada punto de datos representa una botella de cultivo diferente.

La figura 16 es un gráfico que ilustra la intensidad de retrodispersión medida en el punto de impacto del láser en versus el producto del volumen de sangre y el hematocrito medido en las doce botellas de cultivo. Cada punto de datos representa una botella de cultivo diferente. Las tablas de inserción indican cómo se ha generado el volumen de sangre y el producto del hematocrito mencionados anteriormente en las doce botellas de cultivo. Debido al uso de un láser, la figura 16 y otras incluyen la expresión "Intensidad en el punto de impacto del láser" en lugar de "Intensidad en el punto de impacto de la luz". La línea discontinua en la figura 16 corresponde al mejor ajuste:

$$Y = A * X \quad (3)$$

donde Y = IEPIL representa la intensidad en el punto de impacto del láser, A = 3,05 * 10⁻⁶ es una constante, y X = VOL * HCT es el producto del volumen de sangre VOL y del valor del hematocrito HCT. Cabe señalar que el valor de la constante A depende de los detalles exactos del aparato utilizado. Según los datos mostrados en la figura 16, la combinación (aquí el producto) de VOL y HCT se puede determinar según una realización de la presente invención midiendo la intensidad IEPIL y calculando el valor de VOL * HCT según la ecuación:

$$VOL * HCT = \left(\frac{IEPIL}{A} \right) \quad (4)$$

Consideraciones similares con respecto a la determinación del volumen de sangre en sí se aplican como se discutió en relación con la figura 14.

Ejemplo 8 la figura 17 es un gráfico que ilustra el valor de las integrales sobre los registros de la distribución espacial de la luz retrodispersada como se muestra en la figura 4 en doce botellas de hemocultivo llenas de cantidades variables de sangre. La integración comenzó en la posición X de aproximadamente 3,5 mm para excluir los picos de dispersión altamente variables cerca de la posición X de aproximadamente 2,8 mm que se originan en la interfaz aire-cristal. Las integrales se representan gráficamente frente al producto VOL * HCT medido en botellas de cultivo llenas de sangre de tres valores de hematocrito diferentes. Cada punto de datos representa una botella de cultivo diferente. Las tablas de inserción indican cómo se ha generado el producto. La línea discontinua en la figura 17 corresponde al mejor ajuste

$$Y = U * \left[1 - \exp\left(-X/V\right) \right] \quad (5)$$

en donde Y = INTEG representa el valor integral, U = 3,709 * 10⁻³ es una primera constante, X = VOL * HCT es el producto del volumen de sangre VOL y el valor del hematocrito HCT, y V = 162,52 es una segunda constante. Además, los valores de las constantes U y V dependen de los detalles exactos del aparato utilizado. Según los datos mostrados en la figura 19, la combinación (aquí el producto) de VOL y HCT se puede determinar según una realización de la presente invención midiendo la integral INTEG y calculando el valor de VOL * HCT según la ecuación

$$VOL * HCT = -V * \ln \left[1 - \left(\frac{INTEG}{U} \right) \right] \quad (6)$$

La figura 18 es una gráfica que ilustra la inversa de la amplitud máxima en la mitad del máximo ("1/AMMM") de las grabaciones de la distribución espacial de la luz retrodispersada en las doce botellas de hemocultivo versus el producto del volumen de sangre y hematocrito, (VOL * HCT). Cada punto de datos representa una botella de cultivo diferente. Las tablas de inserción indican cómo se ha generado el producto. La línea discontinua en la figura 20 corresponde al mejor ajuste

$$Y = C + D * X \quad (7)$$

en la que Y = 1/AMMM representa la inversa de la amplitud máxima en la mitad del máximo, C = 0,0822 es una primera constante, X = VOL * HCT es el producto del volumen de sangre VOL y del valor del hematocrito HCT, y D = 1,16 * 10⁻³ es una segunda constante. Según los datos mostrados en la figura 20, la combinación (aquí el producto)

de VOL y HCT se puede determinar según una realización de la presente invención midiendo la pendiente PE y calculando el valor de VOL * HCT según la ecuación

$$VOL * HCT = \frac{(1/AMMM) - C}{D} \quad (8)$$

La figura 19 es un gráfico que ilustra la inversa de la distancia a lo largo del eje X entre el punto de impacto del láser, PIL, que se muestra en la figura 12, y el máximo, MAX, de las grabaciones de la distribución espacial de la luz retrodispersada en las botellas de hemocultivo versus el producto del volumen de sangre y el hematocrito, (VOL * HCT). Cada punto de datos representa una botella de cultivo diferente. La línea discontinua en la figura 19 corresponde al mejor ajuste

$$Y = B * X \quad (9)$$

donde Y = 1/DIST representa la inversa de la distancia a lo largo del eje X entre el punto de impacto del láser, PIL y el máximo, MAX, que se muestra en la figura 12, B = 5,90 * 10⁻³ es una constante, y X = VOL * HCT es el producto del volumen de sangre VOL y del valor del hematocrito HCT. Según los datos mostrados en la figura 19, la combinación (aquí el producto) de VOL y HCT se puede determinar según una realización de la presente invención midiendo la distancia inversa 1/DIST, y calculando el valor de VOL * HCT según la ecuación

$$VOL * HCT = \frac{(1/DIST)}{B} \quad (10)$$

Como se ha mostrado anteriormente, el método según una realización de la presente invención se puede usar para determinar la combinación del volumen y el valor del hematocrito de una muestra de sangre llenada en una botella de cultivo mediante la extracción de las características analíticas PE, IEPIL, INTEG, (1/AMMM), o (1/DIST) de la distribución (15) de luz de retrodispersión espacial asimétrica, y comparando dichas características analíticas extraídas con valores pregrabados para tales características. En todas las realizaciones ejemplares de la presente invención discutidas anteriormente, todas las características extraídas se registraron a lo largo del eje X. Se pueden definir y registrar características analíticas similares a lo largo del eje Y. Además, las características analíticas en el método según una realización de la presente invención también pueden comprender parámetros que se derivan del análisis de la distribución espacial completa de la luz retrodispersada. Dichas características pueden incluir el número de píxeles en una imagen bidimensional de dicha distribución de luz asimétrica que tiene una intensidad de píxeles que excede un umbral dado, o la suma de todas las intensidades de píxeles en una imagen bidimensional de dicha distribución de luz asimétrica, entre otras.

Se pueden generar características analíticas procesadas adicionales de la distribución (15) de luz de retrodispersión espacial asimétrica mediante combinaciones matemáticas de dos o más características analíticas. Las combinaciones matemáticas que se pueden usar incluyen, pero no están limitadas a, operaciones como sumas, diferencias, productos, ratios o poderes de, entre otros.

Otro ejemplo para generar una característica analítica procesada es determinar los valores para el producto PROD = VOL * HCT utilizando todos los pasos mencionados anteriormente para determinar productos individualmente, como PROD_{PE}, PROD_{IEPIL}, PROD_{INTEG}, PROD_{AMMM} y PROD_{DIST}, y luego combinar los resultados individuales en un producto promedio de PROD_{PR}, según la ecuación:

$$PROD_{PR} = \frac{PROD_{PE} + PROD_{IEPIL} + PROD_{INTEG} + PROD_{AMMM} + PROD_{DIST}}{5} \quad (11)$$

El procedimiento según la ecuación (11) es robusto y produce un valor PROD_{AV} altamente confiable para dicho producto.

Además de la importancia de obtener un volumen de sangre suficientemente grande como se explicó anteriormente, también es importante determinar el estado del hemocultivo dentro de un recipiente sellable, como una botella de hemocultivo, con rapidez, ya que generalmente es deseable que el estado sea negativo (es decir, que el número de microorganismos que podrían estar presentes es todavía muy bajo).

El estado de un hemocultivo dentro de una botella de cultivo puede verificarse según una realización de la presente invención para diferenciar rápidamente entre botellas de hemocultivo positivas y negativas. En esta realización, un haz de luz (7) se dirige a la interfaz (pared) (2) aire-pared externa de una botella (1) de hemocultivo en un punto de impacto (9) del haz primario de tal manera que el haz de luz (7) se desvía de una normal (10) a la pared de la botella (2) en el punto de impacto (9) del haz primario en un ángulo Θ entre aproximadamente cero y 90 grados. Si el ángulo Θ se vuelve muy pequeño, la distribución (15) de retrodispersión espacial asimétrica de la luz generada se

vuelve más y más simétrica. Una distribución espacial simétrica también transporta información sobre el estado de la suspensión líquida (5) y se puede utilizar en el método según las realizaciones de la presente invención. Sin embargo, se pueden lograr mejores resultados con un ángulo mayor Θ como se describe anteriormente. Por lo tanto, el método según una realización ejemplar particular emplea un ángulo Θ entre aproximadamente 25 y 45 grados. Si el haz de luz (7) sale de un láser y se dirige en una normal incide sobre el punto de impacto (9) del haz primario en la pared (2) de la botella, entonces el haz de luz (7) se reflejará de nuevo en la láser (6).

Ejemplo 9 la figura 20 es un gráfico que ilustra la intensidad del punto de impacto de la luz versus tiempo para una primera botella de hemocultivo que contiene una muestra de control de 1 ml de sangre fresca y una segunda botella de hemocultivo que contiene una muestra de 1 ml de sangre y un cultivo desarrollado de E coli durante un período de tiempo de aproximadamente 5 días.

La primera medición en la figura 20 se realizó inmediatamente después de inocular una de las botellas con aproximadamente 20 microorganismos de E coli. Por lo tanto, en el momento cero los datos de E coli están cerca de los datos de una botella de control típica sin organismos. La botella de E coli se incubó luego durante aproximadamente 12 horas, lo que dio como resultado el desarrollo de una botella de cultivo completamente positiva. Se realizaron dos mediciones más en la botella de control mientras la botella de E coli estaba en la incubadora. Ambas botellas se mantuvieron a temperatura ambiente después de 12 horas. Las dos gráficas en la figura 20 muestran que la característica analítica IEPIL exhibe una diferencia sustancial entre la botella de control y la botella de E coli durante el período de monitoreo de aproximadamente 5 días. Las medidas adicionales que se describen a continuación se realizaron en condiciones muy similares. En todos los casos, las mediciones se realizaron a lo largo del eje X; por lo tanto, el término "AMMMX" se redujo a solo "AMMM". El mismo acortamiento se ha aplicado a todos los demás términos.

La figura 21 es una gráfica que ilustra la amplitud máxima en la mitad del máximo (AMMM) de la distribución espacial de la luz retrodispersada versus tiempo para una primera botella de hemocultivo que contiene una muestra de control de 1 ml de sangre fresca y una segunda botella de hemocultivo que contiene una muestra de sangre de 1 ml y un cultivo desarrollado de E coli durante un período de tiempo de aproximadamente 5 días. De nuevo, hay una diferencia sustancial en AMMM durante todo el período de monitoreo de aproximadamente 5 días. Las figuras 22 a 28 ilustran que existe una diferencia sustancial en las características analíticas medidas entre las botellas (2) de control y las positivas.

La figura 22 es un gráfico que ilustra la pendiente de la distribución espacial de la luz retrodispersada versus un gráfico de tiempo a lo largo del tiempo según las figuras 23 y 24 para una primera botella de hemocultivo que contiene una muestra de control de 1 ml de sangre fresca y una segunda botella de hemocultivo que contiene una muestra de sangre de 1 ml y un cultivo desarrollado de E coli durante un período de tiempo de aproximadamente 5 días.

Ejemplo 10 la figura 25 es un gráfico que ilustra la intensidad del punto de impacto de la luz versus el tiempo para una primera botella de hemocultivo que contiene una muestra de control de 5 ml de sangre fresca y una segunda botella de hemocultivo que contiene una muestra de sangre de 5 ml y un cultivo desarrollado de E coli durante un período de tiempo de aproximadamente 5 días.

La figura 26 es una gráfica que ilustra la amplitud máxima en la mitad del máximo (AMMM) de la distribución espacial de la luz retrodispersada versus el tiempo para una primera botella de hemocultivo que contiene una muestra de control de 5 ml de sangre fresca y una segunda botella de hemocultivo que contiene una muestra de 5 ml de sangre un cultivo desarrollado de E coli durante un período de tiempo de aproximadamente 5 días.

La figura 27 es un gráfico que ilustra la pendiente de la distribución espacial de la luz retrodispersada versus el gráfico de tiempo a lo largo del tiempo según las figuras 25 y 26 para una primera botella de hemocultivo que contiene una muestra de control de 5 ml de sangre fresca y una segunda botella de hemocultivo que contiene una muestra de sangre de 5 ml y un cultivo desarrollado de E coli durante un período de tiempo aproximado 5 días.

Ejemplo 11 la figura 28 es una gráfica que ilustra la intensidad del punto de impacto de la luz versus el tiempo para una primera botella de hemocultivo que contiene una muestra de control de 10 ml de sangre fresca y una segunda botella de hemocultivo que contiene una muestra de sangre de 10 ml y un cultivo desarrollado de E coli durante un período de tiempo de aproximadamente 5 días.

La figura 29 es una gráfica que ilustra la amplitud máxima en la mitad del máximo (AMMM) de la distribución espacial de la intensidad de la luz retrodispersada versus el tiempo para una primera botella de hemocultivo que contiene una muestra de control de 10 ml de sangre fresca y una segunda botella de hemocultivo que contiene una muestra de 10 ml de sangre y un cultivo desarrollado de E coli durante un período de tiempo de aproximadamente 5 días.

La figura 30 es un gráfico que ilustra la pendiente de la distribución espacial de la luz retrodispersada versus el gráfico de tiempo a lo largo del tiempo según las figuras 28 y 29 para una primera botella de hemocultivo que

contiene una muestra de control de 10 ml de sangre fresca y una segunda botella de hemocultivo que contiene una muestra de sangre de 10 ml y un cultivo desarrollado de E coli durante un período de tiempo de aproximadamente 5 días.

5 Ejemplo 12 la figura 31 es una gráfica que ilustra el cambio en la distribución de la retrodispersión para una botella (2) de hemocultivo negativa (es decir, una botella de hemocultivo de control) que se convierte en una botella (1) de hemocultivo con un cultivo completamente desarrollado de E coli para 10 ml de sangre fresca.

10 Ejemplo 13 La figura 32 es un gráfico bidimensional (2D) que ilustra el AMMM versus la intensidad de retrodispersión en el punto de impacto de la luz (IEPIL) para seis botellas de hemocultivo, una primera (botella de control) que contiene 1 ml de sangre fresca, una segunda que contiene 1 ml de sangre y un cultivo desarrollado de E coli, una tercera (botella de control) que contiene 5 ml de sangre fresca, una cuarta que contiene 5 ml de sangre y un cultivo desarrollado de E coli, una quinta (botella de control) que contiene 10 ml de sangre fresca y una sexta que contiene 10 ml de sangre y un cultivo desarrollado de E coli, registrado durante un período de tiempo de aproximadamente 6 días. Para generar esta gráfica 2D, todos los puntos de datos mostrados en las figuras 20, 21, 15 25, 26, 28 y 29 han sido utilizados. Los seis grupos de puntos en la figura 32 proporcionan información sobre el error que puede esperarse si solo se realizara una medición en un momento dado durante el período de 5 días en una botella de estado desconocido. Como puede verse, a pesar de una cierta difusión de los puntos de datos, es posible una clara separación entre los tres grupos de botellas de control (1, 5 y 10 ml) y los grupos correspondientes de 20 botellas positivas es posible.

Utilizando los métodos según las realizaciones de la presente invención como se describe a continuación, y la presentación 2D de la figura 32, se puede tomar una decisión con respecto a la presencia o ausencia de una población de microorganismos desarrollados comparando los datos medidos en una botella (1) en prueba con datos 25 de calibración pregrabados. Por ejemplo, dado que las medidas ilustradas en las figuras 22, 25-30 y 32 representan datos de botellas de un estado conocido, estos datos pueden usarse como datos de calibración para mediciones futuras en botellas de un estado desconocido.

30 Ejemplo 14 la figura 33 es un gráfico 2D que ilustra la PE versus la IEPIL para seis botellas de hemocultivo, una primera (botella de control) que contiene 1 ml de sangre fresca, una segunda que contiene 1 ml de sangre y un cultivo desarrollado de E coli, una tercera (botella de control) conteniendo 5 ml de sangre fresca, una cuarta que contiene 5 ml de sangre y un cultivo desarrollado de E coli, una quinta (botella de control) que contiene 10 ml de sangre fresca y una sexta que contiene 10 ml de sangre y un cultivo desarrollado de E coli, registrado durante un tiempo período de aproximadamente 6 días. 35

Para generar la gráfica 2D que se muestra en la figura 33, los puntos de datos que se muestran en las figuras 20, 22, 25, 26, 28 y 29 han sido utilizados. De nuevo, es evidente una clara diferenciación entre una botella de control y una botella positiva.

40 Ejemplo 15 la figura 34 es un gráfico tridimensional (3D) que ilustra la PE versus el AMMM versus la IEPIL para seis botellas de hemocultivo, una primera (botella de control) que contiene 1 ml de sangre fresca, una segunda que contiene 1 ml de sangre y un cultivo desarrollado de E coli, una tercera (botella de control) que contiene 5 ml de sangre fresca, una cuarta que contiene 5 ml de sangre y un cultivo desarrollado de E coli, una quinta (botella de control) que contiene 10 ml de sangre fresca y una sexta que contiene 10 ml de sangre y un cultivo desarrollado de 45 E coli, registrado durante un período de tiempo de aproximadamente 6 días. Para generar la gráfica 3D de la figura 34, los puntos de datos mostrados en las figuras 20-22 y 25 - 30 se han utilizado, y una diferenciación aún mejor que la que se muestra en las figuras 32 y 33 entre las botellas de control y las botellas positivas es evidente.

50 Ejemplo 16 la figura 35 ilustra las mediciones de una característica analítica procesada Q5 de la distribución de retrodispersión para cuatro botellas de hemocultivo, una primera (botella de control) que contiene 5 ml de sangre fresca, una segunda que contiene 5 ml de sangre con cultivos desarrollados de E coli, una tercera (botella de control) que contiene 10 ml de sangre fresca y una cuarta que contiene 10 ml de sangre con cultivos desarrollados de E coli, durante un período de tiempo de aproximadamente 6 días. La figura 35 muestra una característica procesada, Q5 versus el tiempo transcurrido desde la inoculación en una representación de datos 2D. La 55 característica analítica procesada Q5 se ha generado al combinar las características analíticas IEPIL, AMMM y PE según la siguiente ecuación, Ecuación (12).

Ecuación (12):

$$60 \quad Q5 = \frac{10^4 * (IEPIL * AMMM)^{1.5}}{PE}$$

La combinación del formulario de IEPIL, AMMM y PE se ha elegido para obtener la máxima separación entre el control y los datos positivos de la botella, pero minimizando la dependencia de Q5 en el volumen de sangre. En la figura 37, los símbolos cuadrados representan datos de 5 ml y los símbolos redondos representan datos de 10 ml.

La mayoría de los puntos de control están ubicados dentro del campo A, y la mayoría de los puntos E coli están ubicados dentro del campo B. La línea discontinua C corresponde al momento de la inoculación. Como se esperaba, los puntos de datos de E coli medidos inmediatamente después de la inoculación están ubicados muy cerca de los puntos de datos de control. En general, después de un breve período de tiempo, existe una separación perfecta entre los puntos de datos de control y los puntos de datos de E coli. Por lo tanto, la característica procesada Q5 representa datos excelentes para tomar una decisión relativa a la presencia o ausencia de una población de microorganismos desarrollados dentro de la botella (1) de hemocultivo correspondiente.

Ejemplo 17 la figura 36 ilustra un segundo conjunto de mediciones de la característica analítica procesada Q5 de la distribución de retrodispersión para seis botellas (2) de hemocultivo, una primera (botella de control) que contiene 1 ml de sangre fresca, y una segunda que contiene 1 ml de sangre con cultivos desarrollados de E coli, una tercera (botella de control) que contiene 5 ml de sangre fresca, una cuarta que contiene 5 ml de sangre con cultivos desarrollados de E coli, una quinta (botella de control) que contiene 10 ml de sangre fresca y una sexta que contiene 10 ml de sangre con cultivos desarrollados de E coli, durante un período de tiempo de aproximadamente 6 días. Como se mencionó anteriormente con respecto a la figura 35, la mayoría de los puntos de datos de control que se muestran en la figura 36 están ubicados dentro de un primer campo, D, y la mayoría de los puntos de datos de E coli están ubicados dentro de un segundo campo, E. Los únicos "valores atípicos" son aquellos puntos de datos observados inmediatamente después de la inoculación. En consecuencia, la figura 36 demuestra que el método según las realizaciones de la presente invención proporciona una rápida diferenciación entre botellas de hemocultivo positivas y negativas para un rango de volumen de sangre entre 1 ml y 10 ml.

Ejemplo 18 la figura 37 es un gráfico que ilustra los valores medios del parámetro de post-proceso Q5 de la distribución de retrodispersión para seis botellas (2) de hemocultivo, una primera (botella de control) que contiene 1 ml de sangre fresca, una segunda que contiene 1 ml de sangre con cultivos desarrollados de E coli, una tercera (botella de control) que contiene 5 ml de sangre fresca, una cuarta que contiene 5 ml de sangre con cultivos desarrollados de E coli, una quinta (botella de control) que contiene 10 ml de sangre fresca y una sexta que contiene 10 ml de sangre con cultivos desarrollados de E coli e incluyen además líneas discontinuas que representan una extrapolación hacia 15 ml de sangre para las muestras de control y las muestras que contienen sangre con cultivos desarrollados de E coli. Las líneas discontinuas de la figura 37 representan una extrapolación hacia 15 ml de sangre. Que todos los puntos de datos de control están dentro de un primer campo, F, y todos los puntos de datos de E coli están dentro de un segundo campo, G, es indicativo de la capacidad del método según las realizaciones de la presente invención para diferenciar entre botellas de hemocultivo positivas y negativas en un rango de volumen de sangre de 1 ml a 15 ml.

La figura 38 es un diagrama de flujo que ilustra un método para determinar la presencia o ausencia de una población de microorganismos desarrollados según una realización de la presente invención. Este diagrama de flujo ilustra los pasos en un método según una realización de la presente invención que utiliza los datos mostrados en la figura 36 para determinar el estado de una botella de hemocultivo bajo prueba. El método presentado en el diagrama de flujo que se muestra en la figura 38 es aplicable para un rango de valores de volumen de sangre entre aproximadamente 1 ml y 15 ml.

El método 2300 de esta realización para determinar si una botella (1) de hemocultivo es positiva o negativa comienza con el paso 230. En el paso 230, se coloca una botella (1) de hemocultivo en el aparato como se muestra en la figura 3A (aunque otras configuraciones se pueden usar en la práctica del método de la invención como se describe en este documento) el fotodetector (19) registra los resultados y los almacena una imagen (es decir, la distribución (15) de la retrodispersión espacial asimétrica) y los resultados almacenados. En una realización de la presente invención, los resultados (similares a los mostrados en la figura 4) se digitalizan y almacenan en un ordenador 25 conectado al fotodetector (19), y un operador puede acceder a ellos de forma remota a través de una red (LAN, WAN Internet, y así sucesivamente). Ya sea manualmente, o por medio de un software de análisis de datos, el IEPIL se determina en el paso 232, el AMMM se determina en el paso 234 y el PE (18) se determina en el paso 236. Luego el operador o software determina Q5 según la ecuación (I) (discutido anteriormente) en el paso 238. En el paso de decisión 240, Q5 se compara con un primer umbral, T1. T1, en una realización particular de la presente invención, se establece en 2,5, aunque, como puede apreciar un experto en la técnica de la invención, este no tiene por qué ser el caso. Se pueden usar otros valores de T1, dependiendo de las diferentes fórmulas de pendiente utilizadas, que también se discutieron anteriormente.

Si Q5 es mayor que 2,5 (ruta "Sí" desde el paso de decisión 240), en el paso 242 se realiza una determinación y se anuncia al operador que la muestra de hemocultivo es negativa o que solo hay un número muy pequeño de bacterias en la botella (1) de hemocultivo. En este caso, sería recomendable y tendría sentido cargar la botella de hemocultivo en un sistema automatizado de detección de bacterias para realizar más pruebas. Si Q5 es menor que 2,5 (ruta "No" desde el paso de decisión 240), se realiza una segunda determinación en el paso de decisión 244: ¿Es Q5 menor que T2? En esta realización de la presente invención, T2 se establece en 1,3. Si Q5 también es menor que 1,3 (ruta "Sí" desde el paso de decisión 244), se determina que la botella (1) de hemocultivo es positivo, o que hay bacterias de algún tipo en la botella (1) de hemocultivo. En este caso, no sería necesario cargar la botella (1) de hemocultivo en un sistema de detección de bacterias automatizado. En su lugar, la botella (1) de hemocultivo se puede analizar de inmediato para determinar la identificación bacteriana y la susceptibilidad antimicrobiana. La

ventaja aquí es que el resultado con respecto a la presencia de microorganismos está disponible de inmediato, y que no hay espacio innecesariamente ocupado en el sistema automatizado de detección de bacterias. Sin embargo, si se determina que Q5 es mayor que 1,3 (pero menor que 2,5), entonces es probable que haya bacterias presentes en la botella (1) de hemocultivo, como se determinó en el paso 246 (ruta "No" del paso de decisión 244). En este caso, una población microbiana puede estar en la fase de desarrollo, y sería recomendable cargar la botella en un sistema de detección automatizado para confirmar el resultado presuntivo.

Los métodos descritos anteriormente según las realizaciones de la presente invención se pueden llevar a cabo muy rápidamente y, en el caso de maquinaria avanzada y automatizada, de forma completamente automática incluso hasta el punto de cargar las botellas (1) de hemocultivo en un transportador para analizar debajo del aparato mostrado en la figura 3A. Los datos se pueden organizar y almacenar rápidamente, luego compartarlos en una red (como se describe anteriormente), se pueden generar informes, etcétera.

Ejemplo 19 la figura 39 es un gráfico 3D que ilustra los valores medios de 6 días de una característica analítica IEPIL y las características analíticas procesadas P1 y Q1, definidas por las ecuaciones (Ecuación 13 y Ecuación 14) para seis botellas de hemocultivo: una primera (botella de control) que contiene 1 ml de sangre fresca, una segunda que contiene 1 ml de sangre con cultivos desarrollados de E coli, una tercera (botella de control) que contiene 5 ml de sangre fresca, una cuarta que contiene 5 ml de sangre con cultivos desarrollados de E coli, una quinta (botella de control) que contiene 10 ml de sangre fresca y una sexta que contiene 10 ml de sangre con E coli desarrollada.

Ecuación 13:

$$P1 = IEPIL * AMMM$$

Ecuación 14:

$$Q1 = P1/SL$$

Al comparar la figura 39 con la figura 34, queda claro que las características analíticas procesadas como se definieron anteriormente proporcionan una diferenciación mejorada entre botellas (1) de hemocultivo positivas y negativas. Las características analíticas procesadas P1, Q1 y Q5, como se discutió anteriormente, son solo algunos ejemplos de una multitud de posibles características analíticas procesadas. Está dentro del espíritu y el alcance de las realizaciones de la presente invención generar otras características analíticas procesadas que pueden usarse para diferenciar entre botellas de hemocultivo positivas y negativas. La misma afirmación se mantiene para las características analíticas en sí mismas. Además, en este caso, se pueden seleccionar y utilizar otras características analíticas. El método según las realizaciones de la presente invención no se limita de ninguna manera al uso de representaciones de datos 2D o 3D y diagramas de flujo para tomar una decisión relativa a la presencia o ausencia de una población de microorganismos desarrollados. En su lugar, se puede usar un software dedicado, que permite la comparación de nuevos datos obtenidos de una botella bajo prueba, con datos de calibración pregrabados de otras botellas (1) de hemocultivo de estado conocido.

Ejemplo 20 la figura 40 es un gráfico 2D que ilustra el parámetro de post-procesamiento Q5 de la distribución de retrodispersión versus el tiempo para 12 botellas (1) de hemocultivo, seis botellas que contienen muestras de control de sangre fresca para varias cantidades de 2 a 12 ml y seis botellas que contienen muestras de sangre con cultivos desarrollados de E coli para diversas cantidades de 2 a 12 ml, durante un período de tiempo de aproximadamente seis días. La figura 42 muestra los mismos datos que en la figura 38, pero se agregaron los resultados obtenidos de 2 ml a 12 ml de sangre fresca durante un período de tiempo de aproximadamente 6 días, medido para seis botellas de control y para seis botellas con cultivos desarrollados de S epidermidis y Grupo B de estreptococos. La figura 40 contiene los mismos campos D y E que se muestran en la figura 36. Como puede verse, casi todos los controles están ubicados dentro del campo D. Los círculos completos en la figura 40 representan los datos de E coli, los cuadrados completos representan los datos de S epi y los diamantes son los datos del Grupo B de estreptococos. Si bien la separación entre los controles y S epi es muy similar a la separación entre los controles y E coli, la separación es aún mayor para el Grupo B de estreptococos.

Se pueden obtener resultados similares a los aquí expuestos con botellas de hemocultivo que contienen cultivos desarrollados de las siguientes especies de microorganismos:

S. aureus

Ps. aeruginosa

S. pneumoniae

E. cloacae

S. faecalis

K. pneumoniae

Grupo A Estreptococo

N. meningitidis

N. gonorrhoeae

5 Esta lista no es de ninguna manera incluyente o limitante con respecto a las realizaciones de la presente invención descritas en este documento. Esta lista se muestra simplemente como un ejemplo de algunos de los tipos de microorganismos que pueden detectarse utilizando el sistema y el método de las realizaciones de la presente invención.

10 Como se mencionó anteriormente, una botella que es "aún negativa" puede no contener ningún organismo o puede contener solo un número relativamente pequeño de organismos si ese paciente tiene de hecho una infección bacteriana. Se debe enfatizar que, en este caso de una "botella aún negativa", no importa qué organismos estén presentes. El método según una realización de la presente invención clasificará claramente la botella de cultivo como "aún negativa".

15 En realizaciones de la presente invención, los métodos (es decir, el método para determinar el volumen y el valor del hematocrito de una muestra de sangre y el método de diferenciación rápida entre hemocultivos positivos y negativos) pueden realizarse al mismo tiempo o en momentos separados (es decir, un método realizado antes del otro método). Si se realiza en diferentes momentos, los métodos se pueden realizar en cualquier orden.

20 El método de esta realización, además de su capacidad para diferenciar rápidamente entre botellas de hemocultivo positivas y negativas, también se puede aplicar para la detección de microorganismos en botellas de hemocultivo. Uno comenzaría exactamente como se describe anteriormente, pero sabría que todas las botellas bajo prueba aún son negativas. El método anterior se aplicaría a las botellas bajo prueba en un modo repetitivo cada diez minutos durante un período prolongado de tiempo, como cinco días. Si una población de microorganismos que está presente dentro de una botella particular ha crecido suficientemente en número, las características analíticas y las características procesadas según la presente invención mostrarán cambios, lo cual es una indicación de positividad.

30 Los métodos de la presente invención funcionan en botellas de hemocultivo aeróbicas con o sin perlas de resina. Los métodos también funcionan en botellas de hemocultivos líticos en los que los glóbulos rojos se rompen por medio de ciertos productos químicos. Otros tipos de recipientes de cultivo se pueden usar de manera similar. Los valores exactos obtenidos para las diferentes características analíticas dependen de los detalles específicos del aparato utilizado, como la longitud de onda del láser, el ángulo entre el haz de luz y una normal a la pared de la botella, como se explica, las condiciones de imagen y el fotodetector utilizado, entre otros. Los métodos también funcionan para detalles experimentales ligeramente modificados del aparato, si los datos de calibración requeridos se producen y se graban previamente en condiciones experimentales iguales.

40 En todas las realizaciones descritas anteriormente de la presente invención, un haz de luz se dirige hacia la pared de una botella de hemocultivo en un punto de impacto del haz primario de tal manera que el haz de luz se desvía de una normal a la pared de la botella en el punto de impacto del haz primario por un ángulo entre alrededor de cero y 90 grados. Si el ángulo se vuelve muy pequeño, la distribución espacial de la luz retrodispersada generada se vuelve cada vez más simétrica. Si bien la información generada en la distribución asimétrica es ventajosa, la distribución espacial simétrica también contiene información sobre el estado de la muestra de hemocultivo.

45 La figura 41 ilustra esquemáticamente un aparato según una realización de la presente invención similar al aparato de la figura 1A, pero con un dispositivo de imágenes en forma de una matriz de fibras ópticas. La figura 41 representa una configuración 700 alternativa en la que un haz de luz (107) emitido por una fuente óptica (106) se enfoca sobre la pared (101) de una botella (100) de hemocultivo por una lente (108) en punto de impacto (109) del haz primario en la interfaz (102) de la pared externa de la botella, en donde el haz de luz (107) se desvía de una normal (110) a la pared de la botella (101) en el punto de impacto (109) del haz primario en un ángulo Ω . El haz de luz (107) se refracta en la pared (101) y llega a la interfaz (103) de la pared interna de la botella en un punto de impacto (111) del haz secundario, donde ingresa a la suspensión de hemocultivo líquido, y genera una distribución de retrodispersión asimétrica espacial. Un conjunto de fibras ópticas (fibras) (114) se coloca contra la interfaz (102) de la pared externa de la botella y se mantiene en su lugar por medio de un bloque (112) para que los fotones reemitidos por el hemocultivo entren en el extremo de entrada de las fibras (114). Los extremos de salida de las fibras (114) están acoplados ópticamente en una matriz de dispositivos de carga acoplada (DCA) (113), que está conectada a un lector (115) de DCA dedicado. Debido al hecho de que las entradas de las fibras (114) están ubicadas cerca de la interfaz (102) de la pared externa, y las salidas de las fibras de dichas fibras (114) están cerca de la matriz DCA (113), la disposición que se muestra en la figura 41 puede denominarse "configuración de enfoque de proximidad".

60 Una realización adicional se ilustra en la figura 42. El aparato (80) de la figura 42 se diferencia del aparato de la figura 41 en que un láser (116) con una fibra (117) de excitación óptica adjunta está presente como una fuente óptica, en el que el extremo de salida de la fibra (117) de excitación está dispuesto en la interfaz (102) de la pared exterior de la pared (101) de la botella en un punto de impacto (109) del haz primario. En esta configuración, el eje de la fibra (117), en su extremo de salida, se desvía de una normal a la interfaz (102) de la pared de la botella en el

punto de impacto (109) del haz primario en un cierto ángulo. El aparato (80) de la figura 42 es sustancialmente similar a las disposiciones mostradas en las figuras 1A, 3A y 3B. El aparato (80) según la realización de la presente invención ilustrada en la figura 42 tiene la ventaja de que no se propagan haces ópticos al aire libre, que no se requiere un ajuste óptico de precisión de los elementos ópticos, y que el aparato (80) según la figura 42 puede ser algo más pequeño en tamaño.

Las figuras 43A y 43B ilustran una realización adicional. El aparato (100) de las figuras 43A y 43B es similar al aparato (80) en la figura 42 en el sentido de que hay una matriz de fibras (114) ópticas presentes para visualizar una segunda distribución (124) de luz de retrodispersión espacial asimétrica sobre un fotodetector (113). El aparato (100) también comprende una fibra (117) de excitación para dirigir la luz desde un láser (116) a la pared de la botella (101). Sin embargo, mientras que en el aparato de la figura 42 la salida de la fibra de excitación se coloca cerca de un extremo de la matriz de fibras, la salida de la fibra de excitación (117) en el aparato de la figura 43A se coloca cerca del centro de la matriz de fibras (114). El eje de la fibra (117) de excitación en su salida se desvía de una normal (125) a la pared externa en el punto de impacto (109) del haz primario en un cierto ángulo Φ . Al utilizar la configuración de las figuras 45A y 45B, se produce la segunda distribución (124) de luz de retrodispersión espacial asimétrica, similar a los casos de otros aparatos según las realizaciones de la presente invención descritas anteriormente. Al generar la segunda distribución (124) de luz de retrodispersión espacial asimétrica, se mejora la capacidad de diferenciar entre hemocultivos positivos y negativos con bajo volumen de sangre, como se describe con mayor detalle anteriormente. En la disposición de las figuras 43A y 43B, la matriz de fibras (114) adquiere una sección transversal de la segunda distribución (124) de luz de dispersión espacial asimétrica que está orientada perpendicular a la dirección utilizada en el aparato (60, 70, 80) según las realizaciones de la presente invención descrita arriba.

La figura 44A ilustra una realización que tiene dos fotodetectores para medir la intensidad de la luz que emerge de la botella de hemocultivo en dos ubicaciones diferentes. El aparato 300 mostrado en la figura 44A puede considerarse como una versión reducida del aparato de medición óptica de hemocultivo (50) mostrado en la figura 1A. El aparato (50) de la figura 1A muestra una sección completa de la distribución espacial de la luz retrodispersada en un plano y la registra utilizando un fotodetector (13). En el aparato (300) que se muestra en la figura 44A, solo se monitorea y registra la intensidad retrodispersada de dos ubicaciones separadas, en forma de puntos, de la distribución de la luz de retrodispersión espacial asimétrica. Al medir solo dos intensidades, se debe calcular una pendiente modificada. Además, en el aparato (50) de la figura 1A, se determina una distancia a lo largo de la pared de la botella sobre la cual la intensidad disminuye en un factor dado. En el aparato (100) de la figura 44A, sin embargo, se proporciona un factor que caracteriza la disminución de la intensidad en una distancia dada.

El aparato (300) de la figura 44A comprende una botella (101) de hemocultivo que tiene una pared (102) de la botella e incluye un tabique (103) para sellar la botella (101). La botella (101) contiene una mezcla de medios de crecimiento y sangre (104). Un haz de luz (107) emitido por una fuente de luz (106), como un láser, se dirige a un área ópticamente transparente de la pared (102) de la botella en un primer punto de impacto (111). El haz de luz (107) se coloca de manera que se desvíe desde la normal a la pared (102) de la botella en el primer punto de impacto (111) en un ángulo específico. El haz de luz (107) genera entonces una distribución de luz de dispersión espacial asimétrica de la mezcla de medios de crecimiento y sangre (mezcla) (104) cerca del primer punto de impacto (111). El haz de luz (107) se desvía de la normal a la pared (102) de la botella en el primer punto de impacto (111) principalmente para evitar que los fotones de láser reflejados regresen al láser. Este ángulo puede ser muy pequeño, sin embargo, y, por lo tanto, no se muestra en la figura 44A.

Un primer fotodetector (112) del aparato está montado adyacente a la pared (102) de la botella en un primer lugar con un ángulo Ω_1 de aproximadamente 90 grados desde el primer punto de impacto (111), y recibe luz retrodispersada de la sangre (104). Un segundo fotodetector (113) del aparato está montado adyacente a la pared (102) de la botella en un segundo lugar con un ángulo Ω_2 de aproximadamente 135 grados desde el primer punto de impacto (111), y también recibe luz retrodispersada de la mezcla (104).

La figura 44B ilustra un diagrama de bloques esquemático de un sistema (150) de medición óptica de hemocultivo del tipo mostrado en la figura 46A. El láser (106) está conectado a un controlador láser del sistema (123) de medición óptica de hemocultivo, que a su vez está conectado a un ordenador (125). La salida del primer fotodetector (112) está conectada con un primer convertidor (114) A/D, y la salida del primer convertidor (114) A/D está conectada al ordenador (125). De forma correspondiente, la salida del segundo fotodetector (113) está conectada a un segundo convertidor (115) A/D, y la salida del segundo convertidor (115) A/D también está conectada al ordenador (125).

Ejemplo 20 la figura 45 es un gráfico que ilustra datos que representan el ratio de intensidad medida en el sistema de medición óptica de hemocultivo de las figuras 44A y 44B, por lo que el primer y segundo fotodetectores se colocaron lejos del primer punto de impacto en posiciones angulares de aproximadamente 90 grados y aproximadamente 135 grados respectivamente a lo largo de la circunferencia de la botella. (De lo contrario, el aparato se configuró y usó los mismos componentes, como se describe en el Ejemplo 1.) La figura 45 muestra el ratio entre las fotocorrientes registradas por el primer fotodetector y el segundo fotodetector, que corresponde a un ratio de intensidad de retrodispersión del primero y las segundas localizaciones. Todas las mediciones ilustradas en

5 la figura 45 se realizaron utilizando sangre con un valor del hematocrito de aproximadamente el 35%. Como se puede ver en la figura 45, la proporción es proporcional al volumen de la mezcla en la tercera botella dentro del rango de volumen de aproximadamente 0,5 a 10 ml. La ventaja de una disposición según las figuras 44A y 44B es su simplicidad. No se requieren fotodetectores de imágenes o de movimiento, y solo se deben procesar dos fotocorrientes.

10 La presente invención se ha descrito con referencia a varias realizaciones ejemplares. Sin embargo, será fácilmente evidente para los expertos en la materia que es posible incorporar la invención en formas específicas distintas de las de los ejemplos de realización descritos anteriormente. Esto se puede hacer sin apartarse del alcance de la invención. Las realizaciones ejemplares son meramente ilustrativas y no deben considerarse restrictivas de ninguna manera. El alcance de la invención está dado por las reivindicaciones adjuntas, en lugar de la descripción anterior, y todas las variaciones y equivalentes, que se encuentran dentro del rango de las reivindicaciones, pretenden incluirse en ellas.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema (70,80) para realizar mediciones ópticas en un recipiente (1) que comprende un líquido (5,104), el sistema comprende:
- 5 una fuente óptica (6,106) adaptada para dirigir un haz de luz (7,117) hacia una pared del recipiente en una primera ubicación (9,109), en donde el haz de luz se desvía de una normal (10,110) a la pared del recipiente en la primera ubicación por un primer ángulo, generando una distribución (15,124) espacial asimétrica de luz retrodispersada del líquido cerca de la primera ubicación;
- 10 un dispositivo de imágenes (12,114) adaptado para visualizar la distribución espacial asimétrica de la luz retrodispersada en donde el dispositivo de imágenes está ubicado para evitar sustancialmente las imágenes de las porciones del haz de luz (14) reflejadas por las superficies (2,3,102,103) externas e internas de las paredes de la botella;
- 15 un detector de imágenes (13,113) adaptado para registrar al menos partes de la distribución espacial asimétrica de la imagen de la luz retrodispersada; y
un sistema (24,25,115,125) de análisis de datos conectado al detector de imágenes adaptado para extraer características analíticas de la distribución espacial asimétrica de la luz retrodispersada.
2. Un sistema (70, 80) según la reivindicación 1, que comprende además un recipiente cilíndrico que comprende un líquido.
3. Un sistema (70, 80) según la reivindicación 2, en donde el recipiente es una botella de hemocultivo que comprende sangre y medios de crecimiento.
4. Un sistema (70,80) según la reivindicación 1, en donde la fuente óptica (6,106) se selecciona del grupo que consiste en un láser y un diodo emisor de luz.
5. Un sistema (70,80) según la reivindicación 1, en donde la fuente óptica (6,106) está adaptada para emitir luz con una longitud de onda de aproximadamente 500 a aproximadamente 1500 nm o con una longitud de onda de aproximadamente 640 a aproximadamente 720 nm.
6. Un sistema (70,80) según la reivindicación 2, en donde la fuente óptica (6,106) está adaptada para producir el haz de luz (7,117) para propagarse dentro de un plano sustancialmente perpendicular o sustancialmente paralelo al eje de simetría del recipiente.
7. Un sistema (70,80) según la reivindicación 1, en donde la fuente óptica (6,106) está adaptada para modular la intensidad del haz de luz (7,117).
8. Un sistema (70, 80) según la reivindicación 1, en donde el primer ángulo está por debajo de aproximadamente 90 grados, entre aproximadamente 25 y aproximadamente 45 grados, o en el que el primer ángulo es de aproximadamente 35 grados.
9. Un sistema (70,80) según la reivindicación 1, en donde el dispositivo de imágenes (12,114) se selecciona del grupo que consiste en una lente y un conjunto de fibras ópticas.
10. Un sistema (70,80) según la reivindicación 1, en donde el detector (13,113) de imágenes es un fotodetector.
11. Un sistema (70, 80) según la reivindicación 10, en donde el fotodetector se selecciona del grupo que consiste en una cámara optoelectrónica, una cámara 2D digital, una matriz de DCA 2D y una matriz de DCA lineal.
12. Un sistema (70,80) según la reivindicación 1 o 10, en donde el fotodetector y/o el dispositivo de imágenes (12,114) están adaptados para moverse a lo largo de un eje para registrar al menos partes de la distribución espacial asimétrica de la luz retrodispersada.
13. Un sistema (70,80) según la reivindicación 7, en donde el sistema (24,25,115,125) de análisis de datos comprende dispositivos de detección síncronos.
14. Un sistema (70,80) según la reivindicación 3, en donde el sistema (24,25,115,125) de análisis de datos se adapta adicionalmente para proporcionar datos para determinar al menos un parámetro seleccionado del grupo que consiste en la presencia o ausencia de población desarrollada de microorganismos, el volumen de la muestra líquida (5,104) y el valor del hematocrito de la muestra líquida
15. Un sistema (70,80) según la reivindicación 2, en donde la primera ubicación (9,109) está en una parte cilíndrica del recipiente.

16. Un sistema (70,80) según la reivindicación 2, en donde la primera ubicación (9,109) está en una parte no cilíndrica del recipiente.
- 5 17. Un sistema (70,80) según la reivindicación 16, en donde la primera ubicación (9,109) está en el fondo del recipiente.
18. Un método para realizar mediciones ópticas en un recipiente (1) que comprende:
- 10 proporcionar un recipiente (1) que comprende una muestra líquida (5,104);
dirigir un haz de luz (7,117) sobre una pared ópticamente transparente del recipiente en una primera ubicación (9,109), de manera que el haz de luz se desvíe desde una normal (10,110) a la pared del recipiente en la primera ubicación en un primer ángulo, generando una distribución (15,124) espacial asimétrica de luz retrodispersada de la muestra líquida en el recipiente cerca de la primera ubicación;
- 15 detectar al menos una porción de la distribución espacial asimétrica de la luz retrodispersada mientras se evita sustancialmente la detección de porciones del haz de luz (14) reflejada por las superficies externa e interna del recipiente; y extraer características analíticas de la distribución espacial asimétrica de la luz retrodispersada.
19. Un método según la reivindicación 18, en donde el haz de luz (17,117) se dirige desde una fuente óptica (6,116) seleccionada del grupo que consiste en un láser y un diodo emisor de luz.
20. Un método según la reivindicación 19, en donde la fuente óptica (6,116) está adaptada para proporcionar un haz de luz de intensidad modulada.
- 25 21. Un método según la reivindicación 18, que comprende, además:
- dirigir la luz (7,107) desde la fuente (6,106) a través de una lente (8,108), para enfocar el haz sobre la pared del recipiente (1).
- 30 22. Un método según la reivindicación 18, en donde el paso de dirigir el haz de luz (7,107) comprende:
- emitir un haz de luz a una longitud de onda de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 1500 nm.
- 35 23. Un método según la reivindicación 22, en donde la longitud de onda es aproximadamente 640 a aproximadamente 720 nm.
24. Un método según la reivindicación 18, en donde el recipiente (1) es una botella cilíndrica, y en donde el haz de luz (7,107) se propaga dentro de un plano sustancialmente perpendicular o sustancialmente paralelo al eje de simetría de la botella.
- 40 25. Un método según la reivindicación 18, que comprende además el paso de:
- formar imágenes de la distribución espacial asimétrica a través de un dispositivo de imágenes (12,114).
- 45 26. Un método según la reivindicación 25, en donde el dispositivo de imágenes (12,114) se selecciona de una lente y una matriz de fibras ópticas.
27. Un método según la reivindicación 25, en donde el paso de detección comprende detectar al menos partes de la distribución espacial de la imagen de luz retrodispersada con un fotodetector (13,113).
- 50 28. Un método según la reivindicación 27, en donde el fotodetector se selecciona del grupo que consiste en una cámara optoelectrónica, una cámara 2D digital, una matriz de DCA 2D y una matriz de DCA lineal.
29. Un método según la reivindicación 18, en donde la muestra líquida (5,104) comprende sangre y medios de crecimiento, y en donde el paso de extracción de características analíticas de la distribución (15,124) espacial asimétrica de la luz retrodispersada comprende:
- 55 analizar los datos para determinar al menos un parámetro seleccionado del grupo que consiste en la presencia o ausencia de una población desarrollada de microorganismos, el volumen de la muestra líquida (5,104) y el valor del hematocrito de la muestra líquida.
- 60 30. Un método según la reivindicación 20, en donde el sistema (24,25,115,125) de análisis de datos comprende dispositivos de detección síncronos.
- 65 31. Un método según la reivindicación 29 o 30, en donde el análisis de datos se realiza mediante un sistema (24,25,115,125) de análisis de datos conectado a un detector de imágenes (13,113), en donde el sistema de análisis

de datos está adaptado para registrar al menos partes de la distribución espacial de la imagen de la luz retrodispersada.

- 5 32. Un método según la reivindicación 18, en donde el primer ángulo está entre por debajo de aproximadamente 90 grados.
33. Un método según la reivindicación 32, en donde el primer ángulo está entre aproximadamente 25 y aproximadamente 45 grados.
- 10 34. Un método según la reivindicación 33, en donde el primer ángulo es de aproximadamente 35 grados.
35. Un método según la reivindicación 18, en donde el recipiente (1) es cilíndrico, y en donde la primera ubicación (9,109) está en una parte cilíndrica del recipiente.
- 15 36. Un método según la reivindicación 18, en donde el recipiente (1) es cilíndrico, y en donde la primera ubicación está en una parte no cilíndrica del recipiente.
37. Un método según la reivindicación 36, en donde la primera ubicación (9,109) está en el fondo del recipiente (1).
- 20 38. Un método según la reivindicación 31, que comprende además el paso de: mover el detector (13,113) de imágenes a lo largo de un eje para registrar partes de la distribución (15,124) espacial asimétrica de la luz retrodispersada.
- 25 39. Un método según la reivindicación 22, en el que la muestra líquida (5,104) comprende medios de crecimiento y sangre; comprendiendo además el paso de:
- determinar el volumen y el valor del hematocrito de la muestra en el recipiente sellable comparando las características analíticas extraídas o los datos generados a partir de la información de calibración.
- 30 40. Un método según la reivindicación 39, en donde la etapa de determinación comprende:
- generar una primera característica analítica procesada combinando dos o más de las características analíticas extraídas; y determinar la combinación del volumen y el valor del hematocrito del hemocultivo basándose en la primera característica analítica procesada.
- 35 41. Un método según la reivindicación 39, en donde la etapa de determinación comprende calcular el producto matemático del volumen y el valor del hematocrito.
- 40 42. Un método según la reivindicación 18, en donde la muestra líquida (5,104) comprende medios de crecimiento y sangre; que comprende además la etapa de:
- determinar la presencia o ausencia de una población de microorganismos desarrollados dentro del recipiente (1) comparando las características analíticas extraídas o los datos generados con la información de calibración.
- 45 43. Un método según la reivindicación 39 o 42, que comprende además la etapa de formación de imágenes de la distribución (15,124) espacial asimétrica a través de un dispositivo de imágenes (12,114).
44. Un método según la reivindicación 43, en donde la formación de imágenes se realiza en un plano.
- 50 45. Un método según la reivindicación 39 o 42, en donde la etapa de extracción comprende:
- usar un sistema (24,25,115,125) de análisis de datos conectado al dispositivo (13,113) de detección; en donde el dispositivo de detección comprende un fotodetector; y en donde el sistema de análisis de datos está adaptado para registrar al menos partes de la distribución espacial asimétrica de la luz retrodispersada y además está adaptado para extraer características analíticas de la distribución espacial asimétrica registrada de la luz retrodispersada.
- 55 46. Un método según la reivindicación 39 o 42, en donde el paso de extracción comprende:
- Extraer una o más características seleccionadas del grupo que consiste en una característica analítica de intensidad de retrodispersión máxima (IMAX), una característica analítica de intensidad de retrodispersión en el punto de impacto de luz (IEPIL), una característica analítica de la amplitud máxima en la mitad del IMAX, y una característica analítica de la pendiente (PE) del flanco que decae lentamente de la distribución espacial asimétrica de la luz retrodispersada
- 60 47. Un método según la reivindicación 46, en donde las características analíticas extraídas se extraen de la distribución espacial asimétrica de la luz retrodispersada según se mide a lo largo del eje X, en donde el eje X está
- 65

orientado a lo largo de la pared del recipiente dentro de un plano que comprende el haz de luz; y en donde las características analíticas extraídas comprenden una amplitud máxima en la mitad del IMAX en el eje X (AMMMX) y una pendiente en el eje X (PEX).

5 48. Un método según la reivindicación 47, en donde la pendiente PEX es una inversa de una distancia a lo largo del eje X de una distribución de luz registrada sobre la cual la intensidad disminuye en un primer factor.

49. Un método según la reivindicación 47, que comprende además el paso de extraer una amplitud máxima en la mitad del IEPIL (AMMMX *) medido a lo largo del eje X.

10 50. Un método según la reivindicación 46, en donde las características analíticas extraídas se extraen de la distribución (15,124) espacial asimétrica de luz retrodispersada según se mide a lo largo del eje Y, en donde el eje Y está orientado a lo largo del recipiente o la pared de la botella dentro de un plano perpendicular al recipiente o pared de la botella; en donde la distribución espacial asimétrica comprende el área de una intensidad máxima de retrodispersión registrada (IMAX), pero que se extiende perpendicular al eje X; y en donde las características analíticas extraídas comprenden una amplitud máxima en la mitad del IMAX en el eje Y (AMMMY) y una pendiente en el eje Y (PEY).

15 51. Un método según la reivindicación 50, en donde la pendiente PEY es una inversa de una distancia a lo largo del eje Y de una distribución de luz registrada sobre la cual la intensidad disminuye en un segundo factor.

20 52. Un método según la reivindicación 50, que comprende además el paso de extraer una pendiente medida a lo largo de una dirección Y paralela al eje Y en un plano que comprende el área de una intensidad de retrodispersión en el punto de impacto de la luz (IEPIL).

25 53. Un método según la reivindicación 50, que comprende además el paso de extracción es una amplitud AMMMY*; y en donde AMMMY* es una amplitud máxima en la mitad del IEPIL y se mide a lo largo de una dirección Y paralela al eje Y en un plano que comprende el área de una intensidad de retrodispersión en el punto de impacto de la luz (IEPIL).

30 54. Un método según la reivindicación 50, en donde una pendiente PEY* es una inversa de una distancia a lo largo del eje Y de una distribución de luz registrada sobre la cual la intensidad disminuye en un tercer factor.

35 55. Un método según la reivindicación 39 o 42, en donde el paso de extracción comprende:
acumular una cantidad de píxeles en una imagen bidimensional de la distribución (15,124) espacial asimétrica de la luz retrodispersada que tiene una intensidad de píxeles que excede un primer umbral.

40 56. Un método según la reivindicación 39 o 42, en donde el paso de extracción comprende:
sumar sustancialmente todas las intensidades de píxeles en una imagen bidimensional de la distribución (15,124) espacial asimétrica de la luz retrodispersada.

45 57. Un método según la reivindicación 43, en donde el paso de determinación comprende:
generar una primera característica analítica procesada al combinar dos o más de las características analíticas extraídas;
comparar la primera característica analítica procesada con una primera constante, y determinar que la botella (1) de hemocultivo está ausente de microorganismos desarrollados si la primera característica analítica procesada es mayor que la primera constante; y
50 determinar que la presencia de microorganismos desarrollados es probable en la botella de hemocultivo si la primera característica analítica procesada es menor que la primera constante.

55 58. Un método según la reivindicación 57, que comprende, además:
comparar la primera característica analítica procesada con una segunda constante si se ha determinado que la primera característica analítica procesada es menor que la primera constante.

60 59. Un método según la reivindicación 57, en el que la primera característica analítica procesada se genera según la siguiente ecuación:

$$Q5 = \frac{10^4 * (IEPIL * AMMM)^{1.5}}{PE}$$

60. Un método según la reivindicación 57, en donde la primera constante es aproximadamente 2,5 y la segunda constante es aproximadamente 1,3.

5 61. Un método según la reivindicación 42, en donde el paso de determinación comprende:
trazar, o realizar un cálculo indicativo de tal trazado, dos o más de las características analíticas extraídas del
recipiente (1) en un gráfico bidimensional junto con las características analíticas extraídas idénticas de un
conjunto de calibración; y
10 verificar la presencia o ausencia de los microorganismos desarrollados en función de la proximidad de las
características analíticas extraídas representadas del recipiente con la de las características analíticas
extraídas representadas de la botella de hemocultivo de control.

15 62. Un método según la reivindicación 42, en donde, en dicha etapa de determinación, dichos datos generados se
comparan con dicha información de calibración repitiendo los pasos de dirección, detección, extracción y
determinación una o más veces.

63. Un método según la reivindicación 62, en donde la repetición se realiza a intervalos de aproximadamente diez
minutos.

20 64. Un método según la reivindicación 63, en donde la repetición se realiza a intervalos de aproximadamente diez
minutos, durante un período de aproximadamente cinco días.

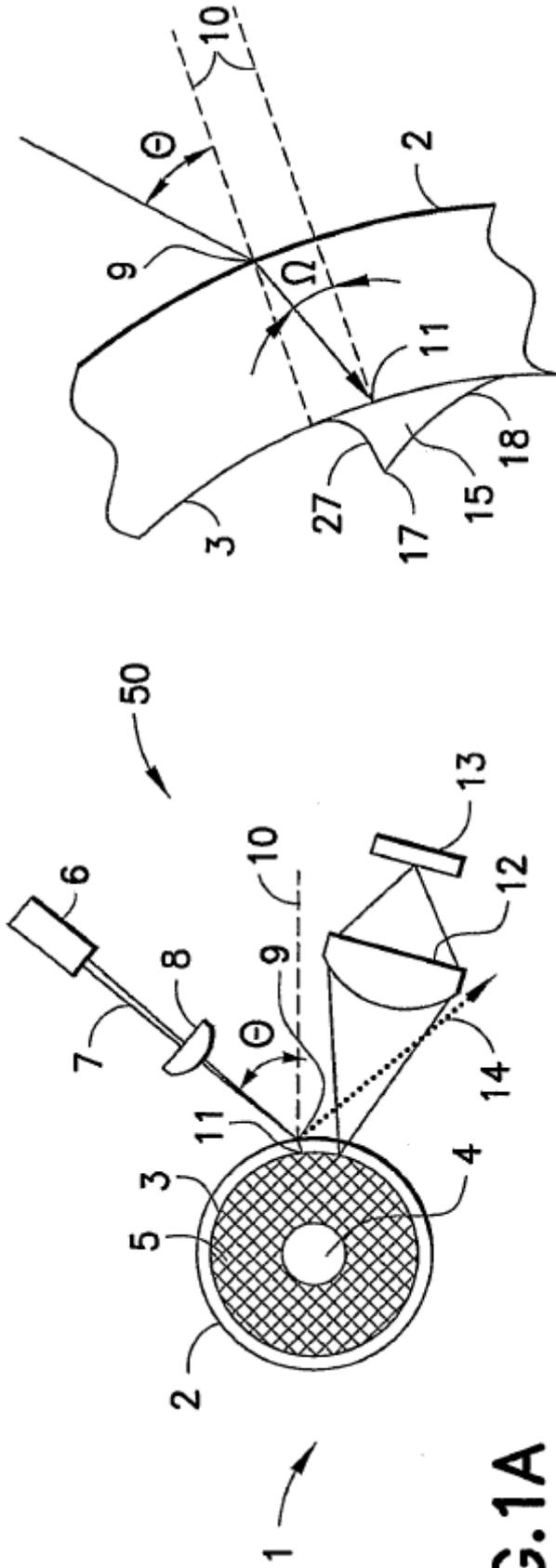


FIG. 1A

FIG. 1C

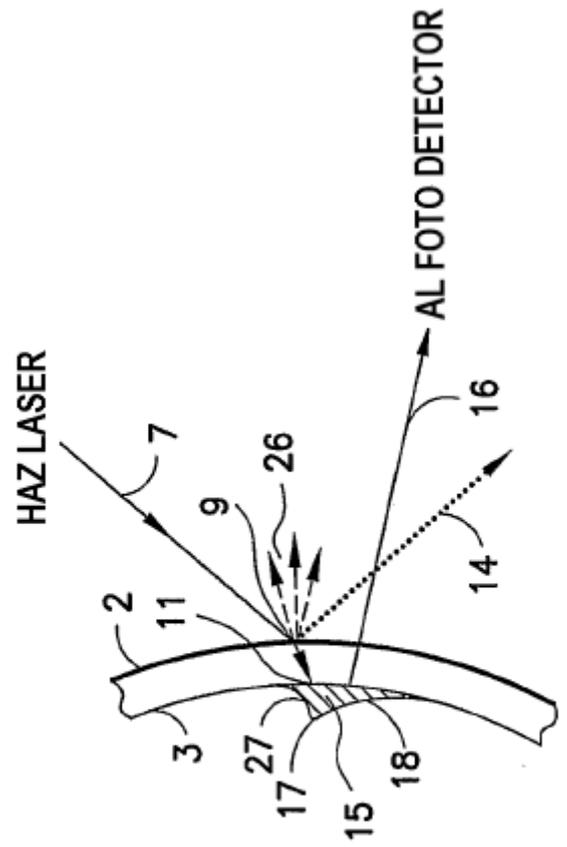


FIG. 1B

FIG.2A

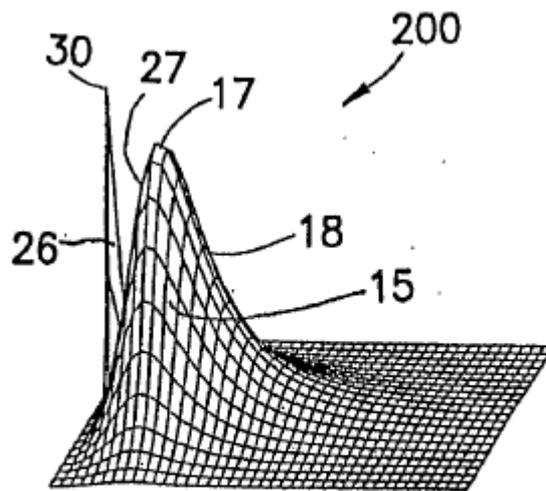
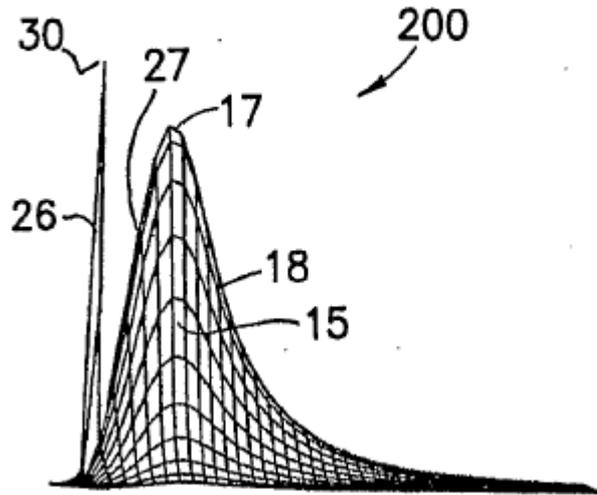


FIG.2B

FIG.2C

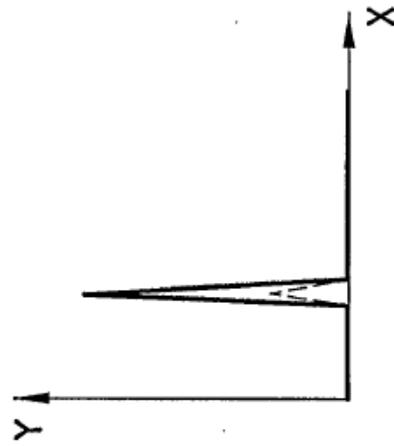
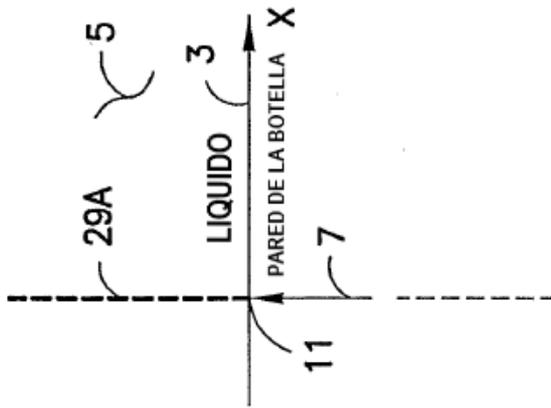


FIG.2E

FIG.2D

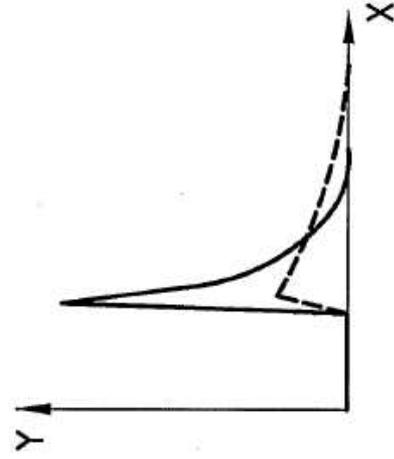
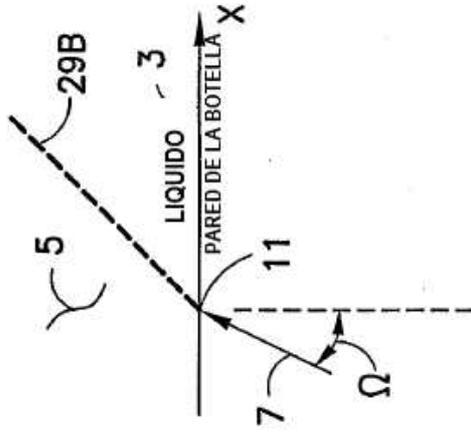


FIG.2F

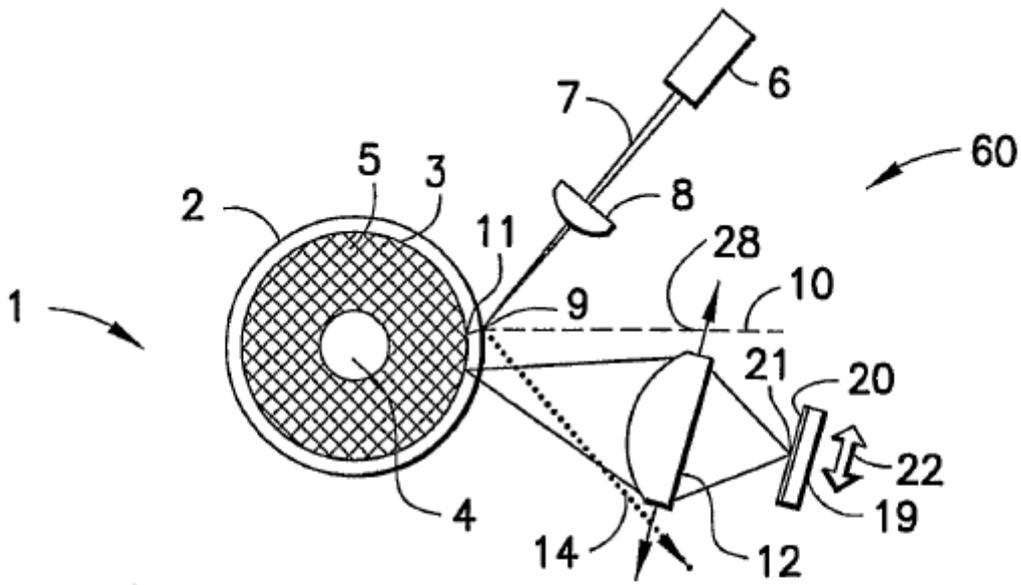


FIG.3A

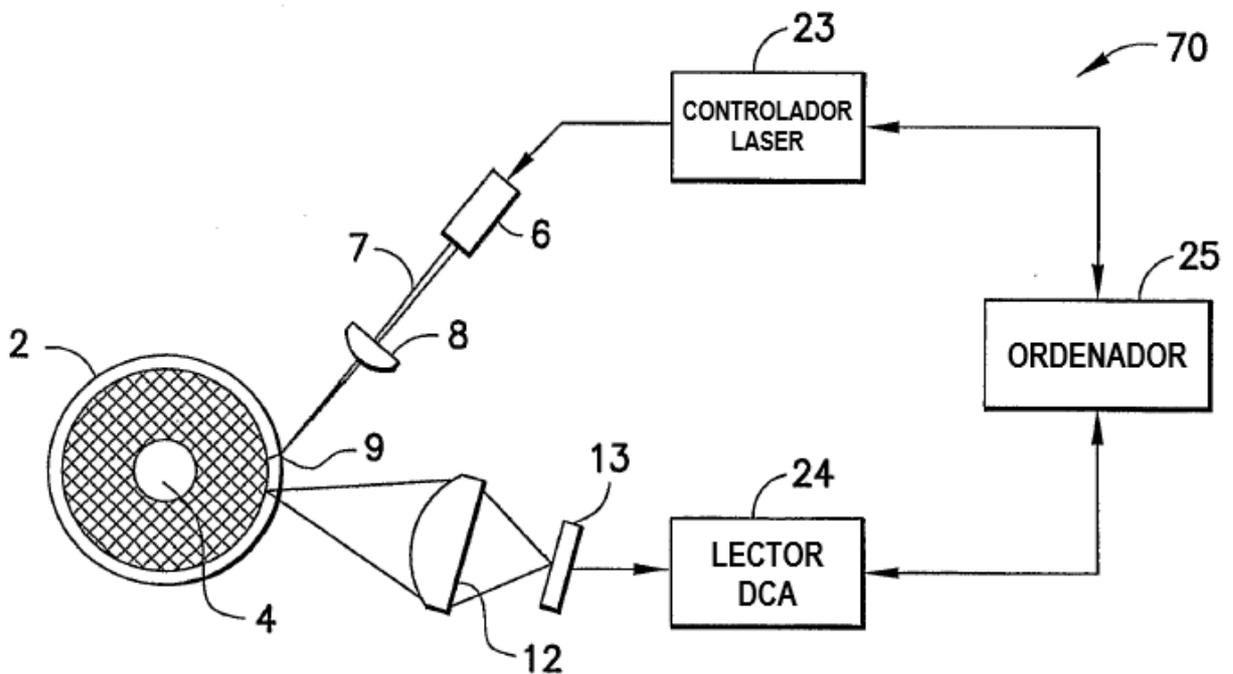


FIG.3B

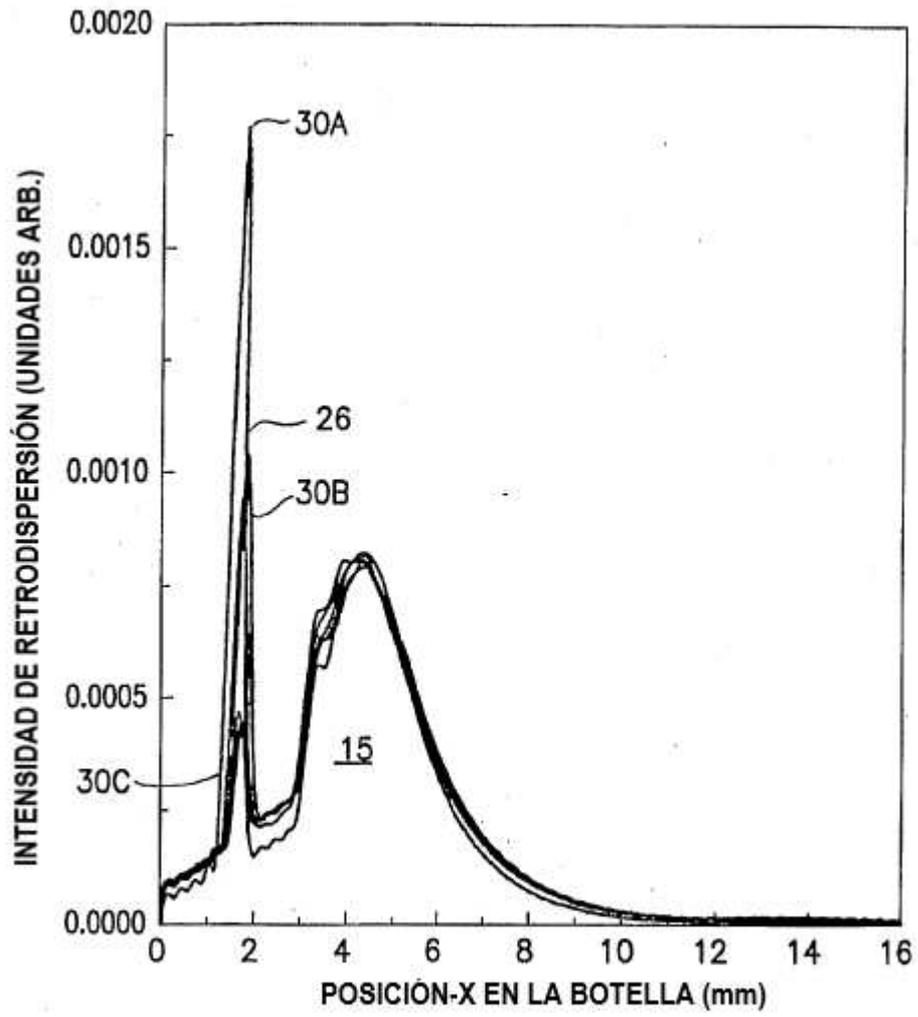


FIG.4

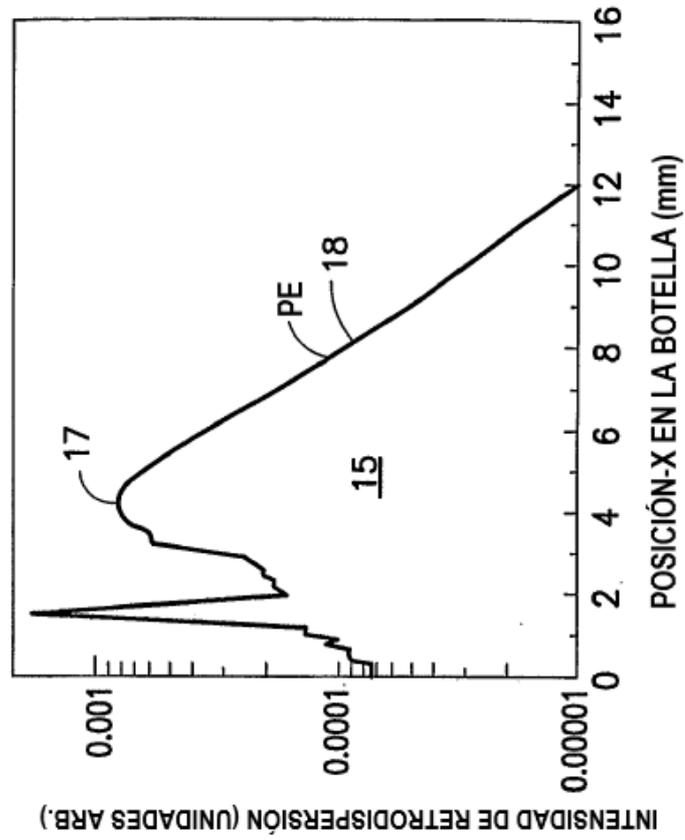


FIG.5

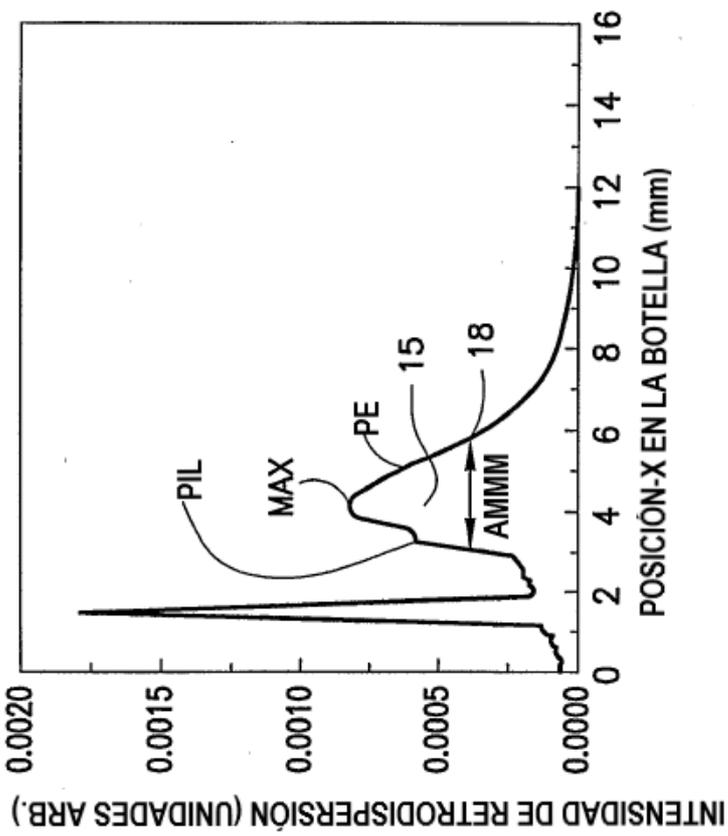


FIG.6

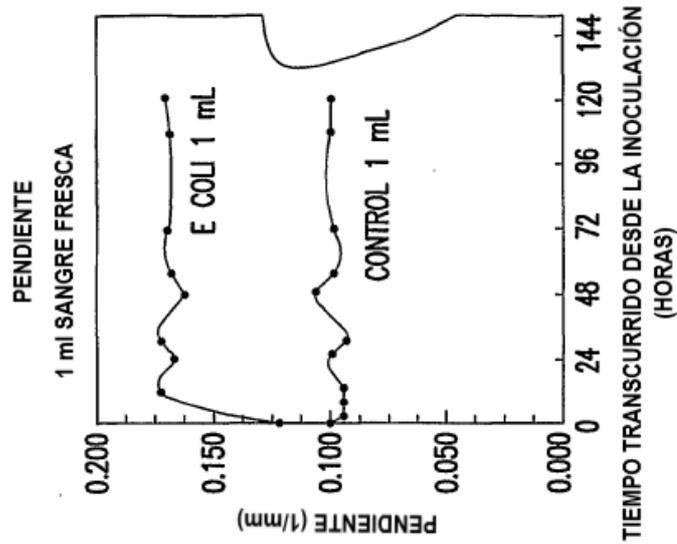


FIG.7C

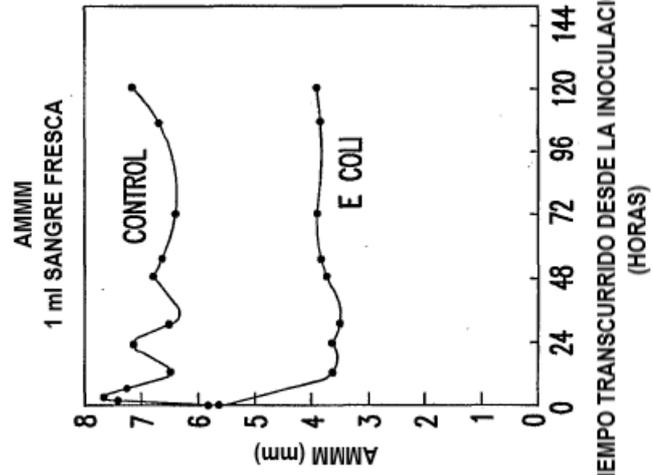


FIG.7B

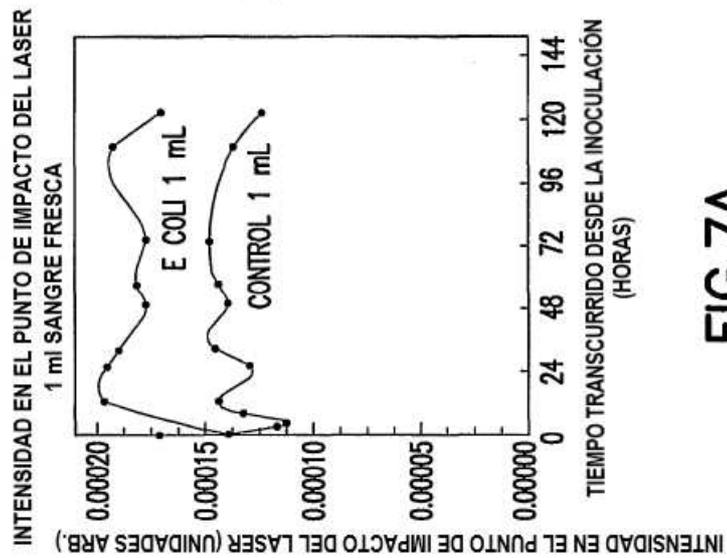


FIG.7A

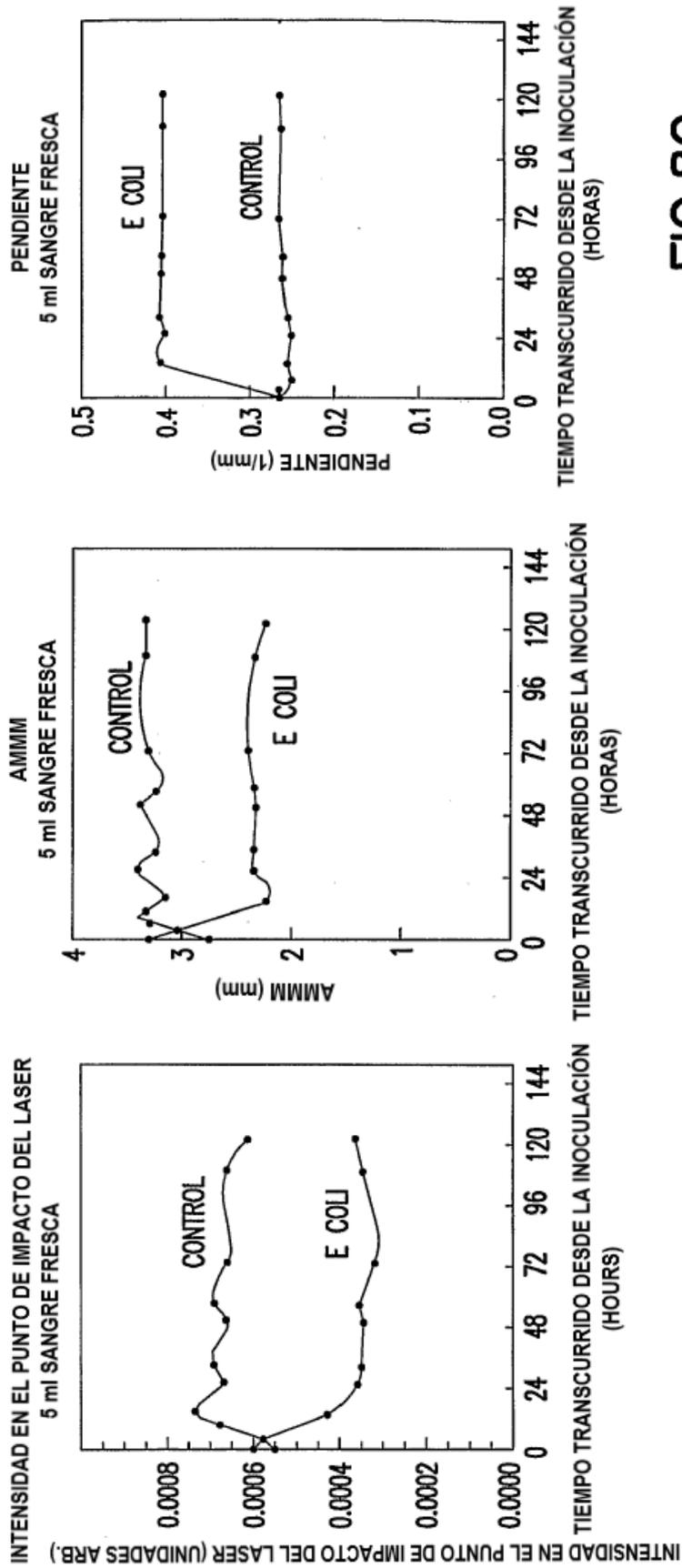


FIG. 8A

FIG. 8B

FIG. 8C

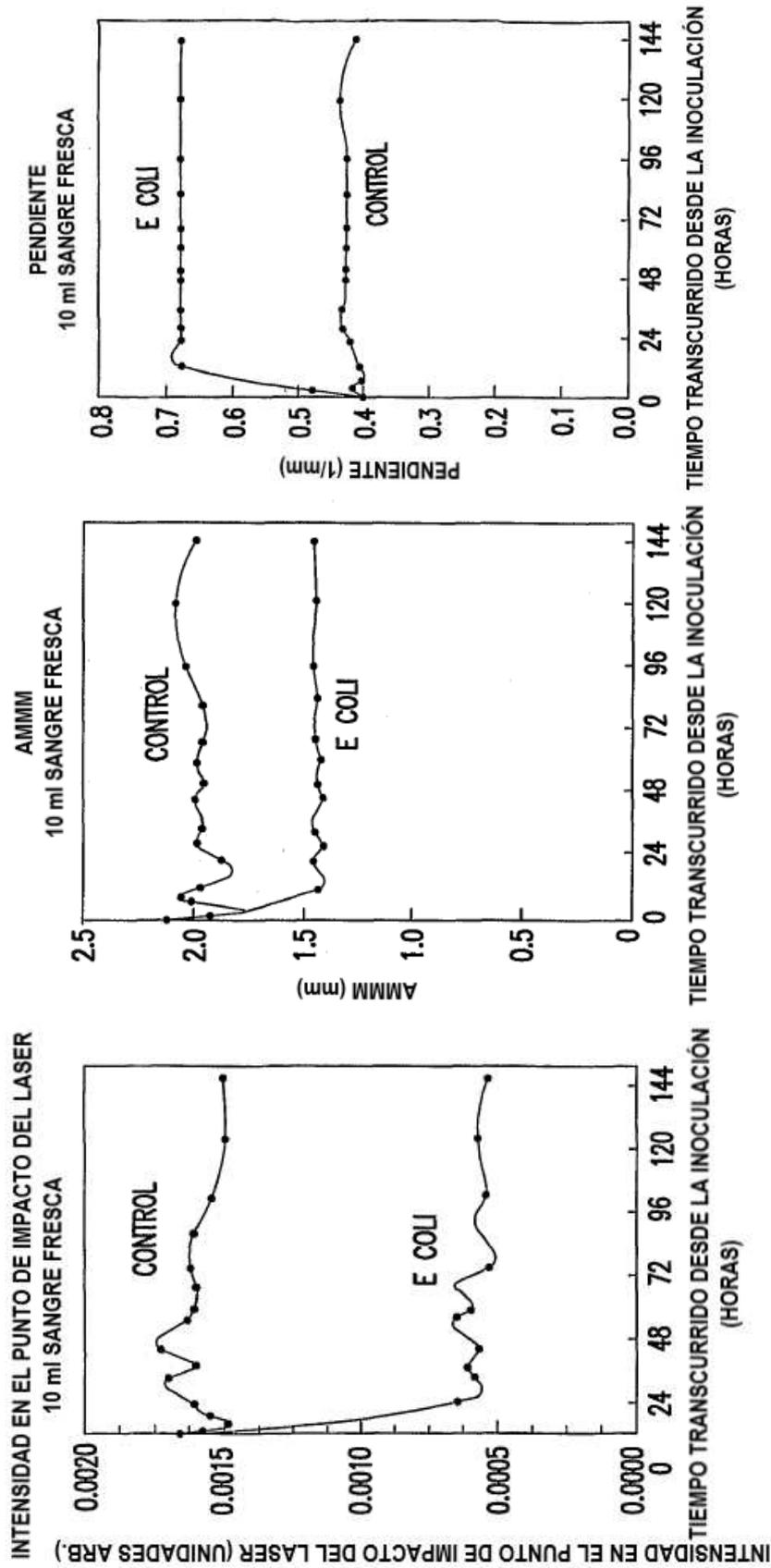


FIG.9C

FIG.9B

FIG.9A

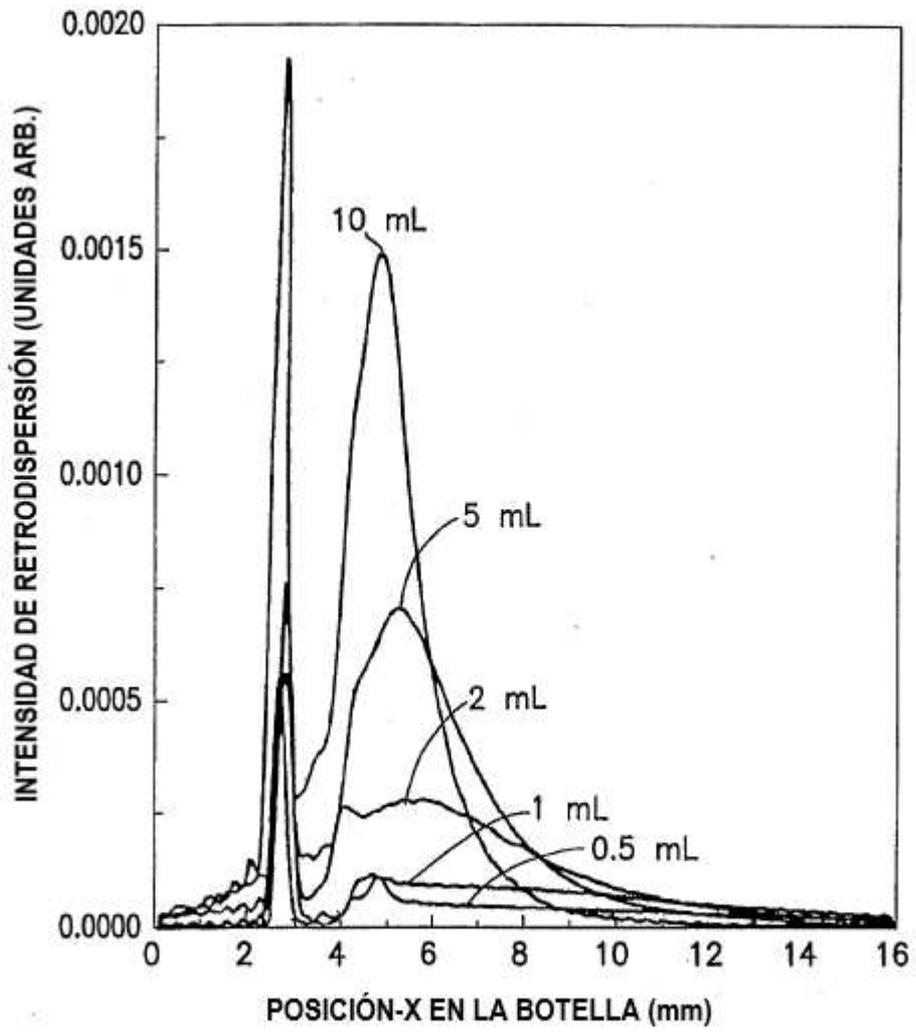


FIG.10

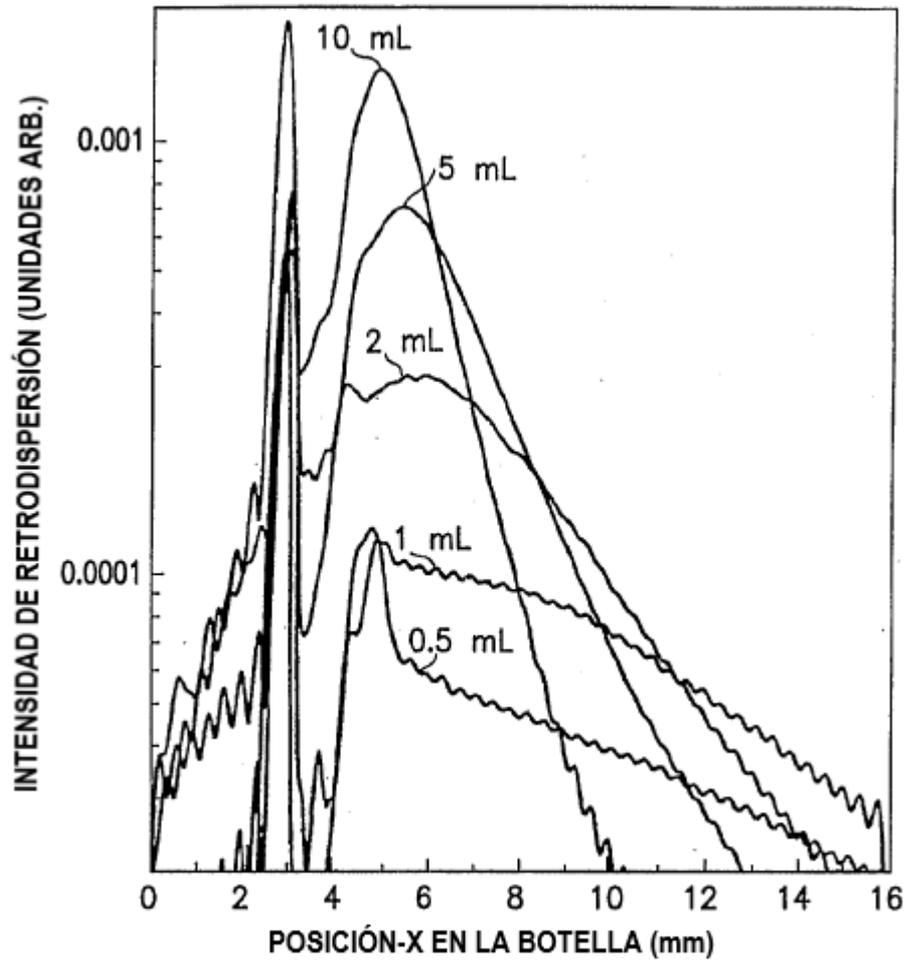


FIG.11

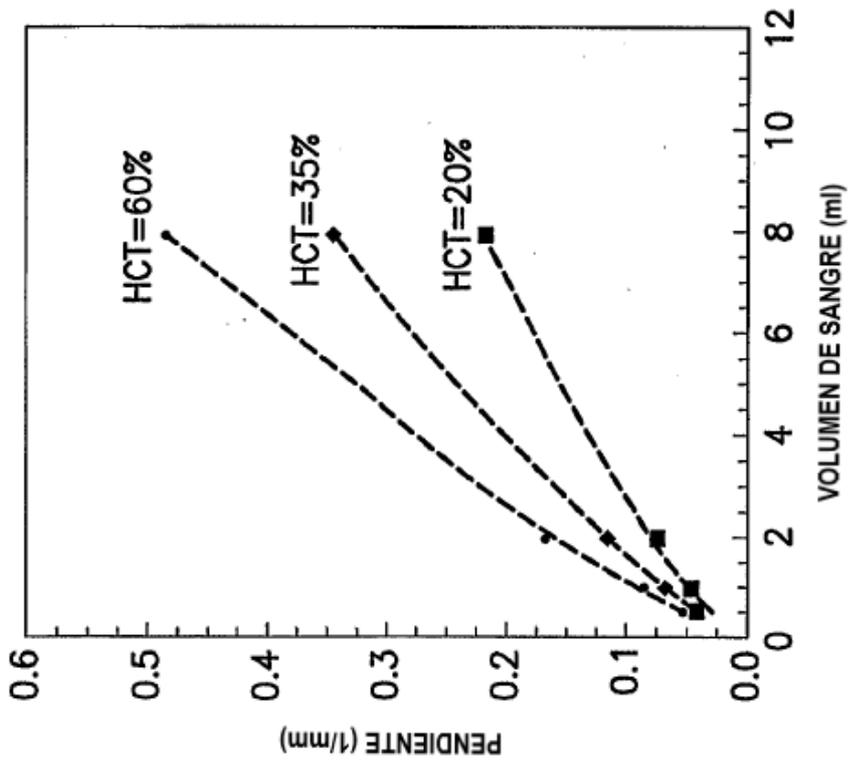


FIG.12

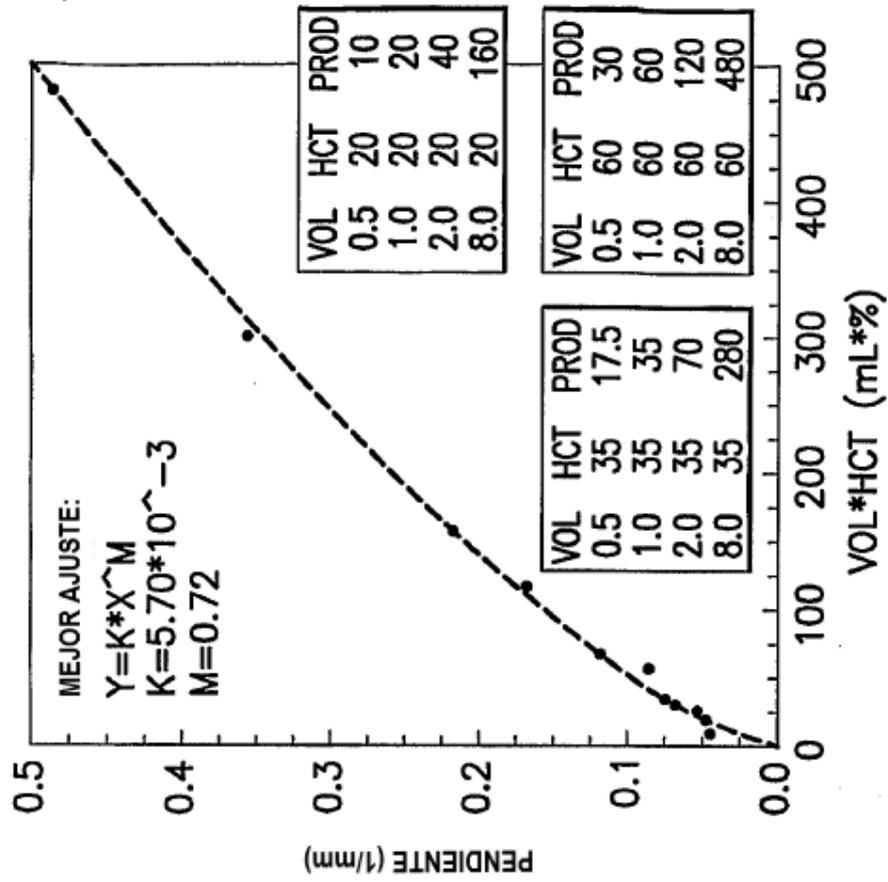


FIG.13

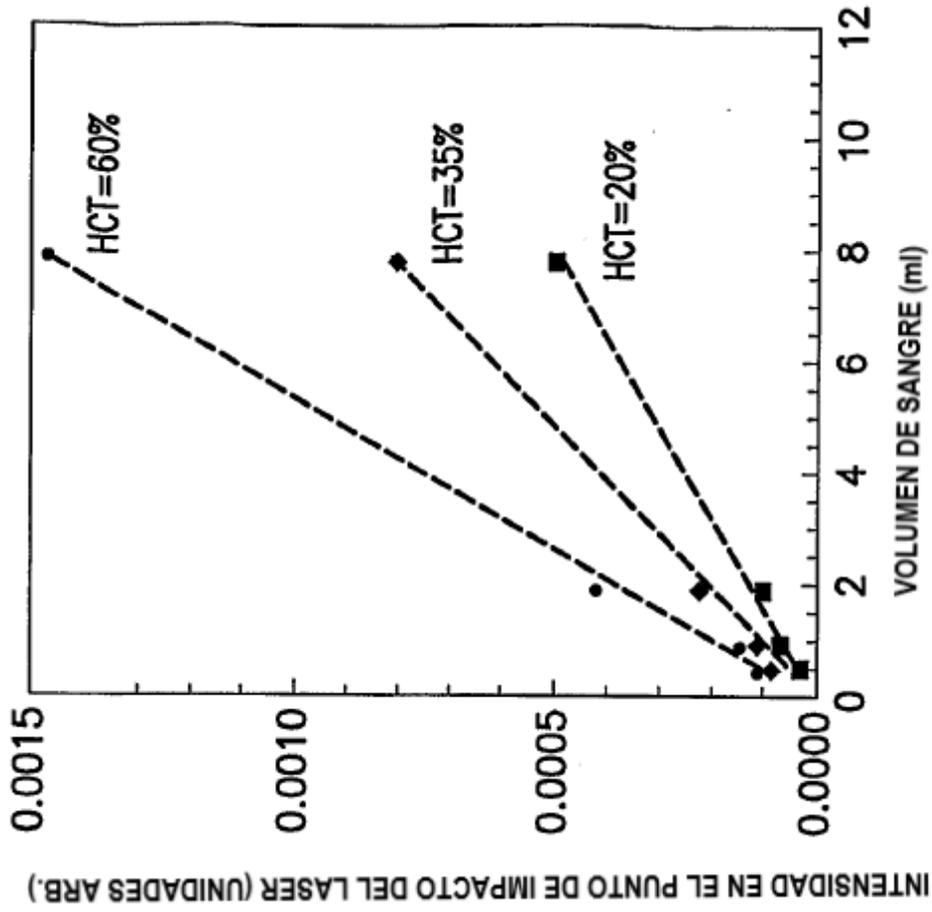


FIG.15

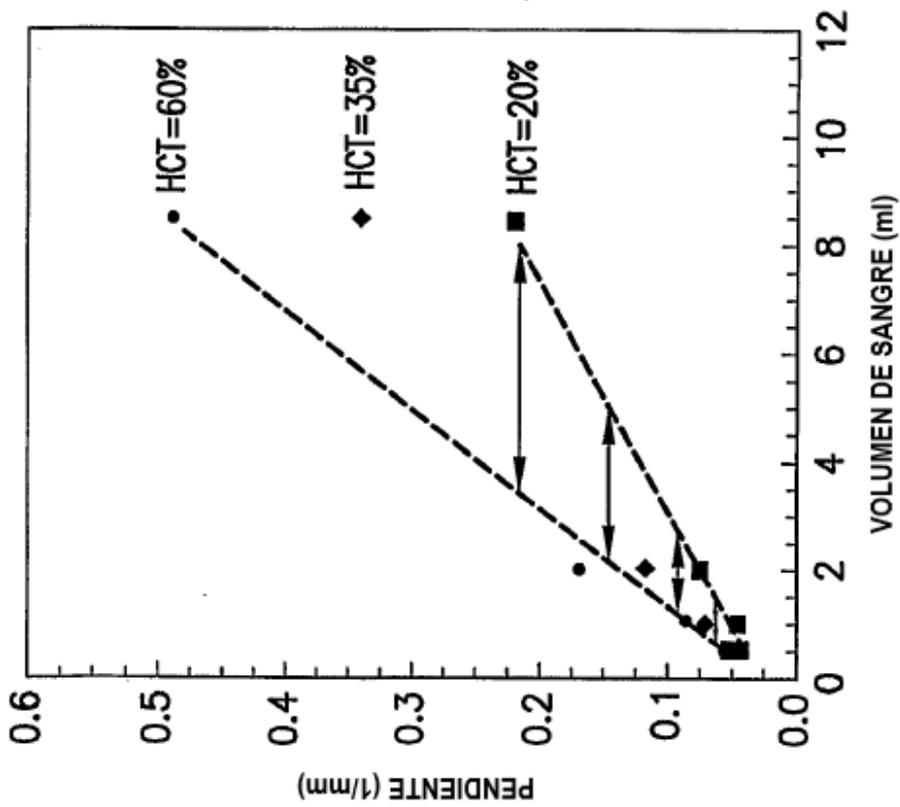


FIG.14

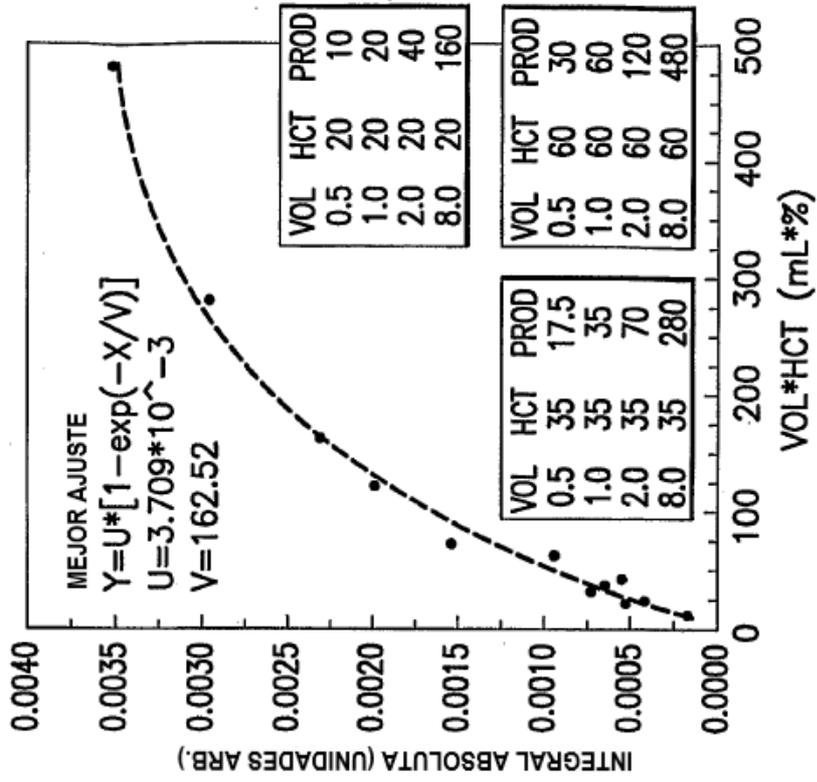


FIG.16

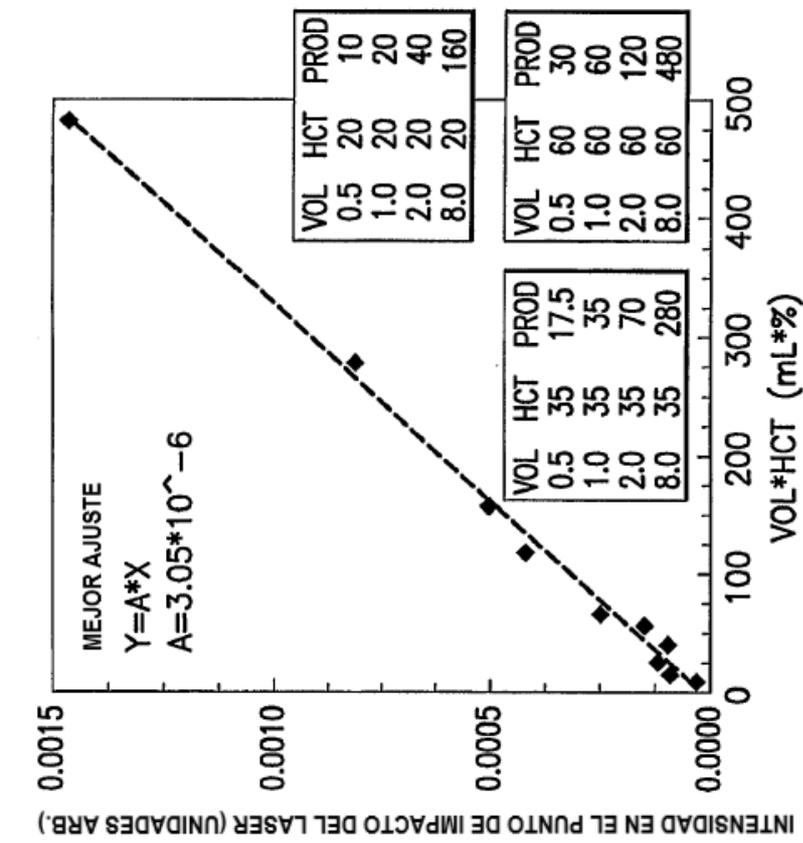


FIG.17

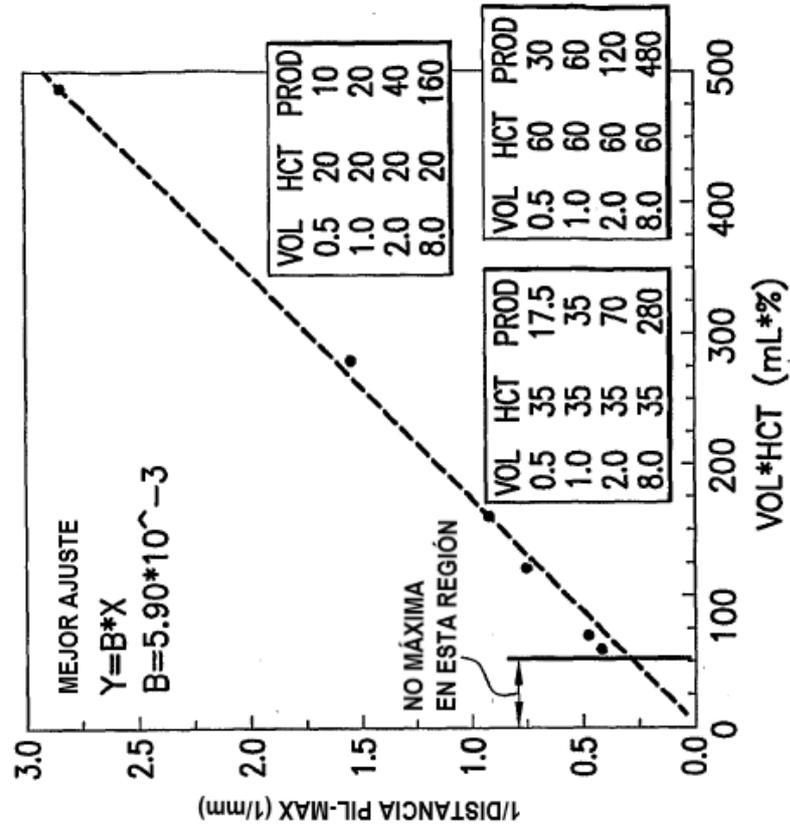


FIG.18

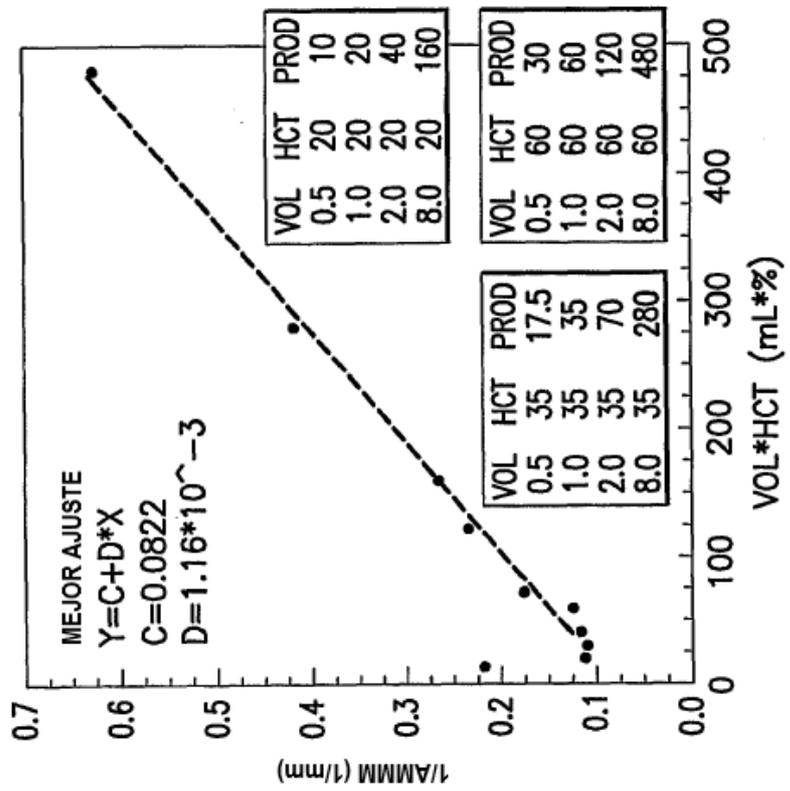


FIG.19

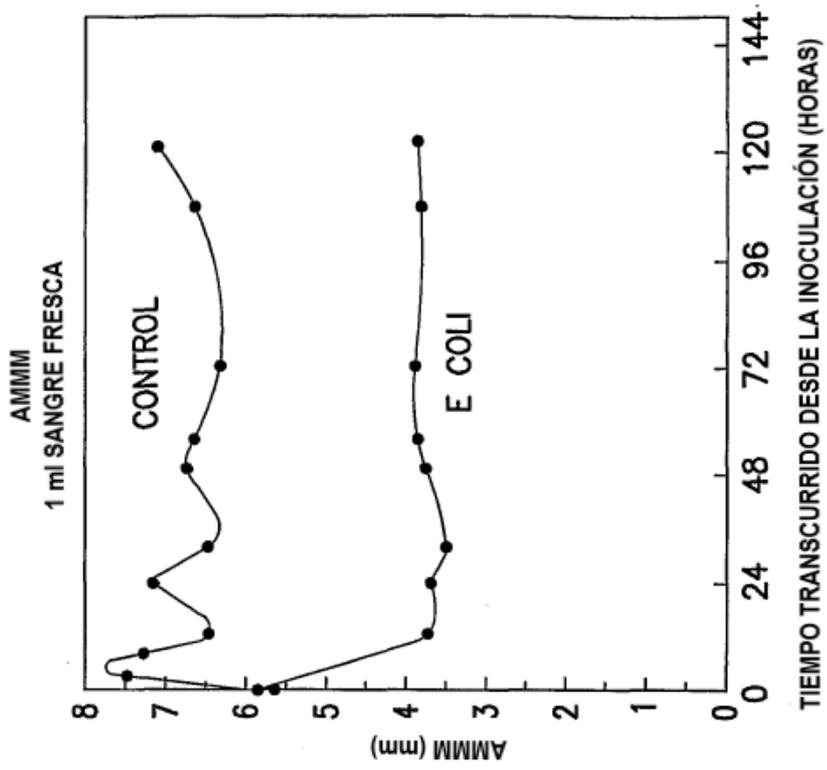


FIG.21

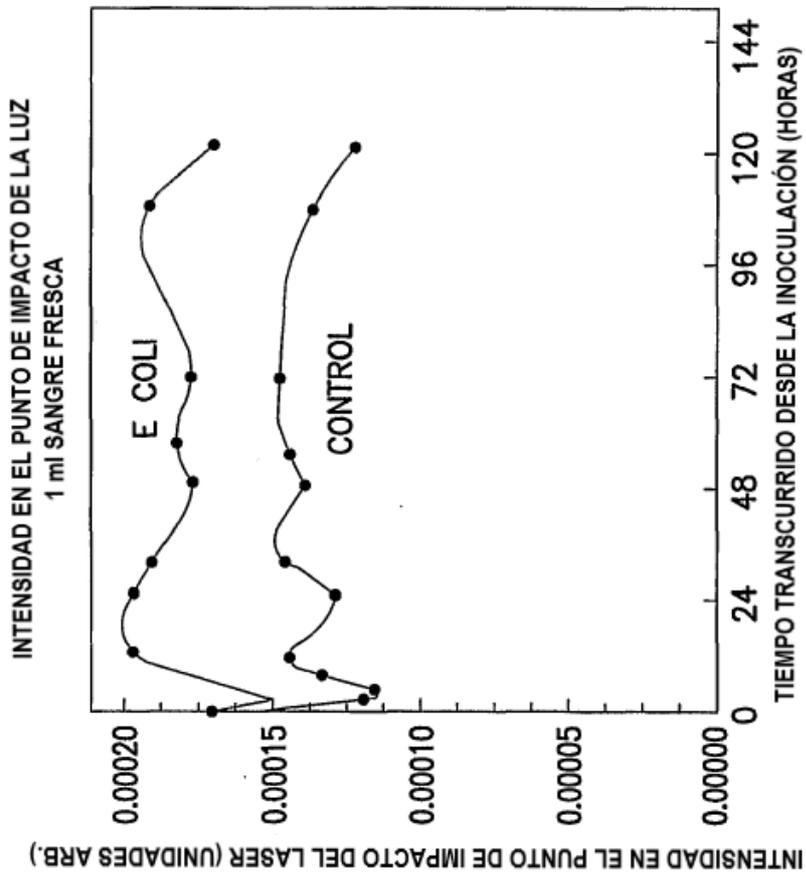


FIG.20

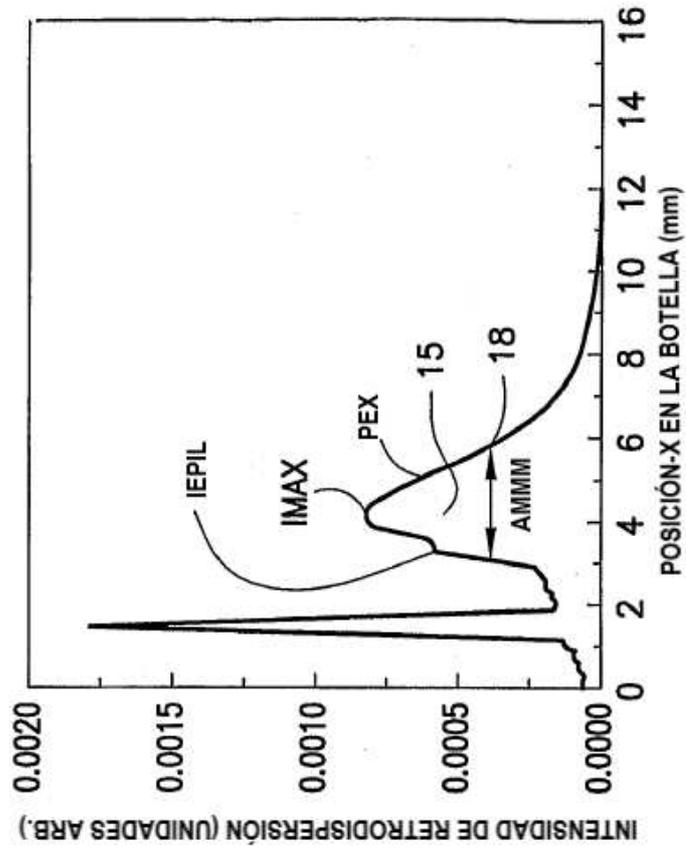


FIG.23

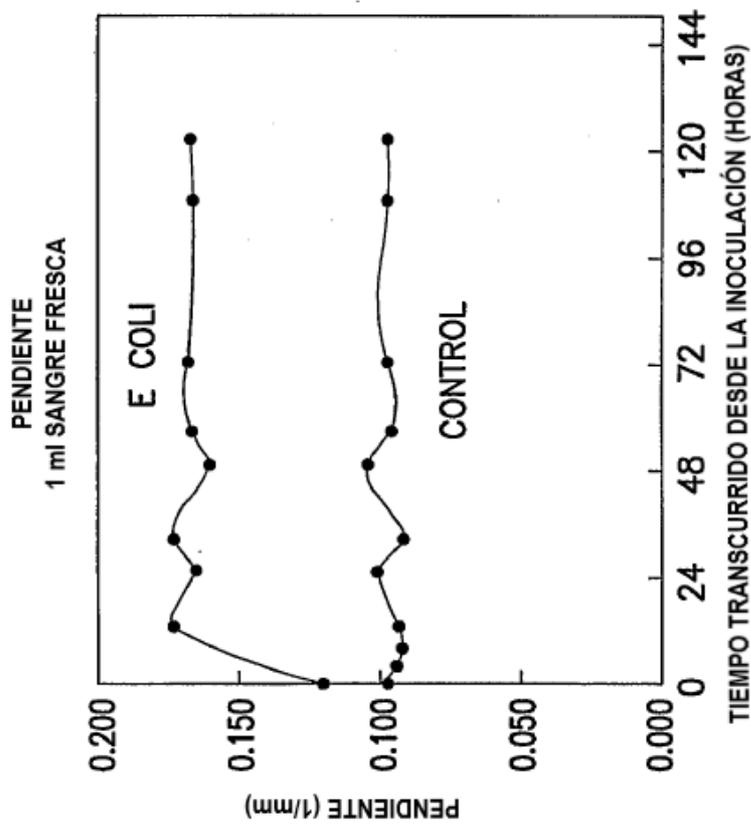


FIG.22

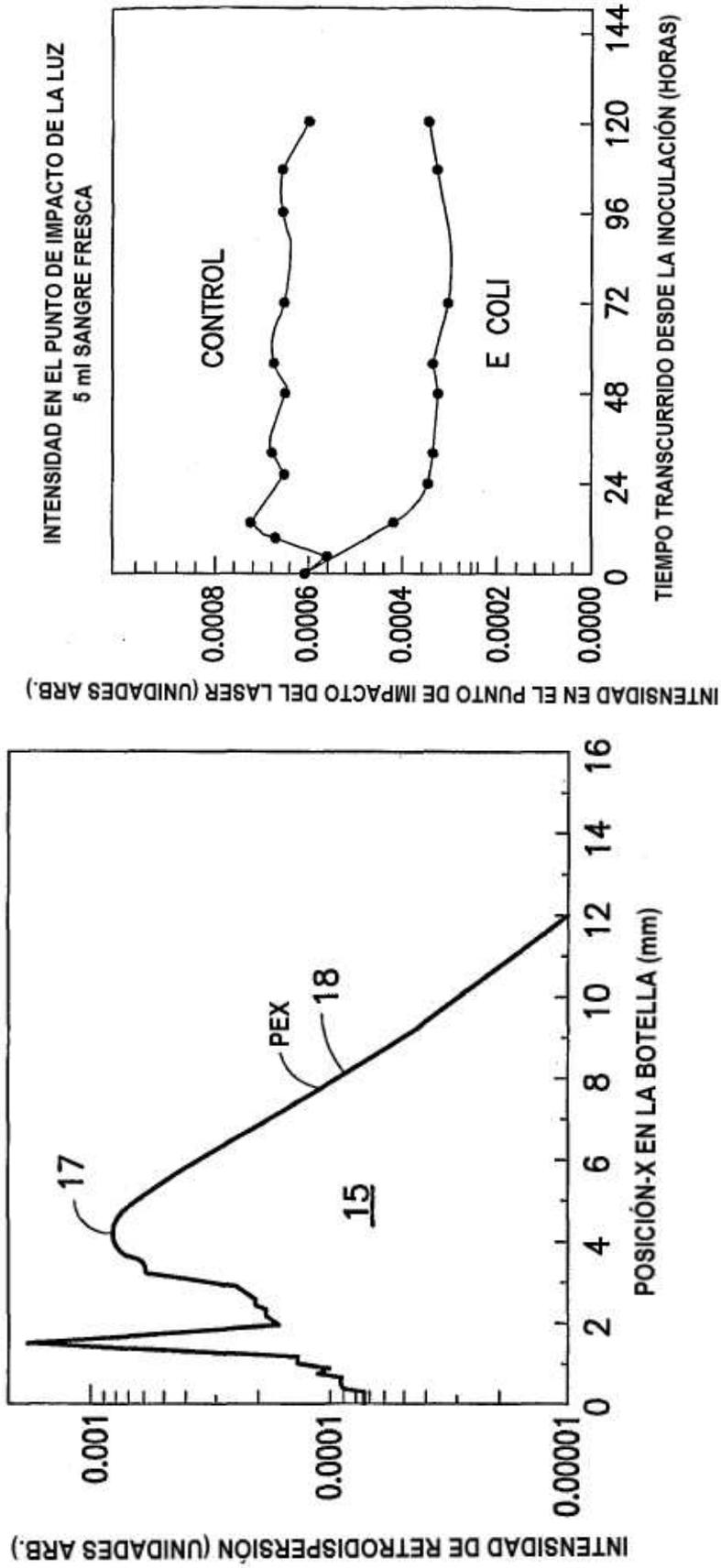


FIG.24

FIG.25

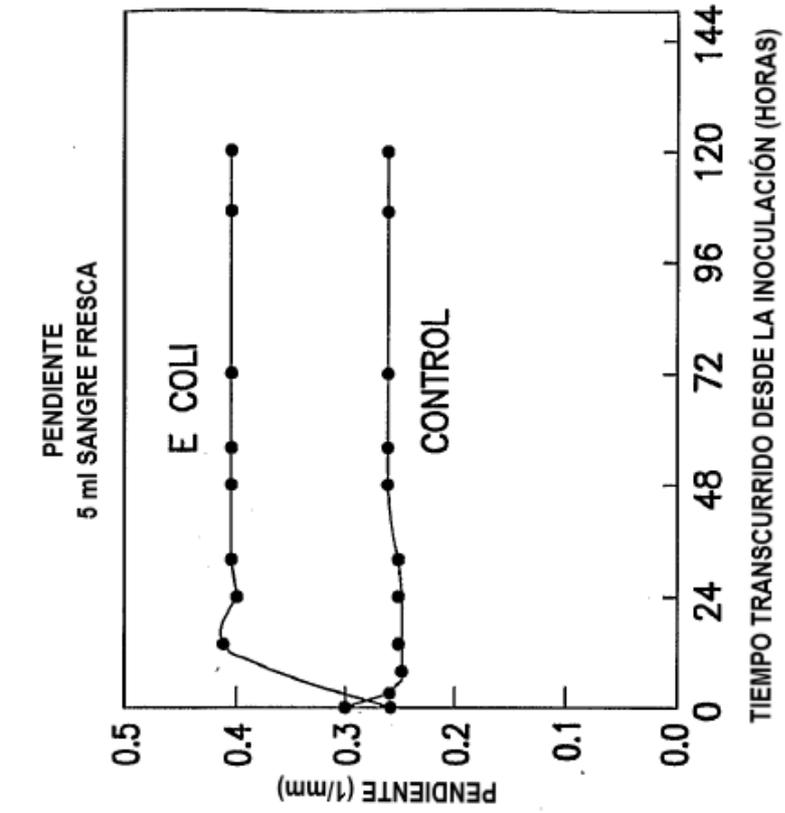


FIG.27

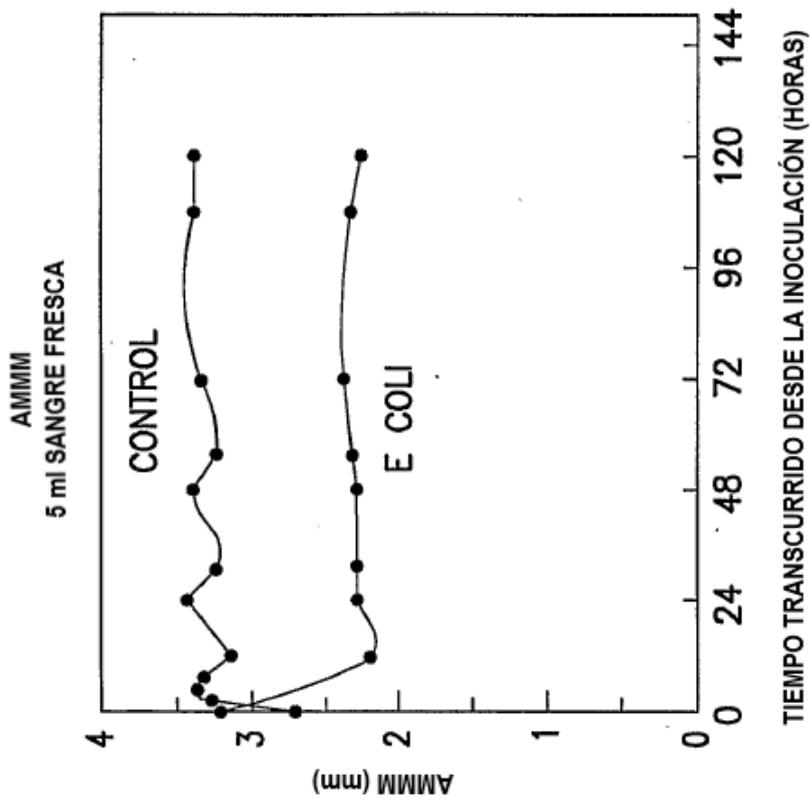


FIG.26

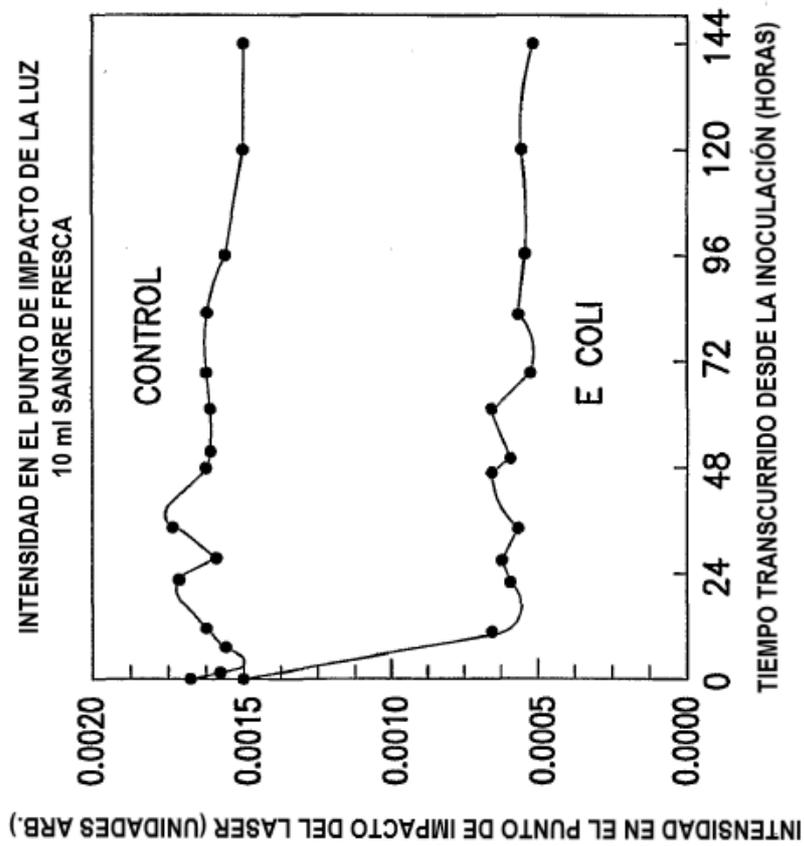


FIG.28

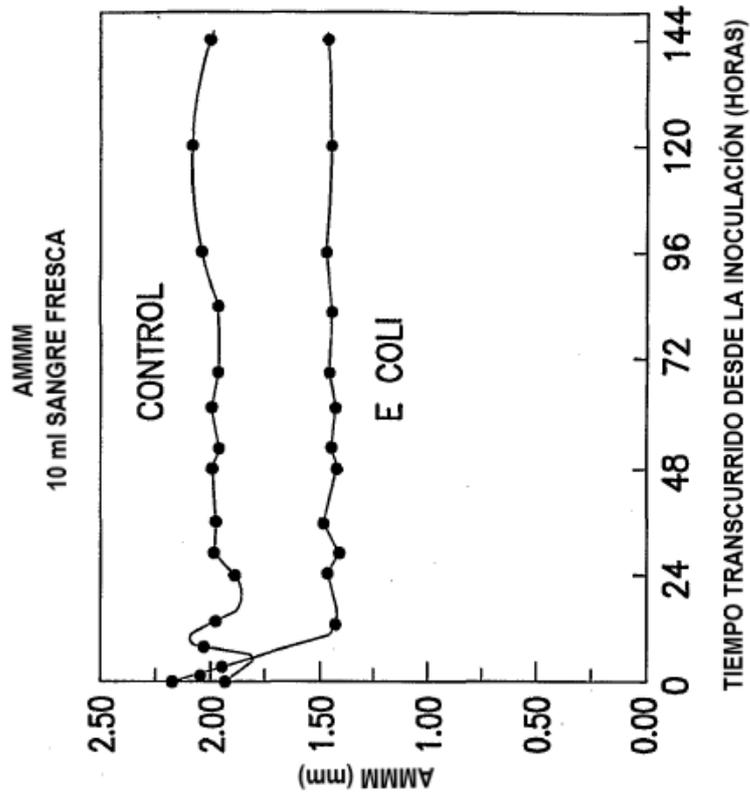


FIG.29

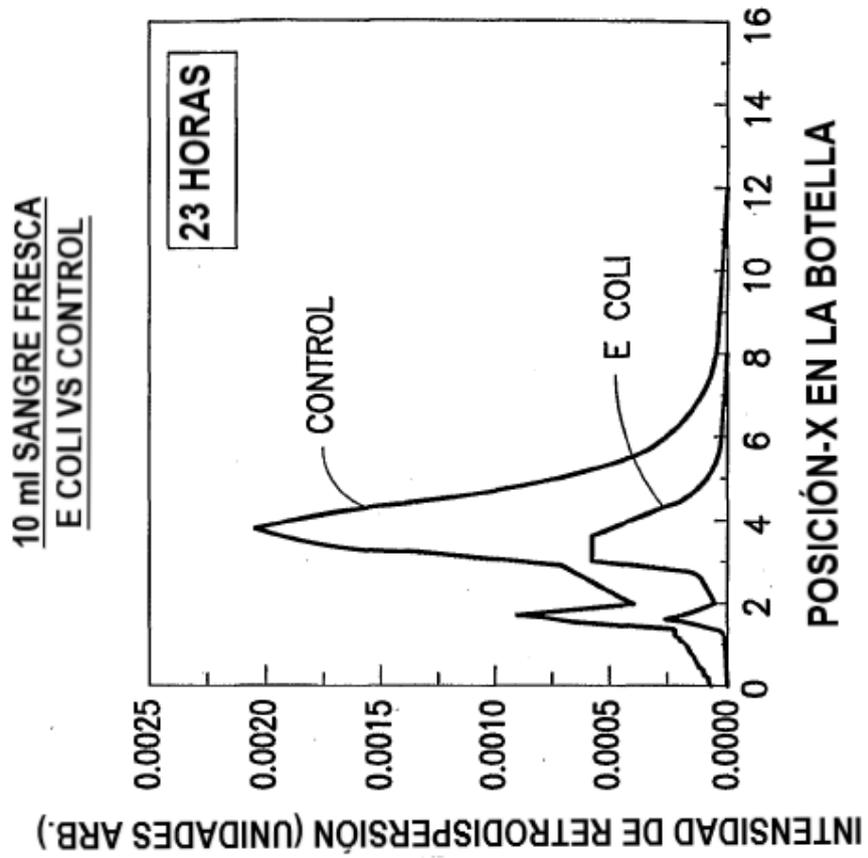


FIG.31

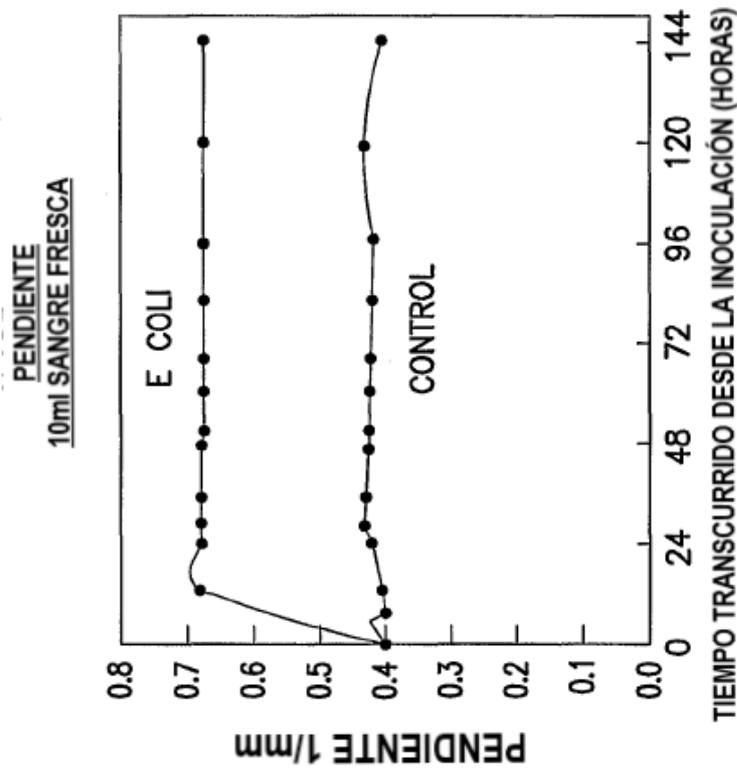


FIG.30

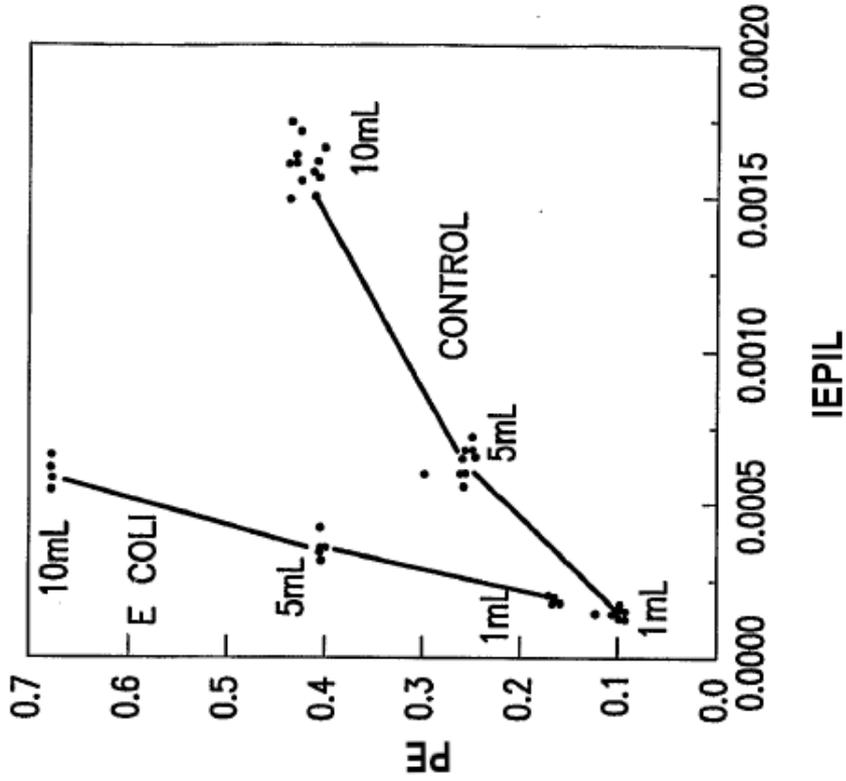


FIG.33

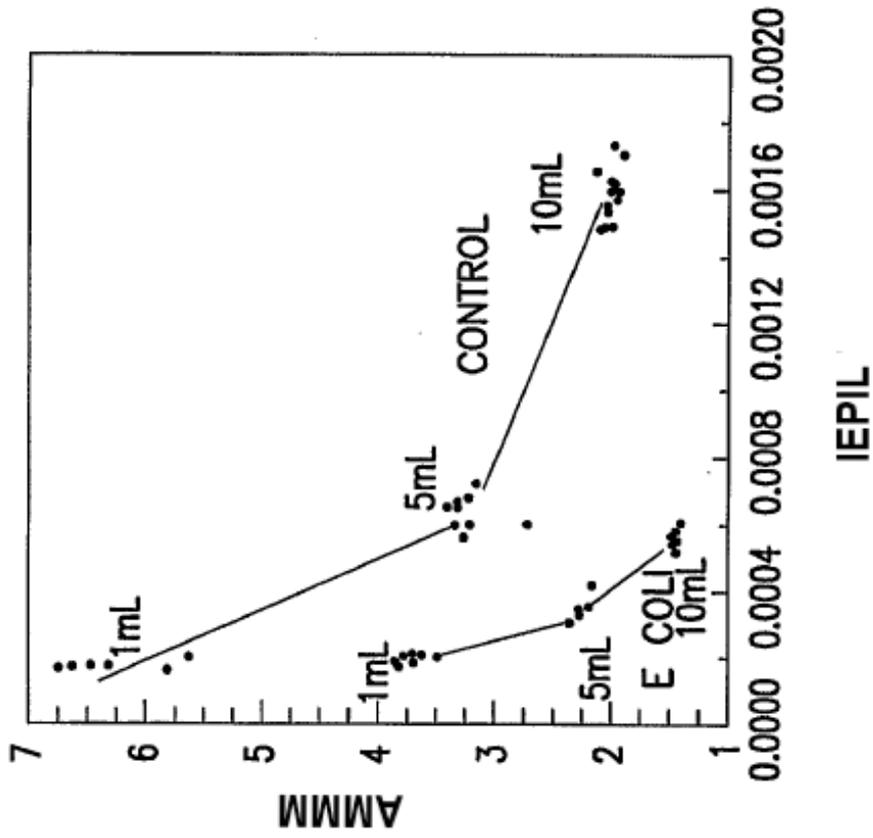


FIG.32

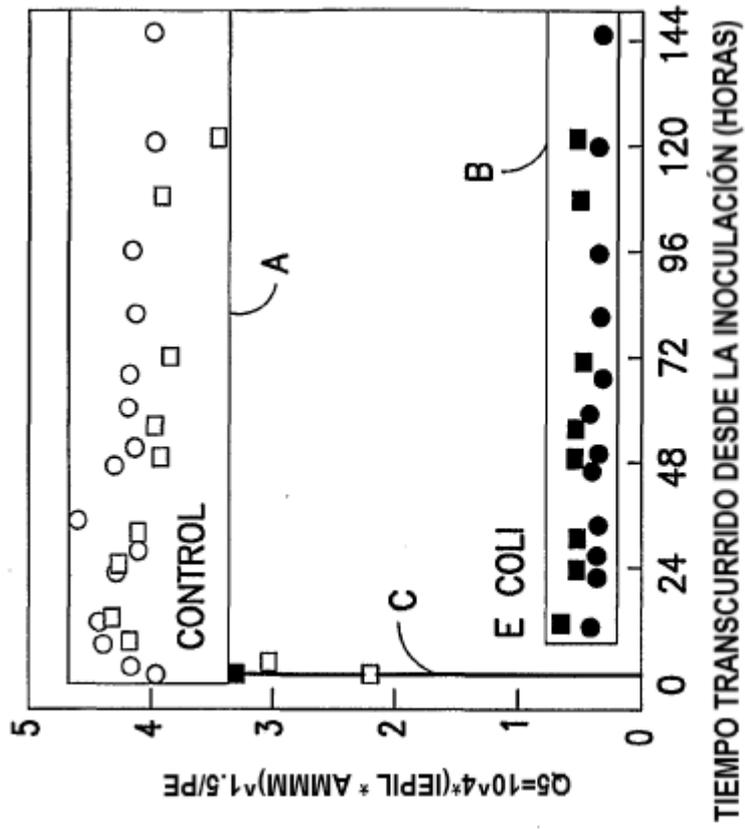


FIG.35

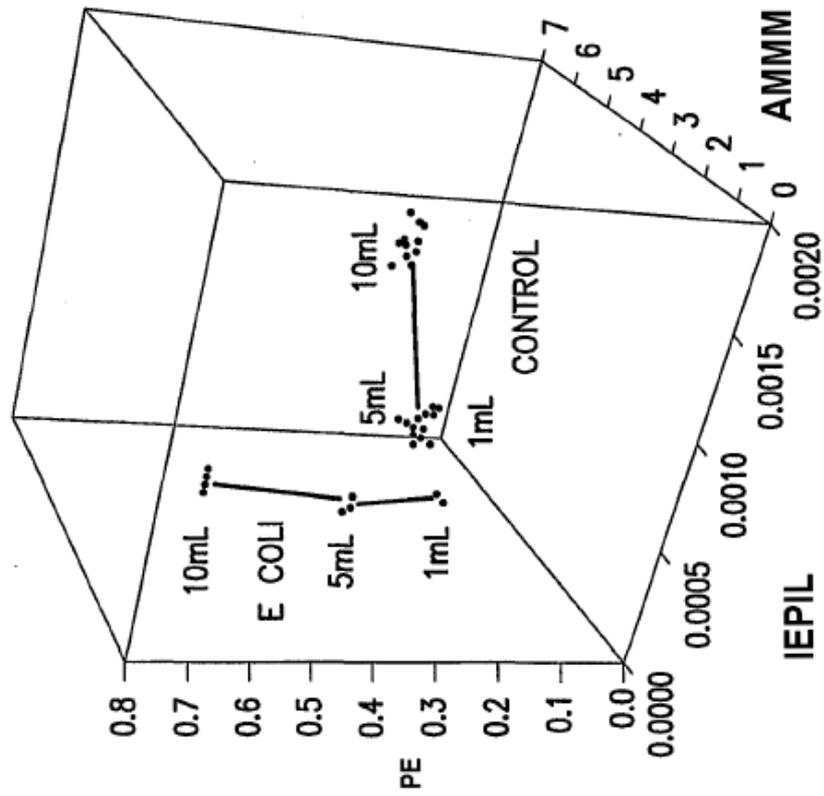


FIG.34

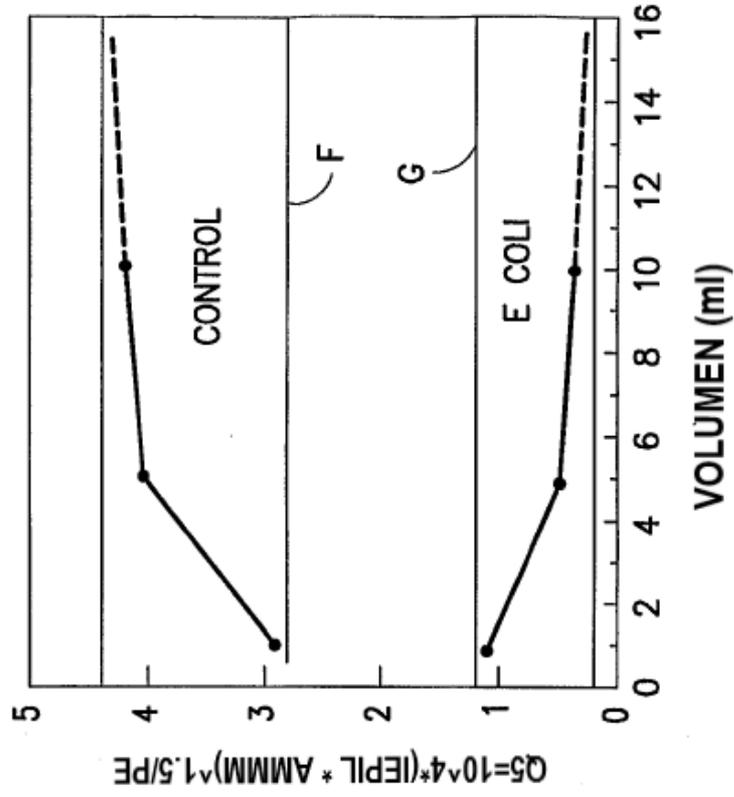


FIG.37

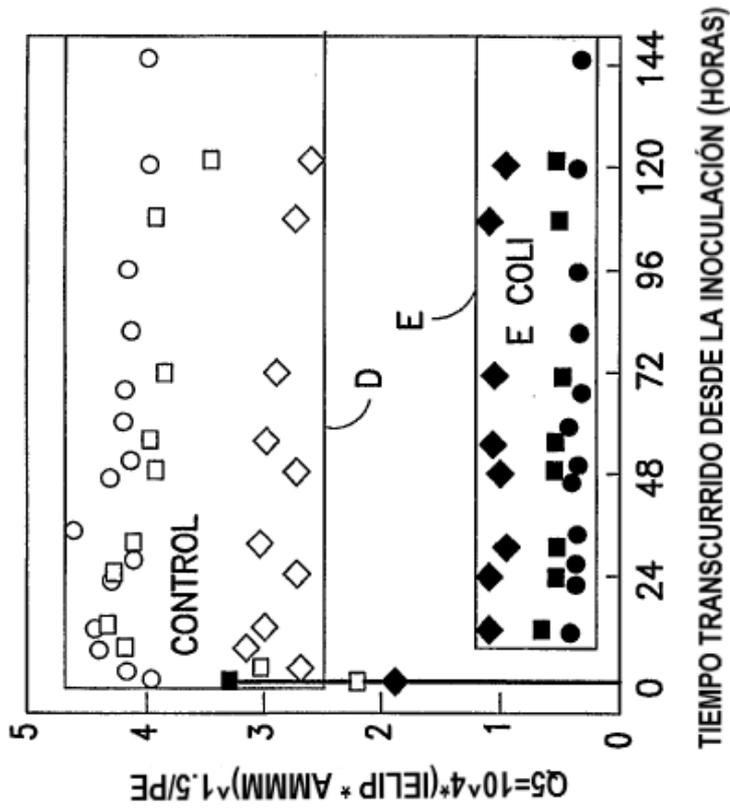


FIG.36

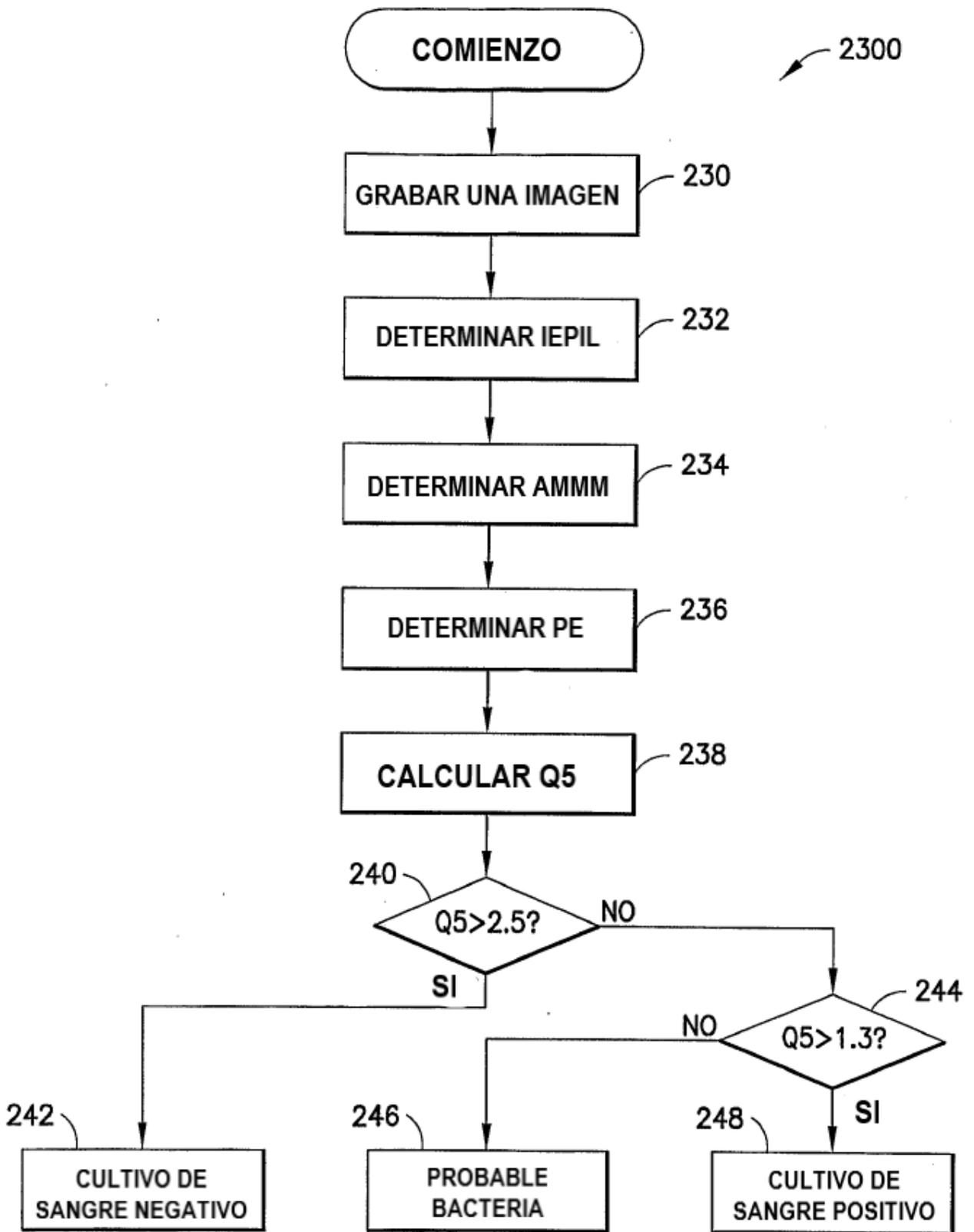


FIG.38

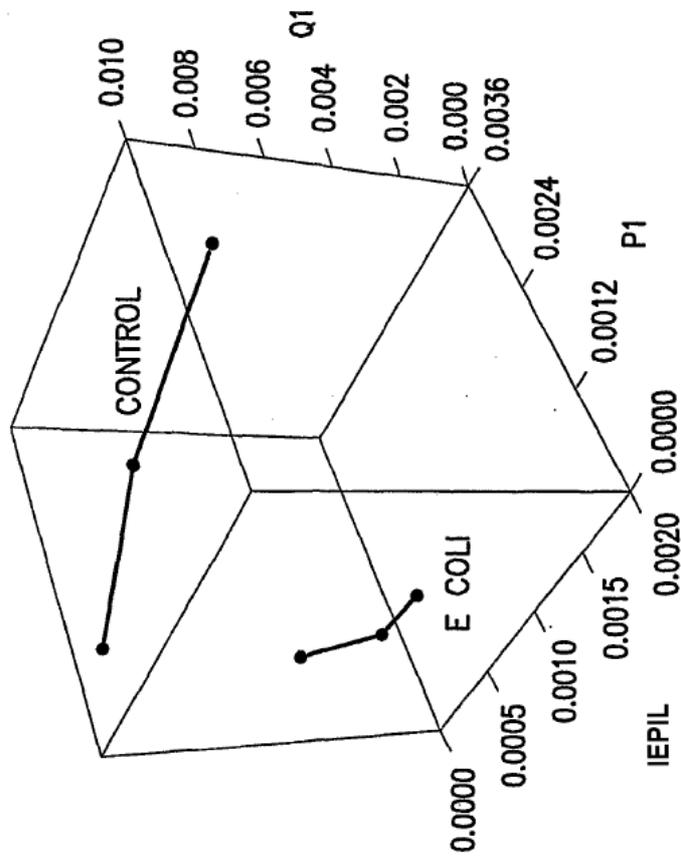


FIG.39

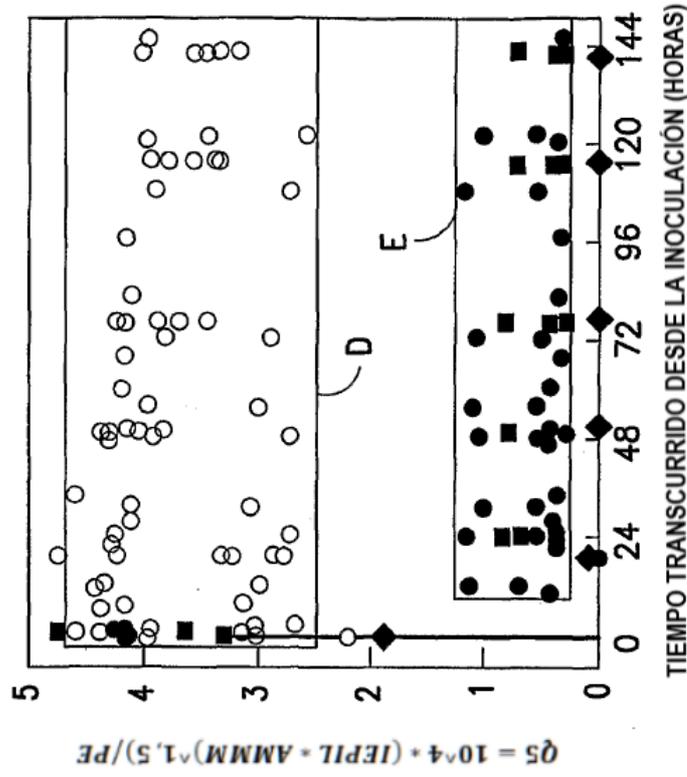


FIG.40

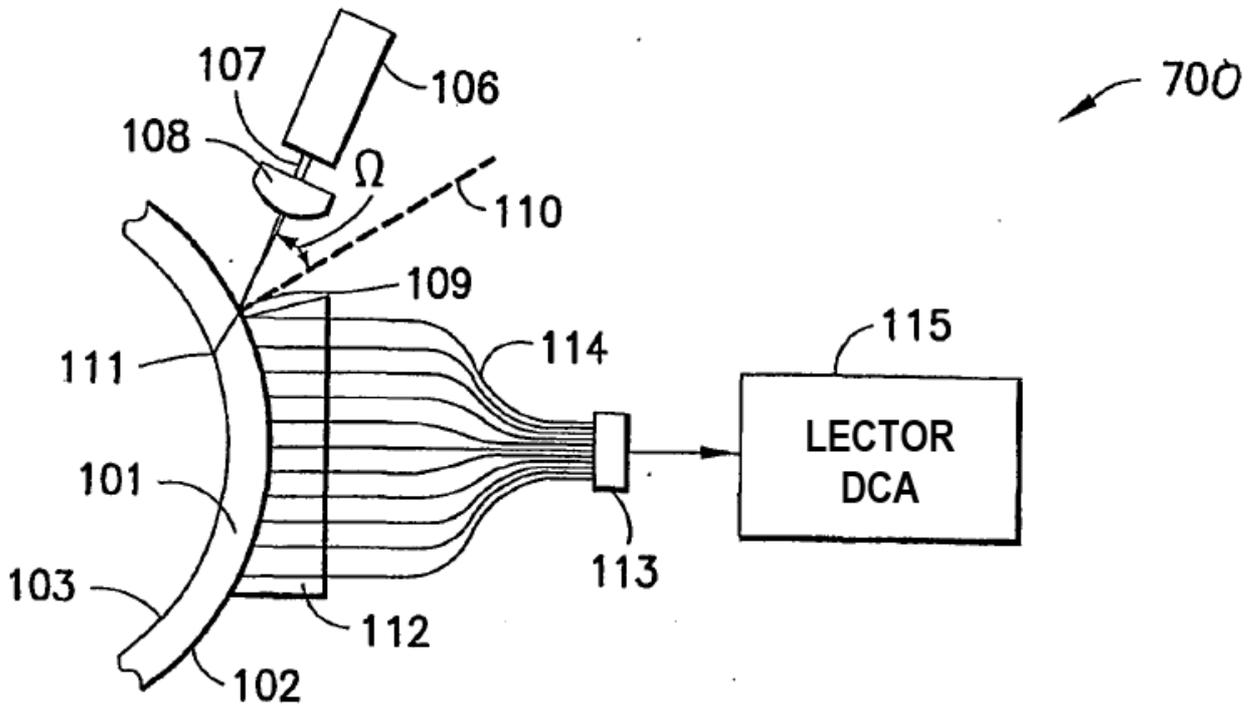


FIG. 41

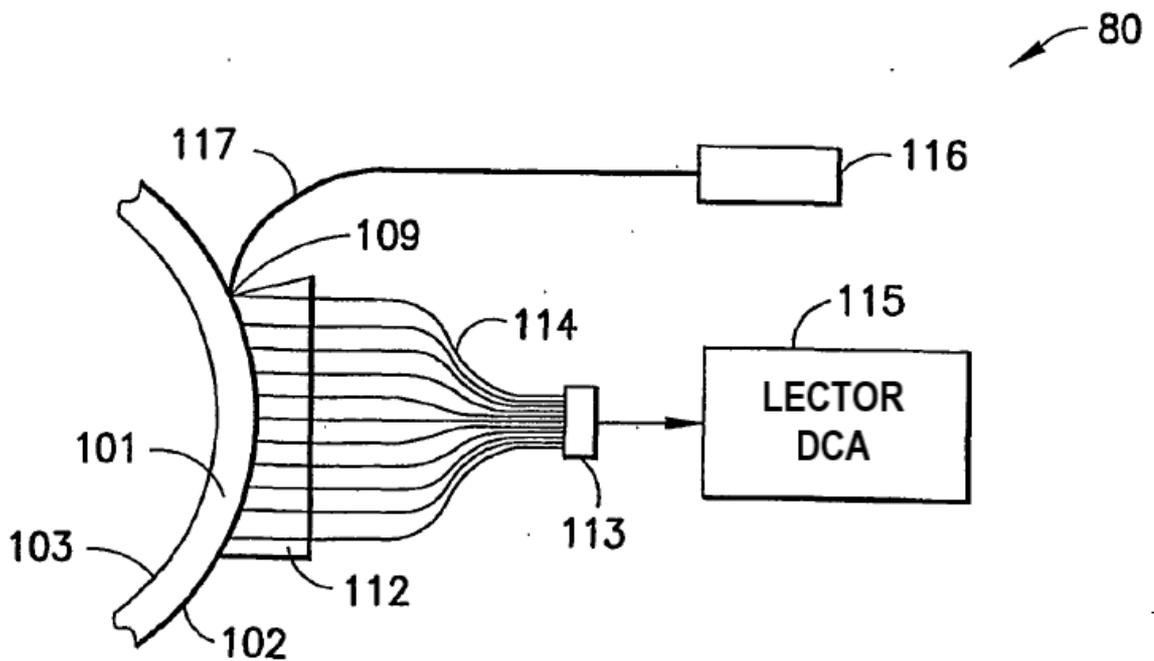


FIG. 42

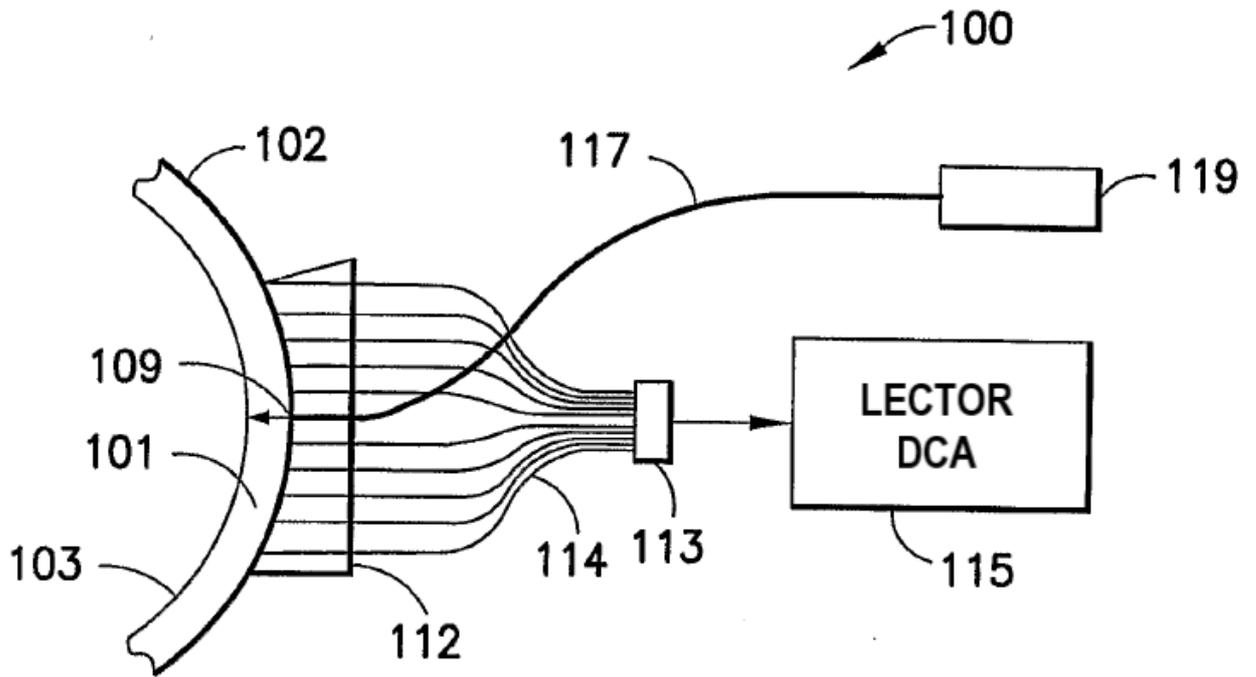


FIG. 43A

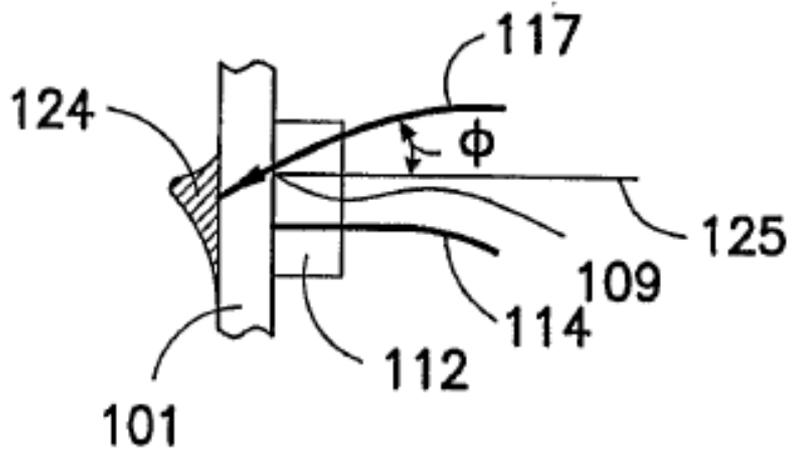


FIG. 43B

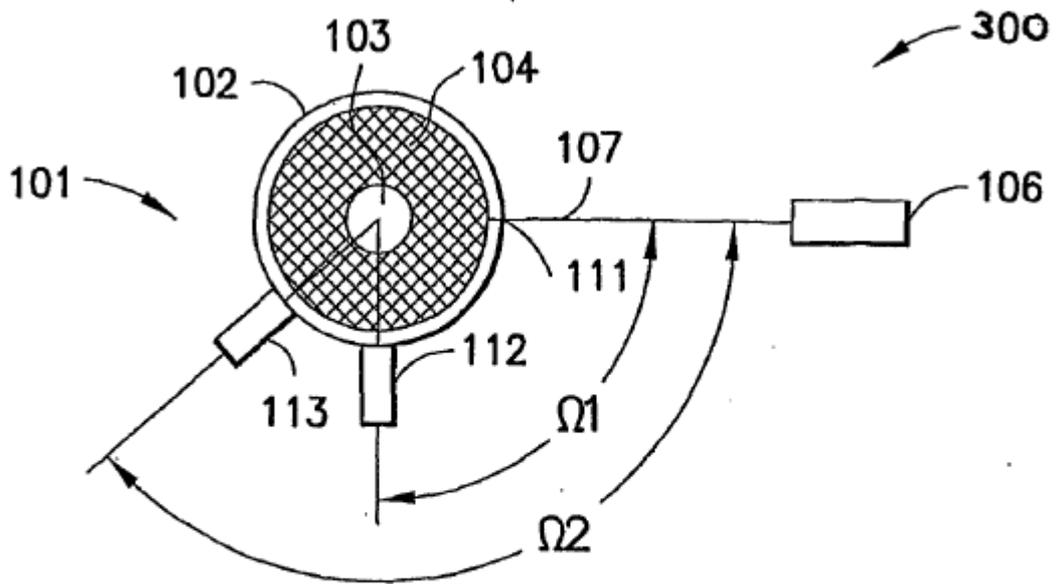


FIG. 44A

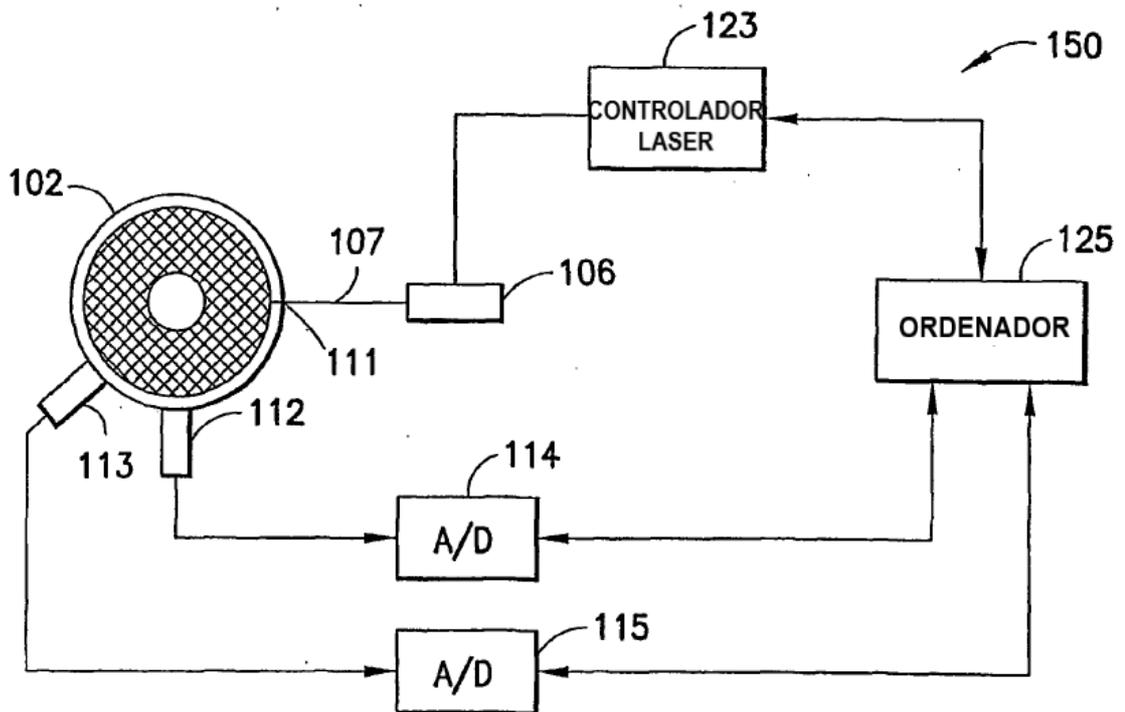


FIG. 44B

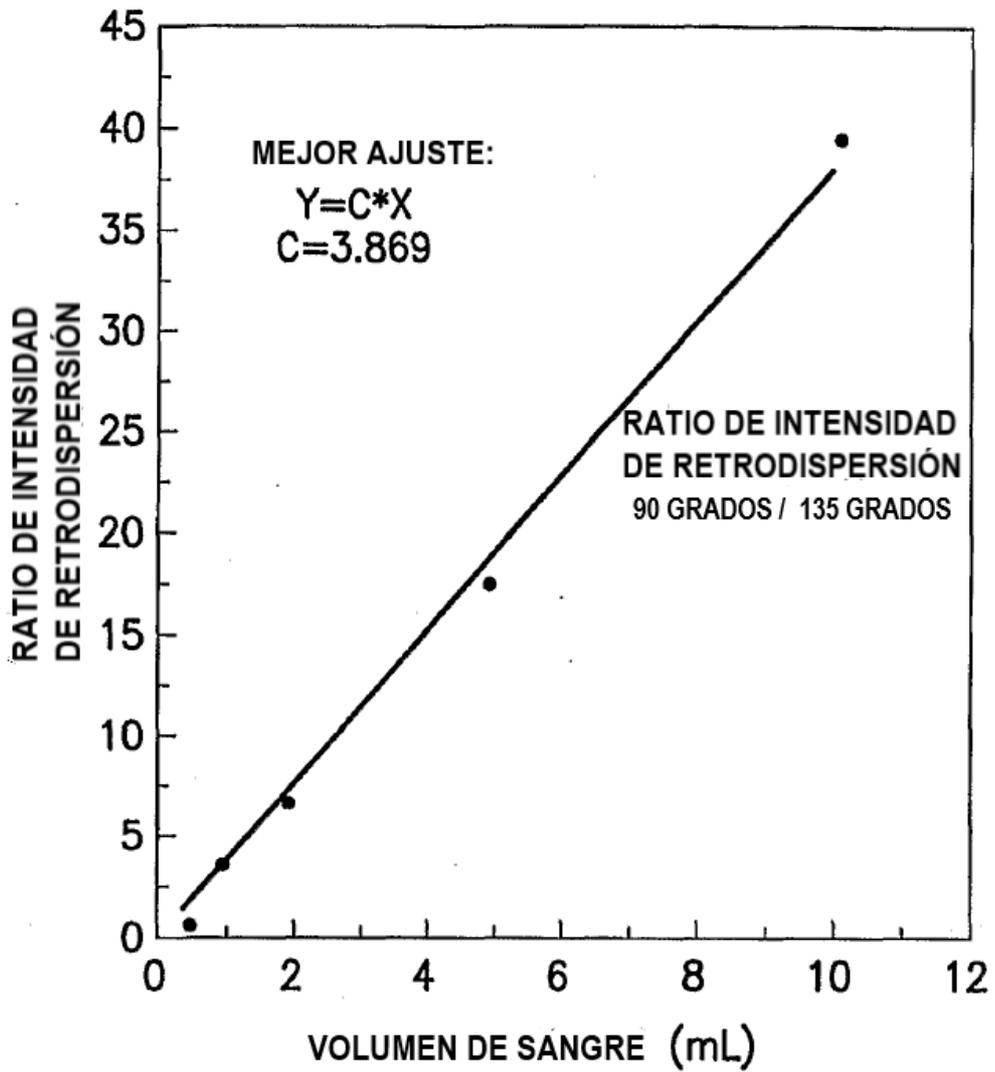


FIG.45