

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 202**

51 Int. Cl.:

**G01N 27/02** (2006.01)

**G01N 27/06** (2006.01)

**C12M 1/34** (2006.01)

**C12Q 1/00** (2006.01)

**C12Q 1/04** (2006.01)

**G01N 33/487** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2013 PCT/US2013/026138**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013 WO13123189**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2013 E 13749418 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 2815232**

54 Título: **Sistema de detección bacteriana basado en la impedancia**

30 Prioridad:

**15.02.2012 US 201261599100 P**

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

**07.04.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BERNDT, KLAUS W.**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 753 202 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

Sistema de detección bacteriana basado en la impedancia

## 5 REFERENCIA CRUZADA A APLICACIONES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación de la Solicitud de Patente Provisional de los EE.UU. Nº 61/599.100, presentada el 15 de febrero de 2012.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 La presente invención se refiere al campo de la detección microbiana en muestras clínicas. La invención está particularmente relacionada con lograr una detección más rápida de la presencia o ausencia de bacterias en una muestra biológica.

15 La detección de la presencia o ausencia de microbios (por ejemplo, bacterias) en una muestra biológica es un aspecto necesario del cuidado de la salud. Típicamente tal detección requiere que los microbios se cultiven para proporcionar suficientes microbios para ser detectados. Existe una amplia agrupación de medios de cultivo para el crecimiento de microbios en una muestra, ya que la presencia o ausencia de los microbios en la muestra solo se puede determinar si la cantidad de microbios en la muestra de prueba es suficiente para asegurar que los microbios serán detectados si están presentes.

20 Por ejemplo, las bacterias en muestras clínicas de sangre se detectan típicamente inoculando aproximadamente 10 ml de sangre pura en una botella de cultivo que contiene aproximadamente 30 ml de medio de crecimiento para soportar la multiplicación bacteriana. La muestra se incuba en la botella en un sistema automatizado a 35 °C. La muestra se controla por los subproductos del metabolismo celular o el crecimiento celular para determinar la presencia o ausencia de bacterias en la muestra. En un ejemplo, los productos del metabolismo bacteriano (tal como el dióxido de carbono) se controlan por medio de sensores químicos dispuestos dentro de la botella de cultivo.

30 La presencia de una población bacteriana en crecimiento dentro de una botella de cultivo de 80 ml de volumen total se detecta típicamente cuando el número de microorganismos ha aumentado a aproximadamente  $5 \times 10^9$  UFC (unidades de formación de colonias). Es obvio que se requieren muchos eventos de duplicación bacteriana para hacer crecer una población bacteriana de uno o dos organismos en la muestra de sangre de 10 ml a tal número elevado. Una solución para proporcionar una detección bacteriana más rápida es dividir el líquido de muestra de 10 ml junto con el medio de crecimiento requerido (típicamente, se combinan 30 ml de volumen de medio de crecimiento con los 10 ml de sangre) en una gran cantidad de muestras parciales más pequeñas que están contenidas en pequeñas cámaras próximas. Esto se describe en las Patentes de los EE.UU. Nº 5.770.440 y 5.891.739 de Berndt, la patente de EE.UU. 5.716.798 de Monthony et col., describe una agrupación de cámaras pequeñas (una agrupación de 96 cavidades de 250  $\mu$ l de cavidades) que no están próximas entre sí, pero tienen un volumen de espacio de cabeza articular. Monthony y col. contempla el uso de análisis colorimétrico, fluorométrico, radiométrico, nefelométrico e infrarrojos para analizar la cavidad de muestra para detectar la presencia o ausencia de bacterias en el mismo. Monthony y col. informa que se logra una reducción en el tiempo de detección (TTD) con volúmenes de muestra más pequeños.

45 Mientras la división de la muestra de sangre original de 10 ml junto con los 30 ml de medio de crecimiento es prometedora para lograr una detección bacteriana más rápida, el diseño de un recipiente de muestra práctico multi-cámara para detectar la presencia o ausencia de microorganismos en una o más de las cámaras es un desafío. Por ejemplo, si se detecta crecimiento bacteriano en solo una o dos de las cámaras pequeñas, entonces estas cámaras necesitan ser identificadas y accedidas con el fin de eliminar el líquido de la muestra de aquellas cámaras donde se detecta crecimiento positivo para el análisis aguas abajo, tal como el ID (por ejemplo, tiempo de vuelo Maldí) y pruebas de susceptibilidad a antibióticos (AST). Eliminar con precisión la muestra de cámaras discretas en una agrupación de cámaras pequeñas representa un desafío adicional.

50 Otro desafío para la implementación de una agrupación de cámaras de pequeño volumen para detectar el crecimiento microbiano son los detectores que se despliegan. La interrogación óptica de las cámaras individuales requiere mediciones precisas para asegurar que la medición esté asociada con la cámara apropiada. También se debe evitar la conversación cruzada de señal de cavidad a cavidad. El despliegue de sensores químicos individuales para cada cavidad puede ser costoso y difícil de implementar.

60 La medición de impedancia dieléctrica se ha evaluado como una alternativa al uso de sensores químicos. Sin embargo, las barreras para el despliegue comercial incluyen la sensibilidad de la impedancia a las fluctuaciones de temperatura. Mantener la temperatura de la botella de hemocultivo a más de  $\pm 0,05$  °C no es práctico para un entorno clínico de detección de bacterias.

65 En Sengupta, S, y col., "A micro-scale multi-frequency reactance measurement technique to detect bacterial growth at low bio-particle concentrations", (Una técnica de medición de reactancia multi-frecuencia a micro-escala para detectar el crecimiento bacteriano en bajas concentraciones de bio-partículas", Lab Chip, vol. 6, páginas 682-692 (2006), se ha utilizado una cámara micro-fluídica de 100  $\mu$ l de volumen como cámara para detectar la respuesta a la presencia de bacterias. Sengupta y col. ha informado que la respuesta de detección se puede mejorar en relación con una simple

medición de conductividad dieléctrica proporcionando una cámara larga y muy delgada en forma de canal que contiene la muestra, con electrodos muy pequeños posicionados en ambos extremos. Mediante el uso de altas frecuencias de hasta 100 MHz, se ha medido la contribución capacitiva de la muestra líquida, que, según Sengupta y col., es más sensible a los cambios en la capacitancia en la muestra causados por la presencia y/o crecimiento de bacterias en la cámara.

Como se ha descrito adicionalmente en Sengupta, S., y col., "Rapid detection of bacterial proliferation in food samples using microchannel impedance measurements at multiple frequencies", (Detección rápida de la proliferación bacteriana en muestras de alimentos utilizando mediciones de impedancia de micro-canales a múltiples frecuencias), Sens. & Instrumen. Food Qual., Vol. 4, páginas. 108-118 (2010) y Puttaswamy, S., y col., "Novel Electrical Method for Early Detection of Viable Bacteria in Blood Cultures", (Método eléctrico novedoso para la detección temprana de bacterias viables en hemocultivos), J. Clin. MicroBio. Vol. 49(6), páginas 2286-2289 (2011), las fluctuaciones de temperatura se describen como el desafío más significativo para el uso del aparato y método de Sengupta y col. de uso de un entorno micro-fluídico para analizar la presencia de bacterias en una muestra utilizando una medición de conductividad dieléctrica.

Un límite adicional sobre el aparato y método de Sengupta y col. es la necesidad de llenar una nueva cámara micro-fluídica (o reemplazar la muestra líquida en la cámara micro-fluídica con muestra de líquido fresco de la botella de cultivo) después de aproximadamente una hora y hacer la siguiente medición con una nueva muestra. Este enfoque consume aproximadamente 1 ml de líquido de muestra en diez horas, ya que se descarta cada porción de la que se toma previamente muestras. Mientras que la toma de muestras podría ocurrir con mayor frecuencia para lograr una mejor relación señal/ruido; para microorganismos de crecimiento lento, el volumen de consumo de muestra a lo largo del tiempo podría representar un serio desafío.

Por lo tanto, existe la necesidad de mejorar si el uso de mediciones dieléctricas para detectar la presencia o ausencia de microbios en una muestra líquida ha de ser comercialmente viable.

A modo de información de antecedentes adicional, la Publicación Europea N° 2.243.824 se refiere a un dispositivo para medir la concentración de biomasa de un medio, la Publicación Internacional N° WO 2009/136157 A2 se refiere a un método para caracterizar células o estructuras de células en una muestra, la Patente de los EE.UU. N° 6.096.272 A se refiere a un sistema y método de prueba de diagnóstico micro-biológico para identificación (ID) de micro-organismos y determinaciones de susceptibilidad antimicrobiano (AST), la Publicación Internacional N° WO 2004/010103 A2 se refiere a un dispositivo para detectar células y/o moléculas en una superficie de electrodo, la Publicación de los EE.UU. N° 2007/0090927 A1 se refiere a un sensor inalámbrico adaptado para detección independiente posicional sensor a lector, la Publicación de los EE.UU. N° 2011/0086352 A1 se refiere a métodos y dispositivos para detección libre de etiqueta de ácidos nucleicos que se amplifican por reacción en cadena de la polimerasa, y la Publicación de los EE.UU. N° 2011/0081676 A1 se refiere a un sistema y método para detectar bacterias viables en una suspensión basada en cambios en impedancia inducidos por la proliferación de bacterias en suspensión.

#### BREVE COMPENDIO DE LA INVENCION

En la presente memoria se describe un aparato y método de detección de crecimiento microbiano (por ejemplo, bacteriano) que puede procesar un volumen de muestra de líquido macroscópico, en realizaciones preferidas para análisis de hemocultivos, típicamente 40 ml (10 ml de sangre; 30 ml de medio de crecimiento). El aparato y el método proporcionan un entorno de análisis que facilita la medición del componente de impedancia capacitiva, que no sufre fluctuaciones de temperatura, y que permite utilizar una agrupación de cámaras desechables relativamente simples y de bajo coste para la medición dieléctrica de porciones de muestra discretas que pueden compararse fácilmente con las mediciones dieléctricas de otras cámaras en la agrupación para el control de la línea base y la capacidad mejorada de analizar rápidamente la presencia o ausencia de microorganismos en la muestra.

Una realización de la presente invención descrita en la presente memoria, es un método de detección de crecimiento microbiano basado en la impedancia. En este método, se proporciona un recipiente que contiene una muestra líquida sospechosa de contener microorganismos. El recipiente está configurado para tener electrodos posicionados de tal manera que la muestra esté dispuesta entre los electrodos. La muestra líquida está en contacto físico con al menos uno de los dos electrodos. El propio recipiente puede tener una o más cámaras, teniendo cada cámara los electrodos posicionados de tal manera que cualquier muestra en la cámara esté dispuesta entre los dos electrodos. Los recipientes y las placas multi-cámara (por ejemplo, placas de micro-titulación) son bien conocidos en la técnica y no se han descrito en detalle en la presente memoria.

En una alternativa de este método, se aplica una señal eléctrica que varía con el tiempo al primer electrodo en contacto con la muestra líquida. El segundo electrodo está conectado eléctricamente a un detector de señal sensible a la fase. Se selecciona una frecuencia de la señal eléctrica que varía con el tiempo de manera que una amplitud de señal desfasada medida por el detector resulte igual a aproximadamente cero en la frecuencia seleccionada. Esa amplitud de señal desfasada se controla con el paso del tiempo con el detector de señal sensible a la fase. Si se observa un aumento en la amplitud de la señal con el paso del tiempo, esto es una indicación de crecimiento microbiano dentro de la muestra líquida.

5 En otra alternativa de este método, la señal eléctrica que varía con el tiempo se aplica al primer electrodo en contacto con la muestra líquida. El segundo electrodo está conectado eléctricamente al detector de señal sensible a la fase. La amplitud de la señal desfasada se controla con el paso del tiempo con el detector de señal sensible a la fase. En este método, una frecuencia a la que la amplitud desfasada es cero se determina sintonizando una frecuencia de dicha señal eléctrica de manera que una amplitud de señal desfasada medida por dicho detector resulta igual a aproximadamente cero. Esta etapa se repite a intervalos de tiempo predeterminados. Si se observa un aumento en la frecuencia a la que se observa la amplitud de la señal desfasada, entonces esto es una indicación de crecimiento microbiano dentro de dicha muestra líquida.

10 En otra alternativa de este método, la señal eléctrica que varía con el tiempo generada por un oscilador controlado por tensión se aplica al primer electrodo. El segundo electrodo está conectado de nuevo eléctricamente a un detector de señal sensible a la fase. En esta alternativa, se proporciona como una entrada de control de frecuencia del oscilador controlado por tensión, por lo que el oscilador se sintoniza a una frecuencia a la que la amplitud de la señal desfasada medida por el detector es igual a cero. Un aumento en la frecuencia sintonizada con el paso del tiempo indica crecimiento microbiano dentro de dicha muestra líquida.

15 En una realización del método, si el recipiente es una placa de múltiples cavidades, al menos una pluralidad de las cavidades recibe una muestra líquida sospechosa de contener microorganismos. En esta realización una señal eléctrica que varía con el tiempo se proporciona a los primeros electrodos de la pluralidad de cavidades en la agrupación de cavidades (por ejemplo, por un demultiplexor). La señal que varía con el tiempo transmitida a través de la pluralidad de cavidades es recibida (por ejemplo por un multiplexor). La señal se transmite al detector de señal sensible a la fase (por ejemplo, por un multiplexor).

20 Otra realización de la presente invención es un aparato para la detección de crecimiento microbiano que está basado en la impedancia. El aparato tiene un receptáculo que recibe el recipiente único o las placas de múltiples cavidades descritas anteriormente. El recipiente único o una o más cámaras de la muestra líquida de placa de múltiples cavidades se sospecha que contienen microorganismos. Bien el recipiente o bien una de las cámaras en la placa de múltiples cavidades tiene dos electrodos posicionados de tal manera que la muestra esté dispuesta entre y en contacto con el primer y segundo electrodos.

25 El aparato tiene una fuente de señal que proporciona una señal eléctrica que varía con el tiempo al primer electrodo que se transmite a través de la muestra líquida al segundo electrodo. El aparato tiene un detector de señal sensible a la fase conectado al segundo electrodo del recipiente. La salida del detector de señal indica un cambio en la capacidad a granel de la muestra líquida si ocurre.

30 En esta realización, la señal eléctrica que varía con el tiempo se genera por un oscilador controlado por tensión al primer electrodo. En esta realización, el aparato tiene un integrador acoplado a la salida del detector de señal sensible a la fase. La salida del integrador está acoplada a la entrada del oscilador controlado por tensión. El oscilador es sintonizado a una frecuencia a la que la amplitud de señal desfasada medida por el detector es igual a cero. Una salida del detector de señal indicará un cambio en la frecuencia sintonizada. Un cambio en la frecuencia sintonizada es una indicación de crecimiento microbiano.

35 En una realización del aparato, si el recipiente es una placa de múltiples cavidades, al menos una pluralidad de las cavidades recibe una muestra líquida sospechosa de contener microorganismos. En esta realización, un demultiplexor proporciona la señal eléctrica que varía con el tiempo generada a los primeros electrodos de la pluralidad de cavidades en la agrupación de cavidades. El aparato también tiene un multiplexor para recibir la señal que varía con el tiempo transmitida a través de la pluralidad de cavidades. El multiplexor transmite la señal al detector de señal sensible a la fase.

40 En realizaciones del método y aparato descrito en la presente memoria, una muestra de sangre pura de 10 ml se mezcla con 30 ml de medio de crecimiento BD BACTEC™ y se distribuye a una agrupación de 96 cámaras. Cada cámara tiene un volumen total de 0,42 ml. El tamaño de la muestra de 10 ml se selecciona porque es un tamaño de muestra estándar aceptado por la industria para asegurar que, si hay microorganismos presentes en el torrente sanguíneo del paciente, algunos de esos microorganismos estarán presentes en la muestra de 10 ml. La persona experta comprenderá que la invención no se limita al tamaño de la muestra o al volumen del medio de cultivo aparte de asegurar un volumen de muestra suficiente para analizar la muestra en busca de la presencia o ausencia de microorganismos como se describe en la presente memoria.

45 En realizaciones del método y aparato descritos en la presente memoria, la presencia de bacterias se controla en cada cámara (o cavidad o micro-cavidad, términos que se usan indistintamente en la presente memoria) sometiendo la cámara que contiene la muestra a una medición de impedancia dieléctrica de RF. La configuración del electrodo será típicamente un electrodo inferior que sirve como la parte inferior de la cámara y un electrodo superior dispuesto en la agrupación y que se extiende algo dentro de la parte superior de la cámara. La frecuencia de la medición, el diámetro de los electrodos y la distancia entre los electrodos se optimizan de manera que cualquier cambio en la capacitancia a granel del líquido de la muestra provoque un cambio en el componente de señal desfasada medido. El componente de señal desfasada son señales que tienen una fase diferente de la señal medida a una frecuencia dada.

Mientras que el componente de conductividad está relacionado con productos bacterianos metabólicos, tales como diferentes gases, el componente capacitivo refleja la presencia de bacterias en una cavidad. Ya que se detecta la presencia, en realizaciones del método y aparato descritos en la presente memoria, todas las cavidades pueden tener un espacio de cabeza colectivo, lo que a su vez hace posible diseñar un desechable muy simple y de bajo coste con fácil acceso a cámaras positivas.

Se puede lograr una detección bacteriana más rápida según el método y aparato descritos en la presente memoria (i) debido al uso de cámaras de pequeño volumen, (ii) debido a la comparación de los próximos vecinos en la agrupación de cámaras, y (iii) debido al hecho de que el mecanismo de detección capacitiva es mucho más sensible que el mecanismo de detección conductivo.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las siguientes Figuras 1 a 18 se proporcionan para ilustrar realizaciones de la presente invención.

La Figura 1 representa la base de una agrupación de cámaras desechables según una realización de la presente invención.

La Figura 2 es una ilustración que muestra la base de la agrupación de cámaras de la Figura 1 con una tapa adjunta.

La Figura 3 ilustra una base desechable de una agrupación de cámaras según una realización de la presente invención, llena con 40 ml de líquido de muestra.

La Figura 4 ilustra la agrupación de cámaras desechables llena y ensamblada.

La Figura 5 ilustra un esquema de un circuito de medición de impedancia para las cámaras en la agrupación según una realización de la presente invención.

La Figura 6 ilustra un mecanismo para interrogar a las cámaras individuales de la agrupación desechable.

La Figura 7 muestra dos gráficas que representan el componente de señal desfasada calculado frente a la frecuencia de medición circular para dos valores de la capacitancia de la muestra.

La Figura 8 muestra las mismas dos gráficas que en la Figura 7, pero en escala lineal Y, y solamente dentro del intervalo de frecuencia circular  $10^5$  -  $10^6$  1/s, es decir, donde se observa un paso por cero.

La Figura 9 muestra el acortamiento esperado en el tiempo de detección que resulta del uso de cámaras de pequeño volumen en combinación con una resolución mejorada del sensor debido a la comparación de los próximos vecinos en una agrupación, y debido a la medición del componente de impedancia capacitiva.

La Figura 10 ilustra una realización de un aparato para medir la capacitancia dieléctrica de una muestra líquida para determinar la presencia o ausencia de microorganismos en la misma.

La Figura 11 compara el área de la placa de 96 cavidades descrita en la presente memoria con el área de una placa de prueba estándar de 96 cavidades.

La Figura 12 ilustra la relación entre la señal desfasada y la frecuencia.

Las Figuras 13A y 13B representan datos reales que ilustran adicionalmente la relación entre la frecuencia y la señal desfasada (denominada como la porción imaginaria de la señal).

Las Figuras 14A-C son una serie de espectros grabados para diferentes cavidades de volumen y composición idénticos, como se ha medido utilizando un amplificador de bloqueo DSP de Stanford Research Systems Model SR850 de 100 kHz en una configuración experimental representada en la Figura 10.

La Figura 15 ilustra la relación tiempo/frecuencia para los medios enriquecidos con E. coli basándose en espectros grabados para una cavidad pequeña, y una curva de crecimiento registrada en paralelo en un instrumento de cultivo de sangre BACTEC™ de Becton Dickinson Diagnostics, Sparks, MD, utilizando una botella BACTEC™ grande, llena con la misma muestra líquida.

La Figura 16 ilustra el tiempo que tarda el componente de señal desfasada en girar hacia valores positivos debido a una capacitancia a granel creciente para un medio BACTEC™ enriquecido con E. coli. La curva de la derecha representa una curva de crecimiento registrada en paralelo en un instrumento de hemocultivo BACTEC™ de Becton Dickinson Diagnostics, Sparks, MD, utilizando una botella BACTEC™ grande, llena con la misma muestra líquida.

La Figura 17 ilustra que el crecimiento temprano se detecta si se amplía la escala de la señal desfasada medida.

La Figura 18 ilustra una realización alternativa de un aparato para medir la capacitancia dieléctrica de una muestra líquida para determinar la presencia o ausencia de microorganismos en la misma por lo que la frecuencia de medición del generador de señal se sintoniza automáticamente y se mantiene a la frecuencia de paso por cero.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los ejemplos de la presente invención descritos en la presente memoria están en el contexto de la detección para la presencia o ausencia de bacterias en una muestra de sangre. A menos que se indique lo contrario, la muestra biológica es una muestra de sangre pura de 10 ml que se mezcla con 30 ml de medio de crecimiento BD BACTEC™. La muestra y el medio combinados se dispensan en una agrupación de 96 cámaras de 0,42 ml de volumen cada una. Aunque se describen numerosos ejemplos así, la persona experta comprenderá que el método y el aparato descritos pueden utilizarse para probar una variedad de muestras diferentes (muestras de tejido, muestras de esputo, muestras de orina, etc.) combinadas con una variedad de diferentes medios de crecimiento. Mientras el volumen de la cámara descrito y la agrupación de la cámara son ventajosos en términos del volumen de una muestra combinada de sangre/medio, la

persona experta puede seleccionar el volumen de la cámara y el tamaño de la agrupación para un entorno particular.

La presencia o ausencia de bacterias se determina utilizando la medición de impedancia dieléctrica de RF. La configuración del electrodo y la frecuencia se configuran como se describe en la presente memoria para asegurar que cualquier cambio en la capacitancia a granel del líquido de muestra provoque un cambio en el componente de señal desfasada medido.

Mientras que el componente de conductividad es una medición que está relacionada con la presencia o ausencia de subproductos bacterianos metabólicos tales como diferentes gases (por ejemplo CO<sub>2</sub>) en la muestra, el componente capacitivo refleja más directamente la presencia o ausencia absoluta de bacterias en una cavidad. Ya que se detecta la presencia de la bacteria (y no los subproductos metabólicos de la bacteria), todas las cavidades en la agrupación pueden compartir un espacio de cabeza común o colectivo. Esto alivia a la agrupación de cavidades de una restricción de diseño (es decir, cavidades o cámaras aisladas entre sí de manera estanca al gas), lo que a su vez permite una agrupación de cavidades desechables muy simple y de bajo coste con fácil acceso a dichas cavidades que contiene una muestra determinada como positiva para las bacterias.

En referencia a las figuras, la Figura 1 es una vista lateral en corte de una agrupación 100. La base 110 de las cavidades 120 tiene electrodos 130 en comunicación eléctrica con los contactos 140. El volumen de las cavidades 120 es de 0,5 ml con una altura de 26 mm y un diámetro de 5 mm. El alojamiento, 150, está hecho de plástico, lo que hace que el ensamblaje sea de bajo coste.

La Figura 2 ilustra la base 110 de las cavidades 120 de la Figura 1 con una tapa 170 adjunta. La tapa 170 tiene una capa 160 metalizada subyacente que sirve como electrodo superior para cada cavidad. Los electrodos superiores se extienden dentro de sus respectivas cavidades de tal manera que la distancia entre el electrodo superior y el electrodo inferior es de 21,5 mm. En esta realización, como se describe a continuación, la distancia de 21,5 mm es ventajosa para detectar cambios en la impedancia atribuible a la presencia de bacterias en la muestra.

La Figura 3 ilustra la agrupación de cavidades de la Figura 1 con las cámaras llenas con el líquido 180 de muestra. Aunque se enumera en la vista lateral, la agrupación 100 es una agrupación de 96 cavidades (12x8) que aceptará 40 ml de líquido de muestra entre las 96 cavidades (0,5 ml).

La Figura 4 ilustra la agrupación de cavidades de la Figura 1 con las cámaras llenas con el líquido 180 de muestra. El volumen desechable efectivo que se controla para detectar la presencia de bacterias es el espacio entre los electrodos, que es solamente 0.417 ml en la realización ilustrada. El volumen efectivo de espacio de cabeza para la agrupación de cavidades es de 15,3 ml. Debido al espacio de cabeza colectivo, la relación gas/líquido es mayor o igual a la relación BACTEC™ de hasta 36 cámaras positivas. Esto significa que para una carga bacteriana de hasta 36 UFC por 10 ml de sangre total existirían condiciones óptimas de crecimiento. Para una carga bacteriana superior a 36 UFC por 10 ml de sangre total, las condiciones de crecimiento serían algo menos que óptimas, pero estos casos son poco frecuentes. Se debería tener en cuenta que se recomienda una muestra de sangre de 10 ml para capturar al menos uno o dos microorganismos de los pacientes en el volumen de la muestra.

La Figura 5 ilustra un esquema de un circuito 200 de medición de impedancia para las cavidades 120 en la agrupación 100 según una realización de la presente invención. En esta realización, se aplica una fuente 210 de señal a un electrodo 120 superior y se utiliza un voltímetro 220 vectorial para detectar la impedancia de la muestra 180 y los cambios en la impedancia con respecto a una tensión 230 de referencia. Los demultiplexores 240 y los multiplexores 250 se despliegan para asegurar que la señal se aplique y se lea cavidad por cavidad.

La Figura 6 ilustra un mecanismo para interrogar a las cámaras individuales de la agrupación desechable. Todas las 96 cámaras se pueden interrogar individualmente utilizando un demultiplexor 240 de 8 canales para dirigir los electrodos superiores, y un multiplexor 250 de 12 canales para captar la señal en los electrodos inferiores.

La Figura 7 ilustra dos gráficas que representan el componente de señal desfasada calculado frente a la frecuencia de medición circular ( $\omega=2\pi f$ ) para dos valores de la capacitancia de la muestra. Estas medidas son para una sola cavidad. La línea continua 260 es para una cavidad con una capacidad de 0.66 pF debido a su carga bacteriana. La línea discontinua 270 es para una cavidad con una capacidad dos veces mayor que la de la cavidad desde la cual se mide la señal de línea continua. Obsérvese que, a frecuencias más bajas, no hay diferencia en la señal desfasada de las dos cavidades, a pesar de las diferentes capacidades inducidas por bacterias. Sin embargo, a frecuencias más altas, se observan diferentes señales para diferentes concentraciones de bacterias.

La Figura 8 muestra las mismas dos gráficas que en la Figura 7, pero en escala lineal Y, y solamente dentro del intervalo de frecuencia circular  $10^5 - 10^6$  1/s, donde se observa una capacidad a granel que depende de la frecuencia en el paso por cero. Ya que se espera que un número creciente de bacterias dentro de la suspensión a granel aumente la capacitancia a granel, se espera que el crecimiento bacteriano provoque un cambio en la frecuencia inicial en el paso por cero a valores más altos. También es posible según las realizaciones descritas en la presente memoria determinar la frecuencia inicial en el paso por cero, sintonizar la frecuencia de medición a este valor y controlar la amplitud de señal desfasada con el paso del tiempo. Un aumento en el número de bacterias en la suspensión causaría a continuación, un

aumento en la amplitud de señal desfasada. En otras palabras, la presencia de una población creciente de bacterias se puede detectar controlando la amplitud de la señal desfasada con el paso del tiempo.

La Figura 9 ilustra el acortamiento esperado en el tiempo de detección que resulta del uso de cavidades de pequeño volumen en combinación con una resolución mejorada del sensor debido a la comparación de los vecinos próximos en una agrupación, y debido a la medición del componente de impedancia capacitiva. Específicamente, la Figura 9 ilustra que, para sensores de toda sensibilidad, una disminución en el volumen proporciona una disminución en el tiempo de detección. Bajar el volumen de la botella BACTEC™ estándar ( $8 \times 10^4 \mu\text{l}$ ) al volumen de las cavidades descritas en las realizaciones de la presente memoria (500  $\mu\text{l}$ ) proporciona un tiempo de detección significativamente reducido.

La detección bacteriana más rápida se logra mediante el aparato y el método descritos en este documento (i) debido al uso de cámaras de pequeño volumen (por ejemplo 0,5 mL o menos), (ii) debido a la capacidad de comparar la medición de una cavidad con la medición obtenida de una cavidad contigua en tiempo real, y (iii) debido al hecho de que el mecanismo de detección capacitiva dependiente de la frecuencia es mucho más sensible que el mecanismo de detección conductivo.

Como se ha observado anteriormente, el método y aparato de la presente invención se pueden utilizar con una amplia agrupación de muestras y medios de crecimiento. El entorno de prueba se puede adaptar al entorno de toma de muestras para proporcionar un número favorable de cavidades para el volumen de muestra (combinado con el medio). Es ventajoso si el medio es solo débilmente conductor ya que esto hace que el cambio en la impedancia debido a la presencia de bacterias, medido como un cambio en la capacitancia a granel, sea más fácil de medir. Las agrupaciones de cavidades macroscópicas son más fáciles de trabajar que las cámaras micro-flúidicas desplegadas en la técnica anterior para medir un cambio en la capacitancia de la muestra, solamente necesitan un relleno, son desechables y pueden aceptar y controlar una muestra de sangre pura de 10 ml. También, las bacterias crecerán en las cavidades macroscópicas descritas en la presente memoria y experimentarán un crecimiento lento o ningún crecimiento en un entorno micro-flúidico cerrado sin suficiente volumen de espacio de cabeza.

Además, una agrupación abierta de micro-cavidades proporcionará una cantidad suficiente de oxígeno para el crecimiento óptimo de las especies de microorganismos aeróbicos durante todo el proceso de crecimiento debido al espacio de cabeza colectivo. No hay necesidad de cámaras cerradas herméticamente, porque no se controlan los metabolitos gaseosos. Se logra una resolución de detección práctica mejorada debido al uso de una agrupación de cavidades que posibilita la comparación cavidad a cavidad en tiempo real de las mediciones de impedancia. La presente invención es ventajosa porque no requiere el uso de un sensor químico. La agrupación abierta no solamente es económica y desechable, sino que también es adecuada para usar con la automatización robótica, tal como la dispensación y extracción de muestras de sangre y la transferencia de muestras desde cámaras positivas a otras cavidades o un segundo desechable de diseño similar para procedimientos de ID/AST aguas abajo en el mismo instrumento

La Figura 10 es una ilustración más detallada que muestra un aparato según una realización de la presente invención. Se utiliza un amplificador de bloqueo común que contiene un generador 210 de señal interno para alimentar una señal de RF sinusoidal a un electrodo de una cámara 220 de medición de impedancia dieléctrica. El segundo electrodo de dicha cámara está conectado con la entrada 265 de señal de dicho amplificador de bloqueo.

Como sabe un experto en la técnica, el líquido de muestra dentro de dicha cámara, que está en contacto directo con los dos electrodos, puede describirse mediante la red eléctrica que se muestra en la caja discontinua 225 de la Figura 10. Por ello,  $C_i$  representa la capacitancia de interfaz entre los electrodos metálicos y el líquido,  $R_i$  representa la resistencia de interfaz entre los electrodos metálicos y el líquido,  $R_b$  es la resistencia a granel del líquido y  $C_b$  es la capacitancia a granel.

Se supone que el generador 210 de señal interna del amplificador de bloqueo tiene una resistencia interna típica de 50  $\Omega$ , y que la etapa 235 de entrada del amplificador de bloqueo tiene una capacitancia típica de 15 pF y una resistencia de entrada típica de 10 M $\Omega$ .

Según la presente invención, se puede seleccionar una resistencia de coincidencia de fuente  $R_s$  (215), como se muestra en la Figura 10, y una resistencia de carga de medición  $R_m$  (216), también mostrada en la Figura 10, de manera que, para una cámara de medición dieléctrica y líquido dados, el espectro de frecuencia del componente desfasado de la señal de medición muestra una característica de paso por cero que (i) depende del valor de  $C_b$ , y (ii) se posiciona a una frecuencia convenientemente baja por debajo de 100 kHz, lo que permite el uso de amplificadores de bloqueo estándares. Los datos registrados en las figuras adjuntas se han obtenido con un amplificador de bloqueo DSP de 100 kHz de Stanford Research Systems Model SR850. Se ha encontrado que  $R_s = 500 \Omega$  y  $R_m = 500 \Omega$  están produciendo frecuencias de paso por cero dentro del intervalo de 30 a 100 kHz para el medio de crecimiento de hemocultivos típicos como Aeróbio/F Estándar de Becton Dickinson Diagnostics en Sparks, MD. En un aparato según la Figura 10, la amplitud de la señal desfasada como se ha medido con el amplificador 235 de bloqueo es inversamente proporcional al valor de impedancia desfasada. En otras palabras, el valor de impedancia desfasada está en su máximo a una frecuencia de paso por cero de la amplitud de la señal desfasada como se ha medido en la forma descrita en la presente memoria. Debería comprenderse que el aparato ilustrado en la Figura 10 es solamente un ejemplo. El experto

comprenderá que el método y el aparato descritos en la presente memoria pueden reducirse a la práctica mediante el uso de cualquier generador de señal apropiado y cualquier voltímetro vectorial apropiado como se indica en el aparato ilustrado en la Figura 5.

5 Debería observarse que, cambiando las dimensiones de la cámara de medición de impedancia, o reemplazando el medio de crecimiento con otra muestra líquida, dará como resultado otros valores óptimos para  $R_s$  y  $R_m$ .

La Figura 11 compara el área de la placa 410 de 96 cavidades descrita en la presente memoria con el área de una placa 400 de prueba de 96 cavidades estándar. La placa de prueba de cavidades descrita en la presente memoria tiene un  
10 área sustancialmente reducida en comparación con la placa de prueba de 96 cavidades estándar.

Como se ha descrito anteriormente en el contexto de la Figura 10, el método descrito en la presente memoria aprovecha la relación entre la capacitancia a granel y el espectro de frecuencia del componente desfasado de la señal de medición. Para una mejor comparación entre los espectros de frecuencia calculados y los realmente medidos, la Figura 12  
15 muestra el espectro calculado de la Figura 7, pero en escala lineal. Nuevamente, a frecuencias circulares más bajas, los espectros para muestras que tienen las dos capacitancias diferentes son prácticamente idénticos.

Las gráficas en las Figuras 13A y 13B muestran datos realmente registrados utilizando medios de crecimiento Aeróbio/F estándar Becton Dickinson BACTEC™, sin bacterias. Como se puede ver en la Figura 13A, el espectro registrado es  
20 muy similar al calculado que se muestra en la Figura 12. En este caso, se observa una característica de paso por cero cerca de 60 kHz. La gráfica que se muestra en la Figura 13B se comprende mejor cuando se compara con la Figura 8. Debido al hecho de que no hay bacterias presentes en la muestra real, solamente se observa una frecuencia de paso por cero en la Figura 13B. Las imágenes de pantalla que se muestran en las Figuras 14A a 14C indican que se observan espectros de frecuencia muy similares con una característica de paso por cero para todas las cavidades que  
25 se interrogan. Obsérvese que cada cavidad muestra una frecuencia de paso por cero diferente, incluso si cada cavidad está llena con la misma cantidad de medio de crecimiento. Sin embargo, esto no presenta un problema ya que un instrumento automatizado determinará la frecuencia de paso por cero para cada cavidad, y la determinación del posible crecimiento bacteriano se realiza a estas frecuencias.

30 Como se ha observado previamente, la concentración de crecimiento de bacterias en una muestra afecta a la capacitancia a granel de la muestra (todos los demás factores son los mismos).

La Figura 15 ilustra que, para una muestra dada, un cambio en la concentración bacteriana dará como resultado un cambio en la frecuencia a la cual la señal desfasada es cero. Por lo tanto, un experto en la técnica apreciará que se  
35 puede detectar el crecimiento bacteriano controlando la frecuencia de esta característica de paso por cero de la señal desfasada. Un cambio en la frecuencia hacia frecuencias más altas es un cambio en la concentración de bacterias atribuible al crecimiento bacteriano. La gráfica a la izquierda en la Figura 15 muestra tal cambio hacia frecuencias más altas aproximadamente 3,5 horas después de la incubación. En otras palabras, la presencia de una población bacteriana en crecimiento se ha detectado después de 3,5 horas. La gráfica a la derecha en la Figura 15 es la curva de  
40 crecimiento medida en un instrumento BACTEC™ para una botella BACTEC™ que contiene el mismo líquido de muestra. En este caso, se ha detectado la presencia de bacterias a las 9,33 horas.

En lugar de determinar un posible cambio en la frecuencia de paso por cero cada 10 minutos como en la Figura 15, uno podría determinar una frecuencia de paso por cero inicial solamente una vez, operar la configuración a esta frecuencia  
45 fija y controlar el curso del tiempo de la amplitud de señal desfasada. Si no hubiera efectos de deriva y no se produjera crecimiento bacteriano, dicha amplitud se mantendría a cero. El crecimiento bacteriano causaría un cambio en la amplitud de la señal hacia valores positivos como consecuencia de una capacitancia a granel creciente.

En configuraciones experimentales prácticas, puede haber una deriva en la amplitud de la señal con el paso del tiempo. Se observa una deriva hacia valores de amplitud negativos para el medio de crecimiento BACTEC™ Aeróbio/F Estándar. Esto se muestra en la Figura 16, donde la frecuencia se ha fijado en el valor inicial de paso por cero, y a  
50 continuación la amplitud de la señal desfasada se ha registrado con el paso del tiempo. Como se puede ver, la amplitud de la señal se mueve hacia valores negativos después de la incubación, pero se vuelve bruscamente hacia valores positivos después de tres horas. Esto significa que se ha detectado la presencia de una población bacteriana en crecimiento después de tres horas. Una curva de crecimiento BACTEC™, que se muestra a la derecha en la Figura 16  
55 para comparación, revela la presencia de crecimiento bacteriano después de 9,25 horas.

La "curva de crecimiento" a la izquierda en la Figura 16 muestra un aumento muy pronunciado. La Figura 17 ilustra el conjunto completo de datos de la curva que se muestra en la Figura 16. Esta curva muestra un fuerte aumento adicional  
60 después de aproximadamente 9 horas, es decir, cuando la botella de cultivo en el instrumento BACTEC™ se vuelve positiva. Aunque el solicitante no desea estar sujeto a una teoría particular, el solicitante afirma que esto es indicativo de la respuesta del sensor químico a cambios químicos más robustos en una botella de cultivo. El enfoque de impedancia relacionada con la capacitancia a granel es mucho más sensible. Las curvas de crecimiento a la derecha en la Figura 17 ilustran que, incluso con diferentes grados de "zoom y" excluyendo el zoom en x, solamente una curva muestra el  
65 crecimiento en dos horas. Por consiguiente, el crecimiento bacteriano puede tener lugar mucho antes de que un sensor químico típico pueda detectarlo.

La Figura 18 ilustra una realización alternativa de un aparato para medir la capacitancia dieléctrica de una muestra líquida para determinar la presencia o ausencia de microorganismos en ella que se describe en la Figura 10, pero con sintonización automática de la frecuencia de medición a la frecuencia de paso por cero, dependiente de bacterias. La salida de señal desfasada de un detector de señal sensible a la fase está conectada a la entrada de un integrador electrónico. La salida del integrador está conectada a la entrada de control de frecuencia de un oscilador controlado por tensión que actúa como generador de señal como en el aparato que se muestra en 210A en la Figura 10. Nuevamente,  $C_i$  representa la capacitancia de interfaz entre los electrodos metálicos y el líquido,  $R_i$  representa la resistencia de interfaz entre los electrodos metálicos y el líquido,  $R_b$  es la resistencia a granel del líquido y  $C_b$  es la capacitancia a granel.

En esta realización, un oscilador controlado por tensión ("VOC") genera una señal eléctrica sinusoidal y se acopla eléctricamente a un electrodo 460 en contacto con la muestra. Un segundo electrodo, también en contacto con la muestra, está conectado eléctricamente a un detector de señal sensible a la fase. La señal de salida desfasada del detector de señal sensible a la fase está acoplada a un integrador. La salida del integrador está acoplada a la entrada de control de frecuencia del VOC. Esto hace que la frecuencia del VOC se sintonice hasta que la amplitud de señal desfasada medida por el detector de señal sensible a la fase sea cero. Con el paso del tiempo, un aumento en la frecuencia sintonizada indica el crecimiento de microorganismos dentro de la muestra.

En la operación, la tensión de salida del integrador está afectando la frecuencia del oscilador controlado por tensión. Esto puede explicarse, por ejemplo, haciendo referencia a las Figuras 13A y 13B. Si en este ejemplo la frecuencia de inicio está por debajo de 60 kHz, la amplitud de señal desfasada es positiva. Esto conduce a una tensión de salida positiva en la salida del integrador y, por consiguiente, a un aumento en la frecuencia del oscilador controlado por tensión. El aumento de frecuencia continuará hasta que se alcance la frecuencia de paso por cero. En este momento, la amplitud desfasada se convierte en cero, y no se produce más integración, dejando la frecuencia del oscilador controlado por tensión en la frecuencia de paso por cero, que es 60.723 kHz en este ejemplo. Si la frecuencia inicial es demasiado alta, la frecuencia real de paso por cero se abordaría automáticamente desde la frecuencia demasiado alta. La presencia de bacterias podría detectarse registrando la frecuencia de paso por cero con el paso del tiempo y buscando un aumento.

La ventaja del aparato según la Figura 18 es que se puede determinar una frecuencia de paso por cero con una precisión extremadamente alta. Debido al hecho de que se genera una "Señal Cero" a la salida del detector de señal sensible a la fase, cualquier deriva en la amplitud del generador de señal o en la ganancia interna del detector de señal sensible a la fase no tendrá efecto en la frecuencia de paso por cero sintonizada automáticamente, que representa la información de salida del sistema.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de detección de crecimiento microbiano basado en la impedancia que comprende las etapas de:

5 proporcionar un recipiente que contiene una muestra líquida sospechosa de contener microorganismos dispuestos entre y en contacto con el primer y segundo electrodos en donde opcionalmente el recipiente es parte de un contenedor de muestra que tiene uno o más recipientes; proporcionar una señal eléctrica que varía con el tiempo al primer electrodo en contacto con la muestra líquida, en donde el segundo electrodo está conectado eléctricamente a un detector de señal sensible a la fase; y uno de:

- 15 a) seleccionar una frecuencia de dicha señal eléctrica de manera que una amplitud de señal desfasada medida por dicho detector resulte igual a cero a la frecuencia seleccionada, y controlar la amplitud de señal desfasada con el paso del tiempo con el detector de señal sensible a la fase, en donde un aumento en la amplitud de señal con el paso del tiempo indica crecimiento microbiano dentro de la muestra líquida;
- 20 b) controlar la amplitud de la señal desfasada con el paso del tiempo con el detector de señal sensible a la fase, determinar una frecuencia a la cual la amplitud desfasada es cero sintonizando una frecuencia de dicha señal eléctrica de manera que una amplitud de señal desfasada medida por dicho detector resulta igual a cero; y repetir la etapa de determinación a intervalos de tiempo predeterminados; en donde un aumento en dicha frecuencia con el paso del tiempo es una indicación de crecimiento microbiano dentro de dicha muestra líquida; o
- 25 c) en donde la señal que varía con el tiempo se genera mediante un oscilador controlado por tensión; y proporcionar una señal de salida desfasada integrada de dicho detector a una entrada de control de frecuencia del oscilador controlado por tensión por el que el oscilador se sintoniza a una frecuencia a la que la amplitud de señal desfasada medida por el detector es igual a cero y en donde un aumento en dicha frecuencia sintonizada con el paso del tiempo indica crecimiento microbiano dentro de dicha muestra líquida.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el recipiente es una agrupación de recipientes, al menos una pluralidad de los cuales contiene una muestra líquida sospechosa de contener microorganismos dispuestos entre y en contacto con el primer y segundo electrodos dispuestos en la agrupación de recipientes, comprendiendo además el método de detección de bacterias basado en la impedancia:

35 proporcionar una señal eléctrica que varía con el tiempo generada a los primeros electrodos de la pluralidad de recipientes en la agrupación de recipientes, y recibir la señal que varía con el tiempo transmitida a través de la pluralidad de recipientes; y transmitir la señal al detector de señal sensible a la fase.

3. El método de la reivindicación 1, en donde el volumen de la muestra es de aproximadamente 40 ml.

4. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra se combina con medio de crecimiento en el que crecerán microorganismos, si están presentes en la muestra.

5. El método de la reivindicación 4, en donde la muestra es de aproximadamente 100 ml de sangre combinada con aproximadamente 30 ml de medio de crecimiento.

6. El método de la reivindicación 2, en donde la agrupación de recipientes comparte un espacio de cabeza común.

7. El método de la reivindicación 1, en donde el primer electrodo es un electrodo inferior que forma la parte inferior del recipiente y el segundo electrodo es un electrodo superior que se extiende dentro del recipiente para entrar en contacto con la muestra.

8. Un aparato de detección de crecimiento microbiano basado en la impedancia que comprende:

60 un receptáculo adaptado para recibir un contenedor de muestra que comprende al menos un recipiente adaptado para contener una muestra líquida sospechosa de contener microorganismos dispuestos entre y en contacto con el primer y segundo electrodos dispuestos en el al menos un recipiente; un oscilador controlado por tensión para proporcionar una señal que varía con el tiempo al primer electrodo que se transmite a través de la muestra líquida al segundo electrodo; un detector de señal sensible a la fase conectado al segundo electrodo del recipiente; una salida del detector de señal que indica un cambio en la capacidad a granel de la muestra líquida; y un integrador acoplado a la salida del detector de señal, la salida del integrador acoplada a una entrada del oscilador controlado por tensión;

en donde el oscilador se puede sintonizar a una frecuencia a la cual una amplitud de señal desfasada medida por el detector es igual a cero; y  
en donde la salida del detector de señal indica un cambio en la frecuencia sintonizada.

- 5 9. El aparato de la reivindicación 8, en donde al menos un recipiente es una agrupación de recipientes, al menos una pluralidad de los cuales contiene una muestra líquida sospechosa de contener microorganismos dispuestos entre y en contacto con el primer y segundo electrodos dispuestos en la agrupación de recipientes del aparato de detección de bacterias basado en la impedancia que comprende además:
- 10 un demultiplexor para proporcionar la señal eléctrica que varía con el tiempo generada a los primeros electrodos de la pluralidad de recipientes en la agrupación de recipientes, y  
un multiplexor para recibir la señal que varía con el tiempo transmitida a través de la pluralidad de recipientes y que transmite la señal al detector de señal sensible a la fase.
- 15 10. El aparato de la reivindicación 9, en donde la agrupación de recipientes comparten un espacio de cabeza común.
11. El aparato de la reivindicación 8, en donde el primer electrodo es un electrodo inferior que forma la parte inferior de los recipientes y el segundo electrodo es un electrodo superior que se extiende dentro del recipiente para entrar en contacto con la muestra.
- 20

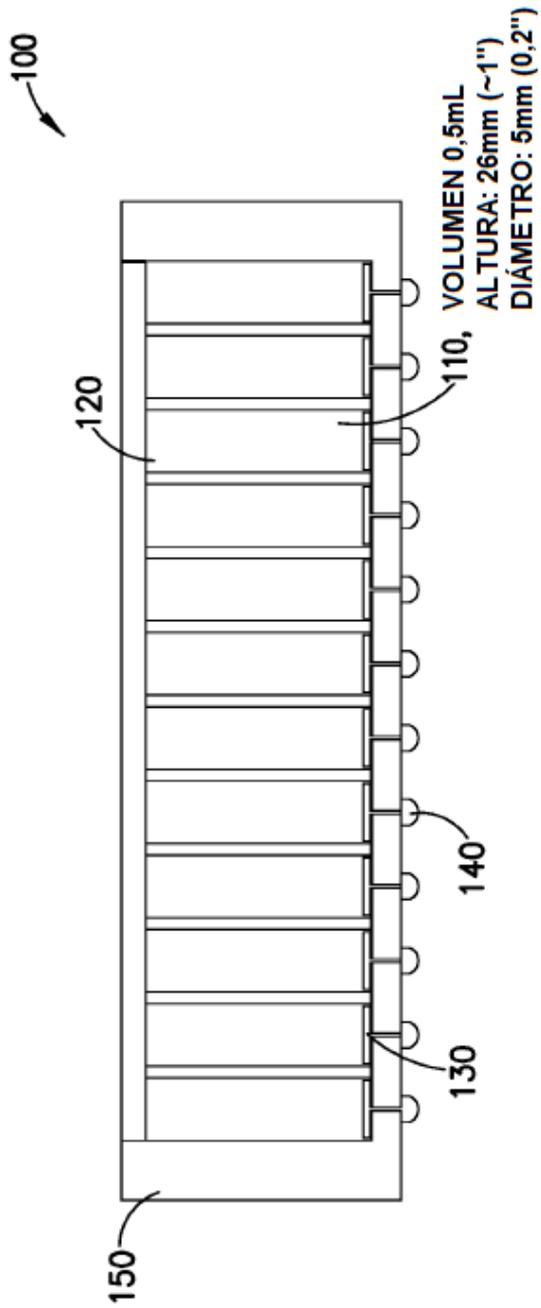


FIG. 1

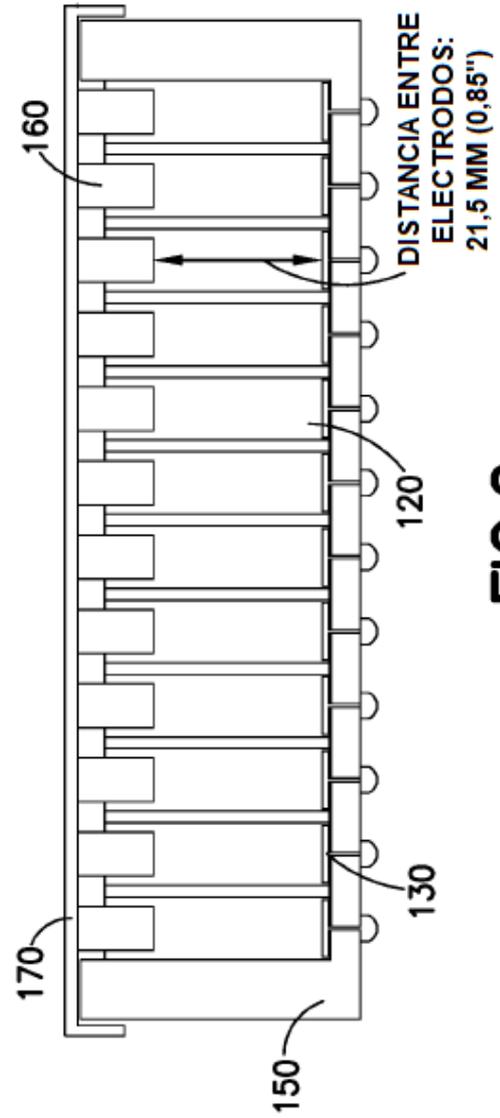
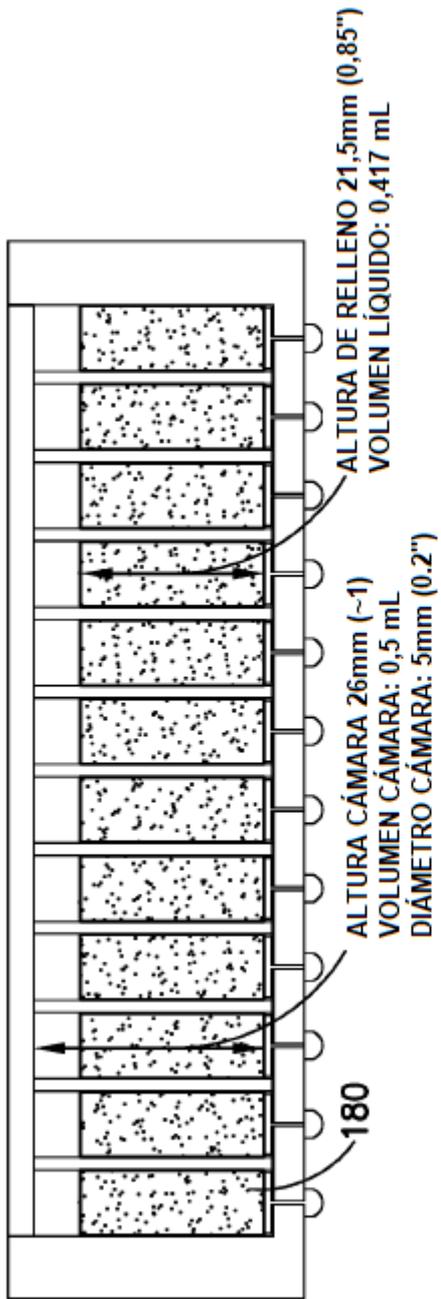
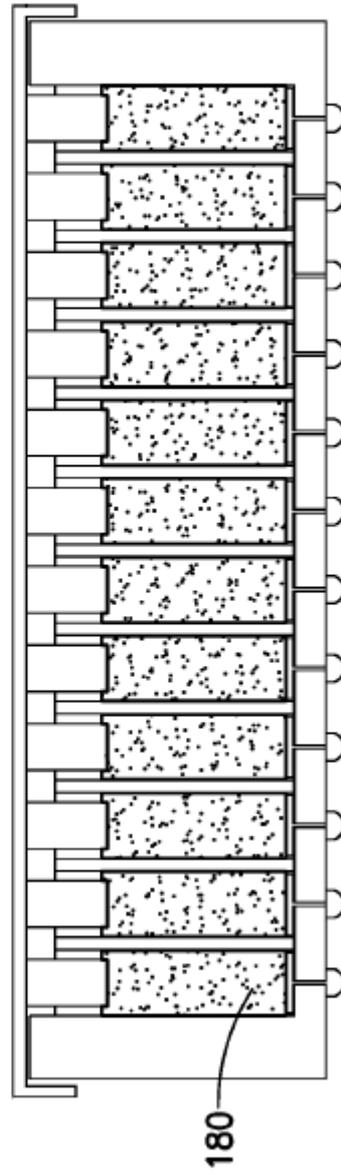


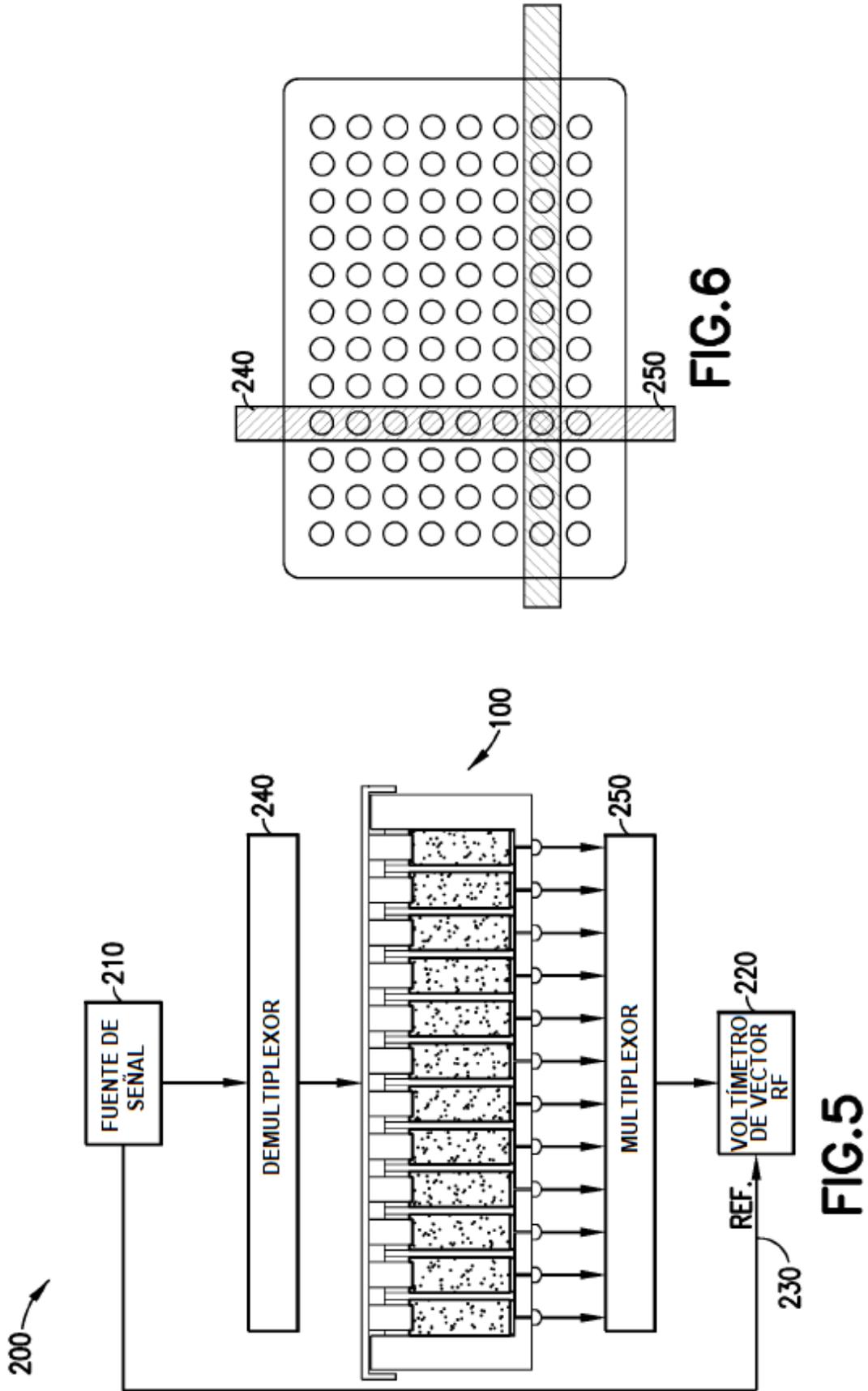
FIG. 2

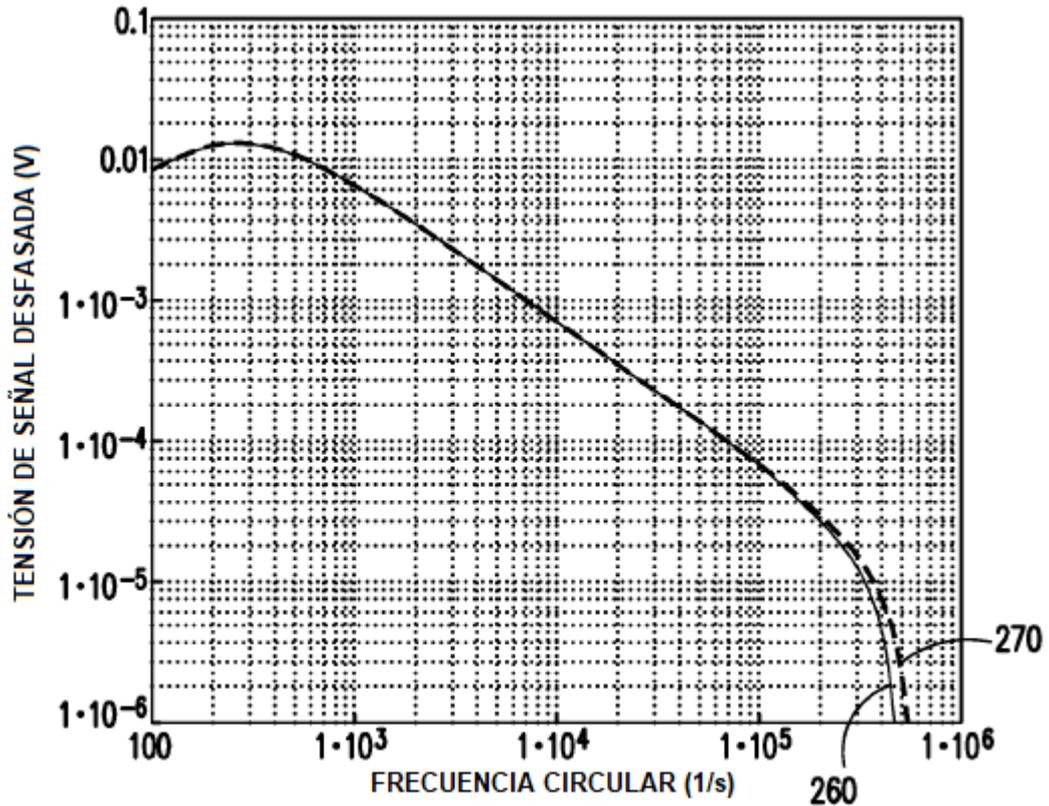


**FIG. 3**

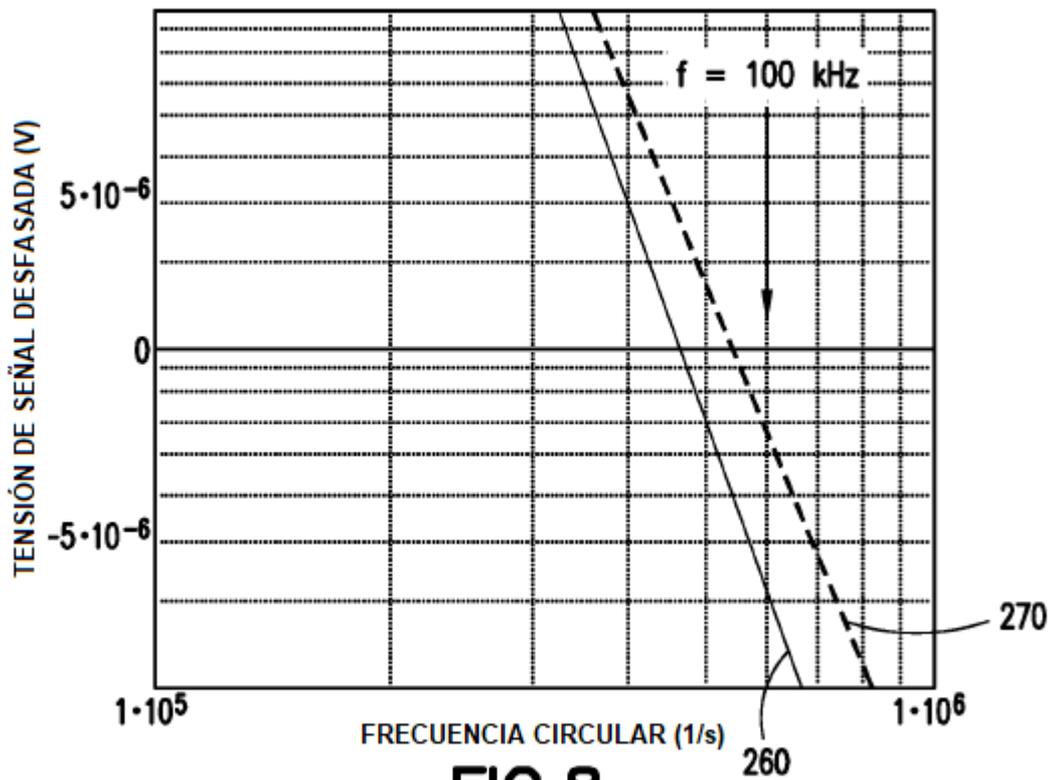


**FIG. 4**

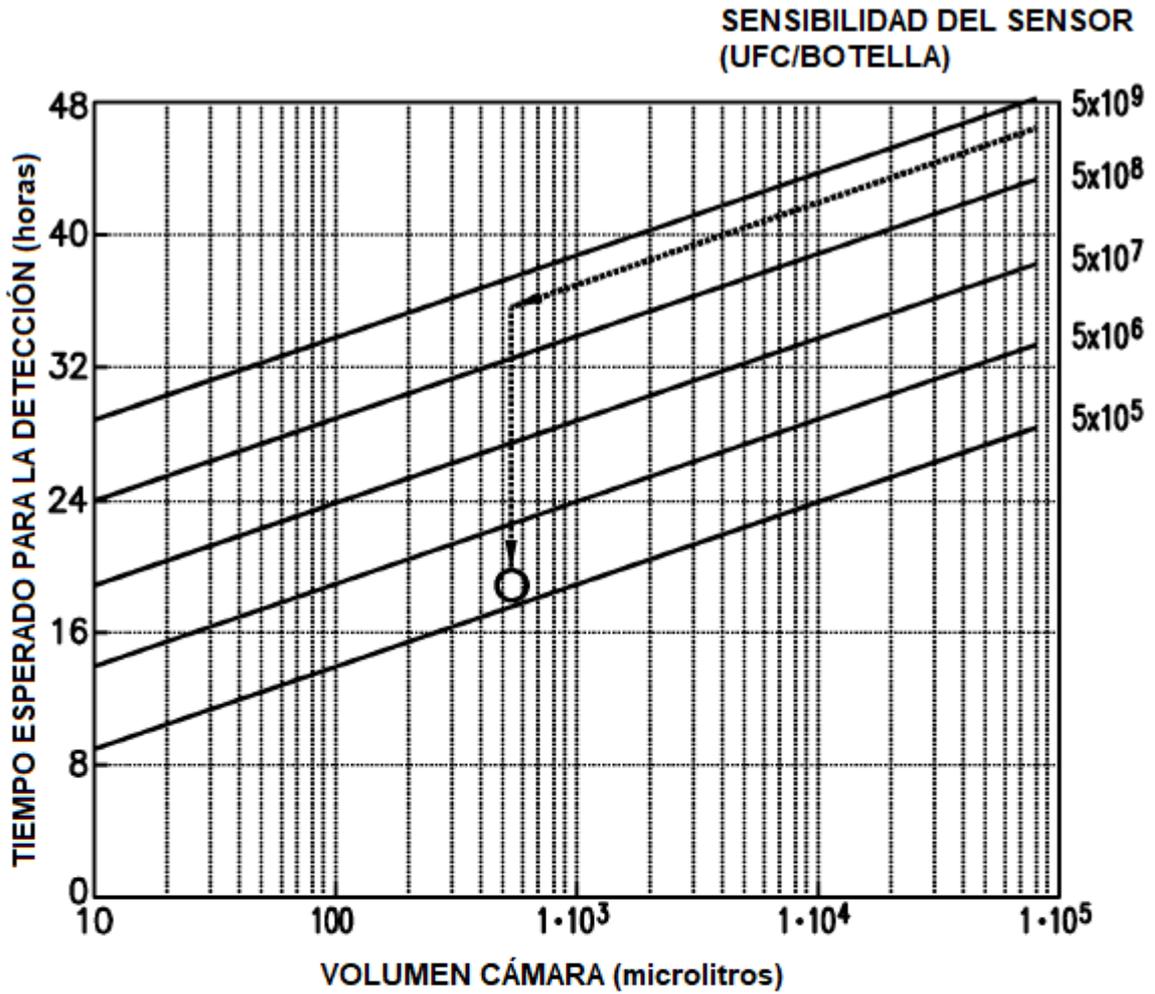




**FIG.7**

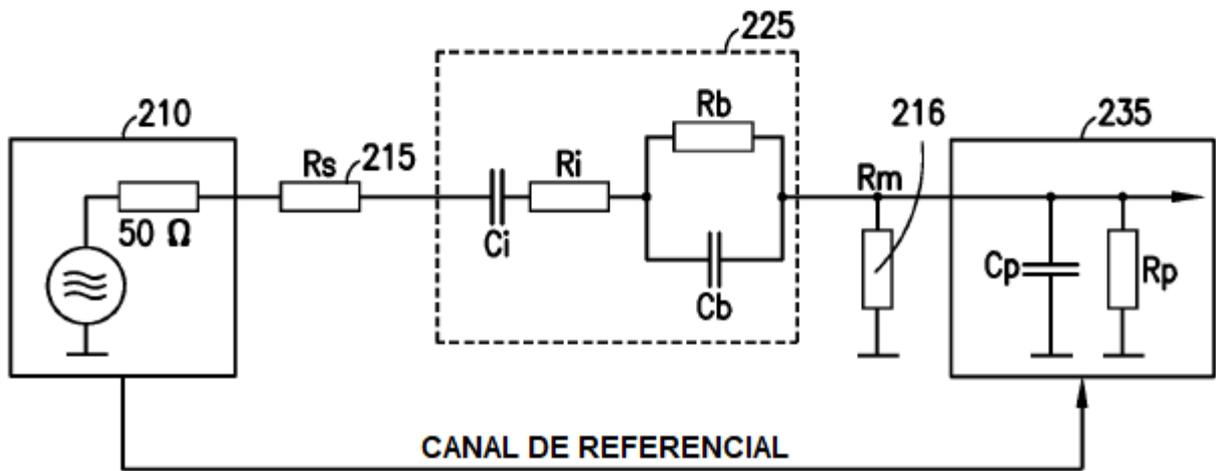


**FIG.8**



**FIG. 9**

↖ 200



**FIG. 10**

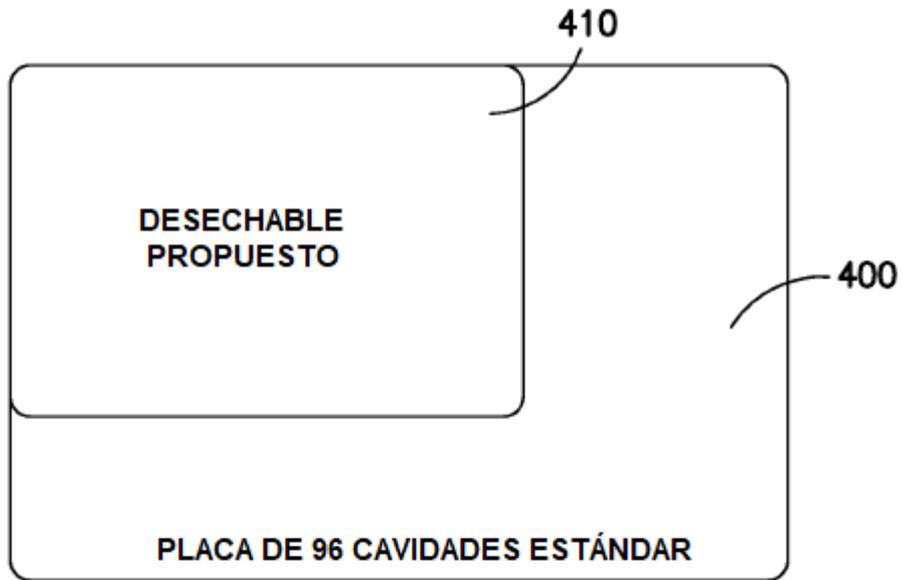


FIG. 11

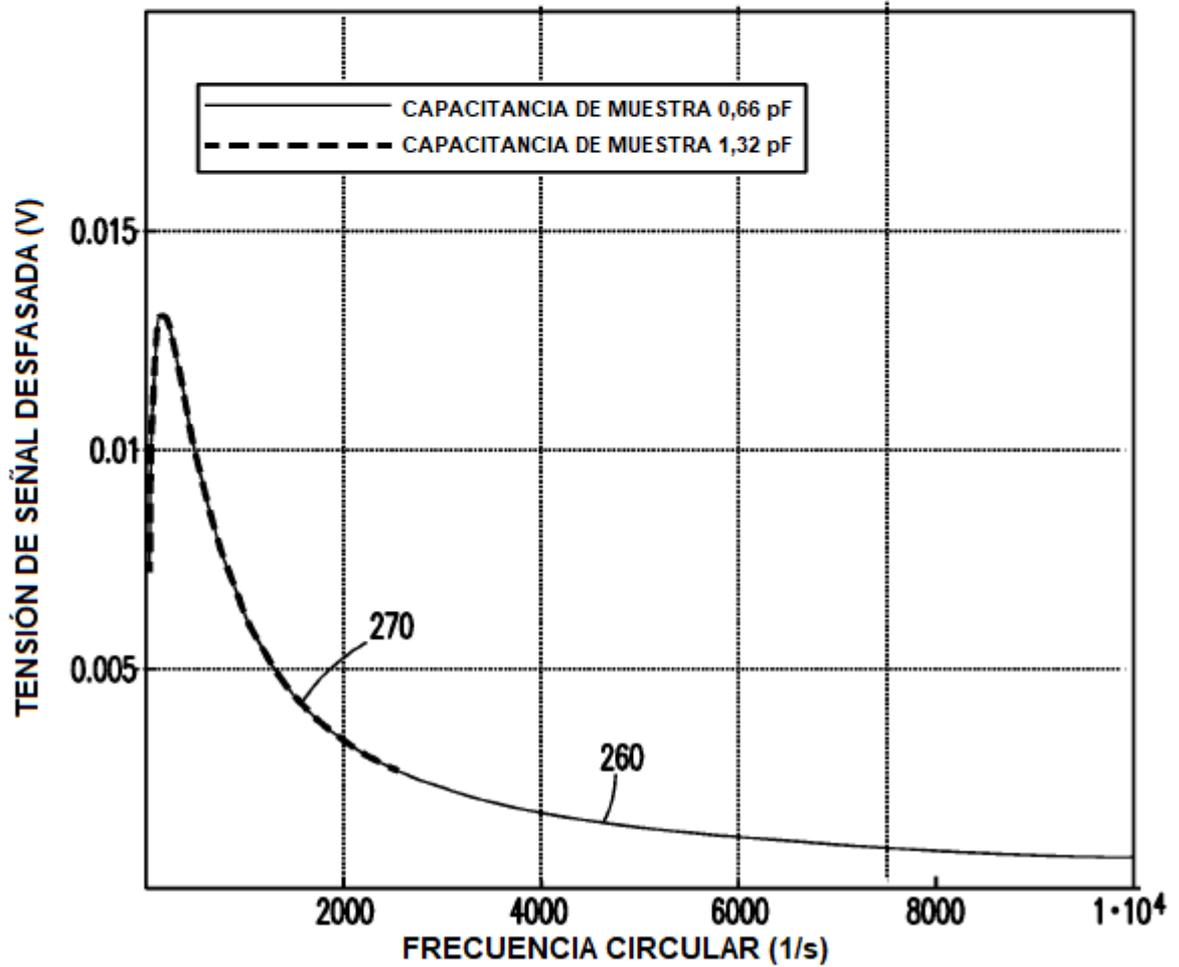
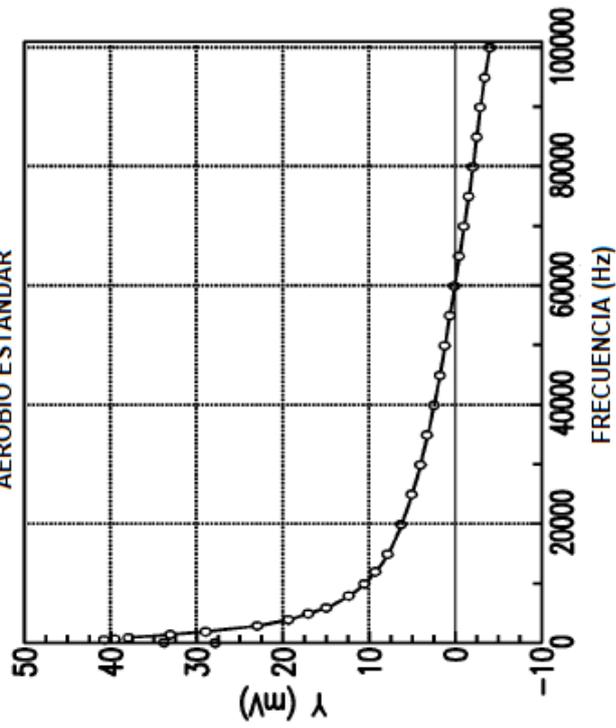


FIG. 12

ESPECTRO DE COMPONENTE DESFASADO  
REGISTRADO MANUALMENTE ESCALONADO

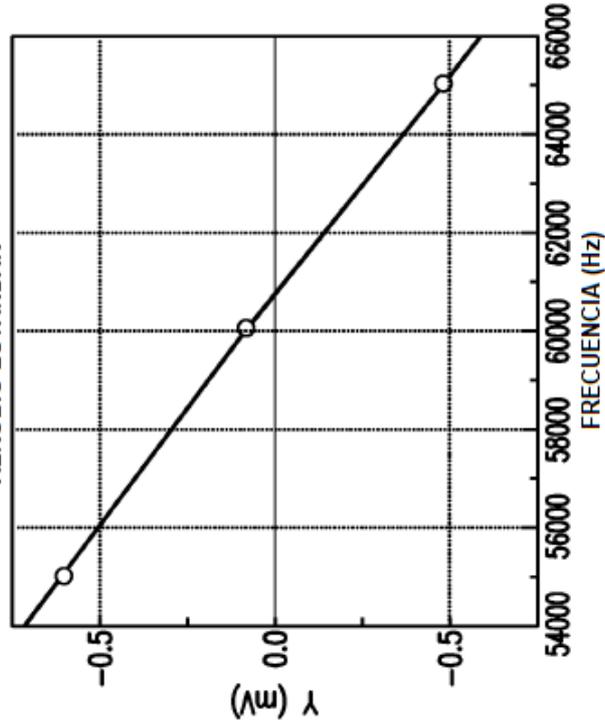
PARTE IMAGINARIA DE LA SEÑAL DE SALIDA  
FRENTE A LA FRECUENCIA DE MEDIO BACTEC™  
AERÓBIO ESTÁNDAR



**FIG.13A**

ACERCAMIENTO A LA REGIÓN DE PASO POR CERO

PARTE IMAGINARIA DE LA SEÑAL DE SALIDA  
FRENTE A LA FRECUENCIA DE MEDIO BACTEC™  
AERÓBIO ESTÁNDAR



**FIG.13B**

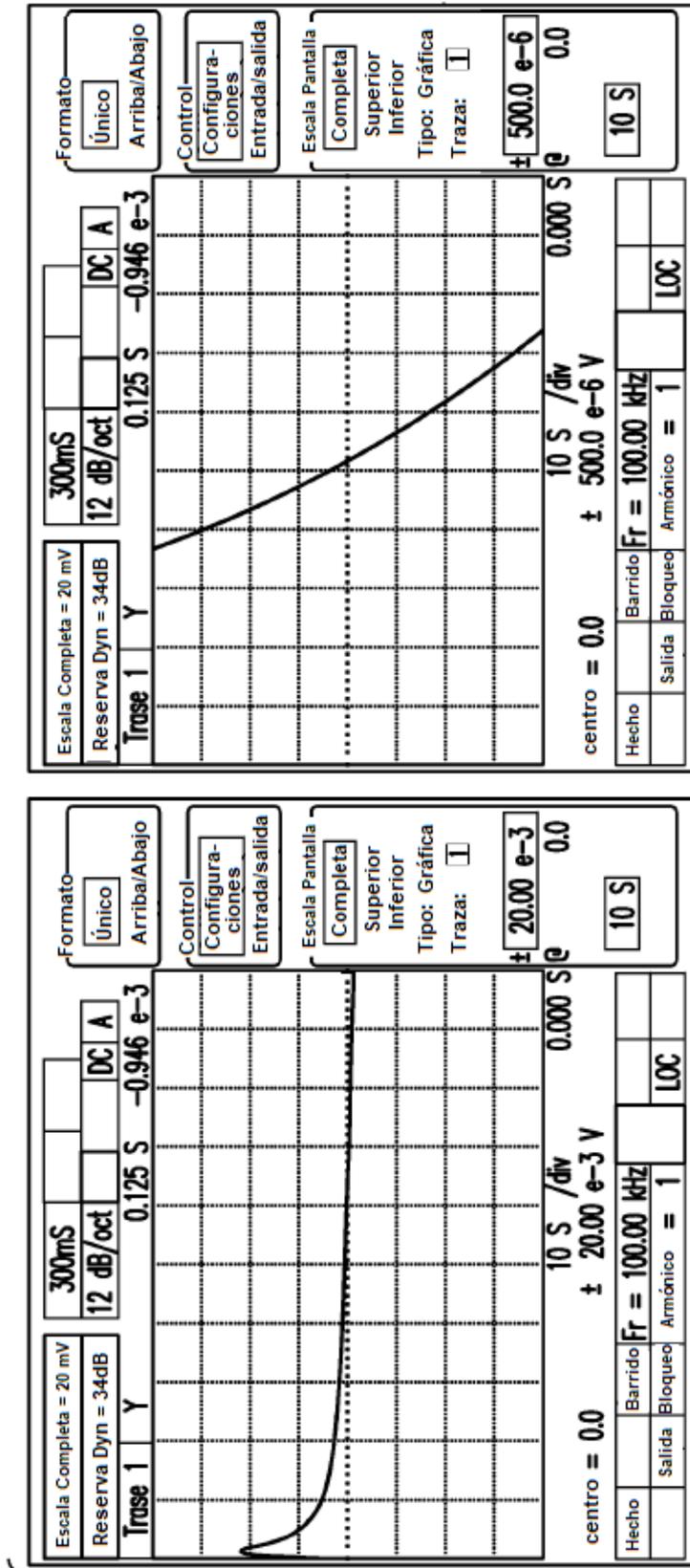


FIG.14A

FIG.14A

FIG.14B

FIG.14C

FIG.14

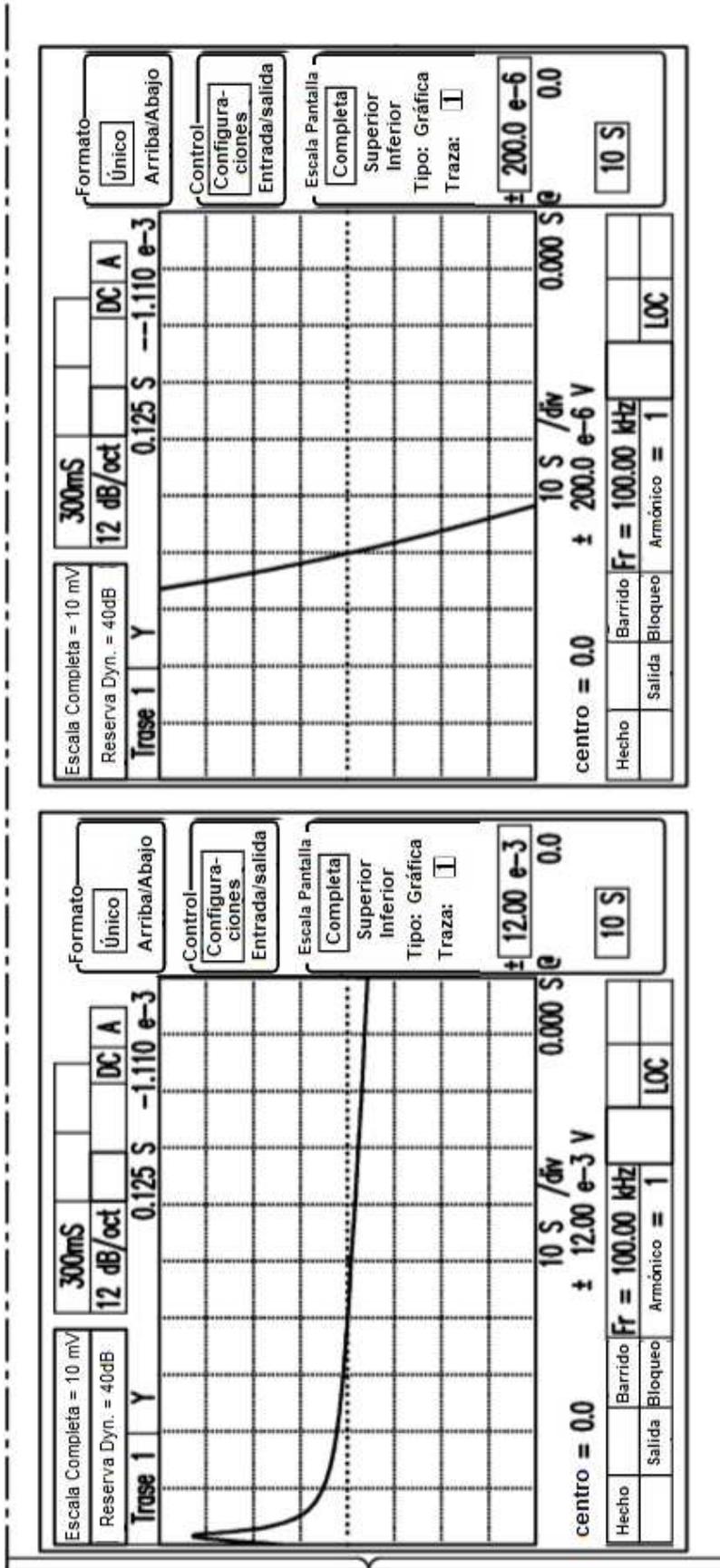


FIG.14B

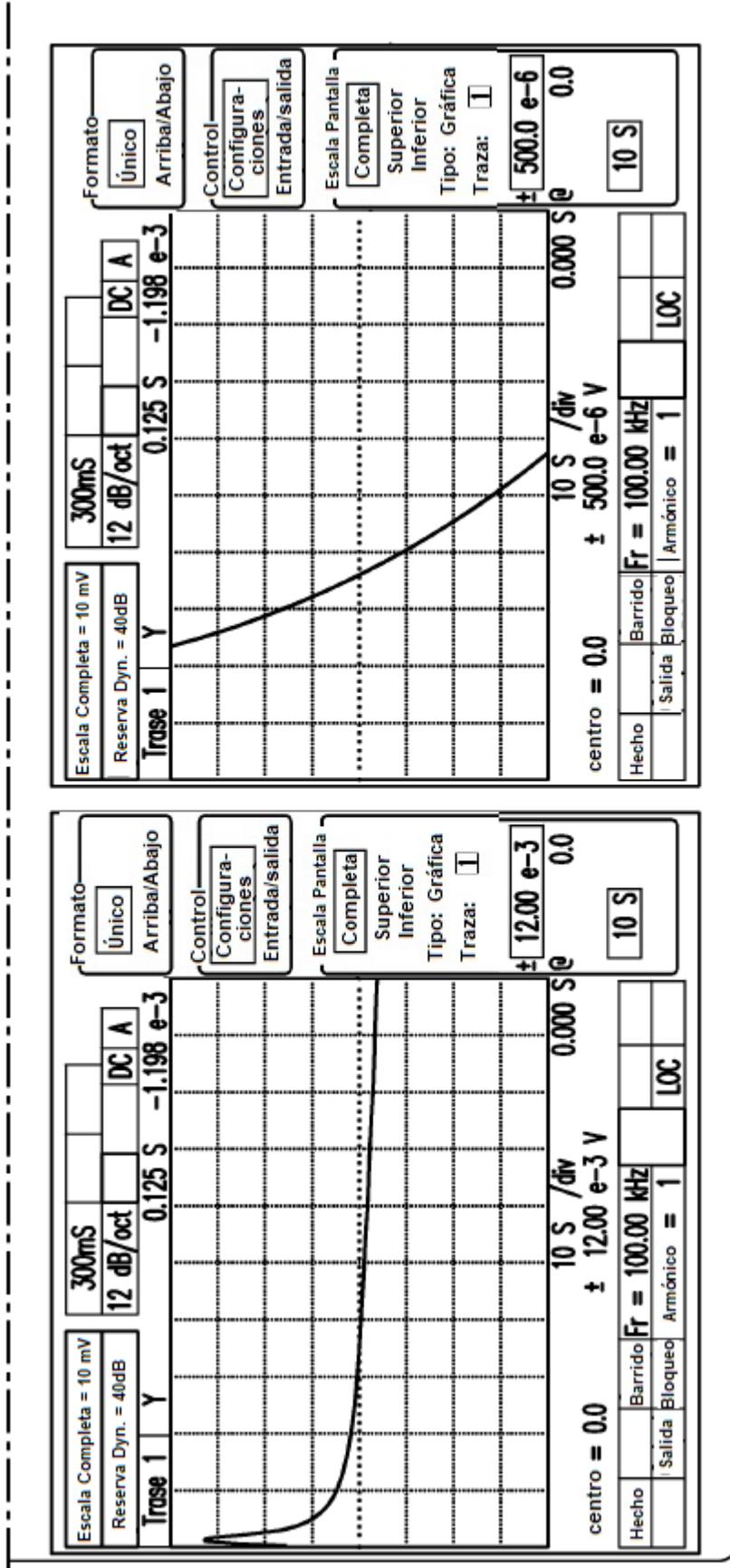
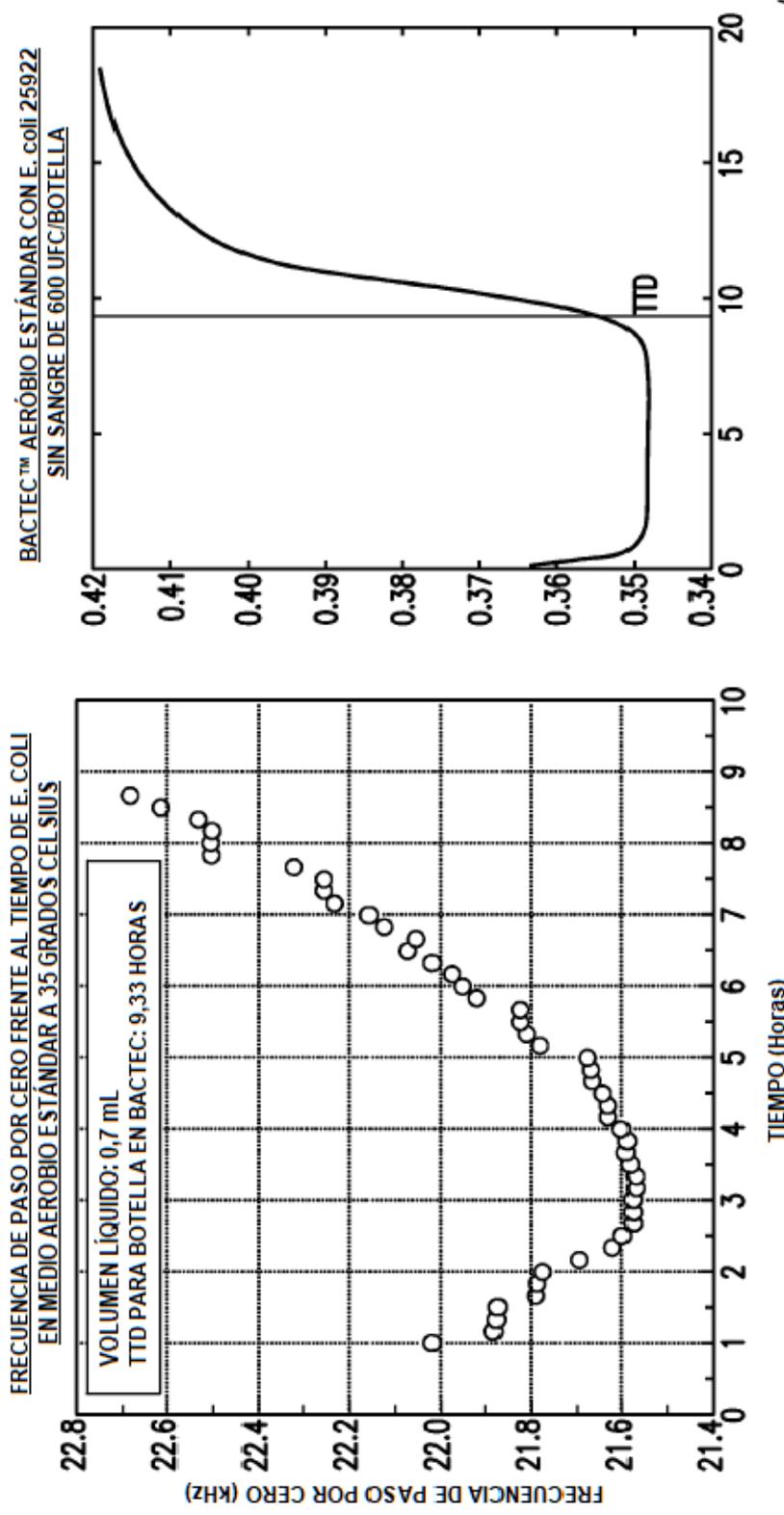


FIG. 14C



**FIG.15**

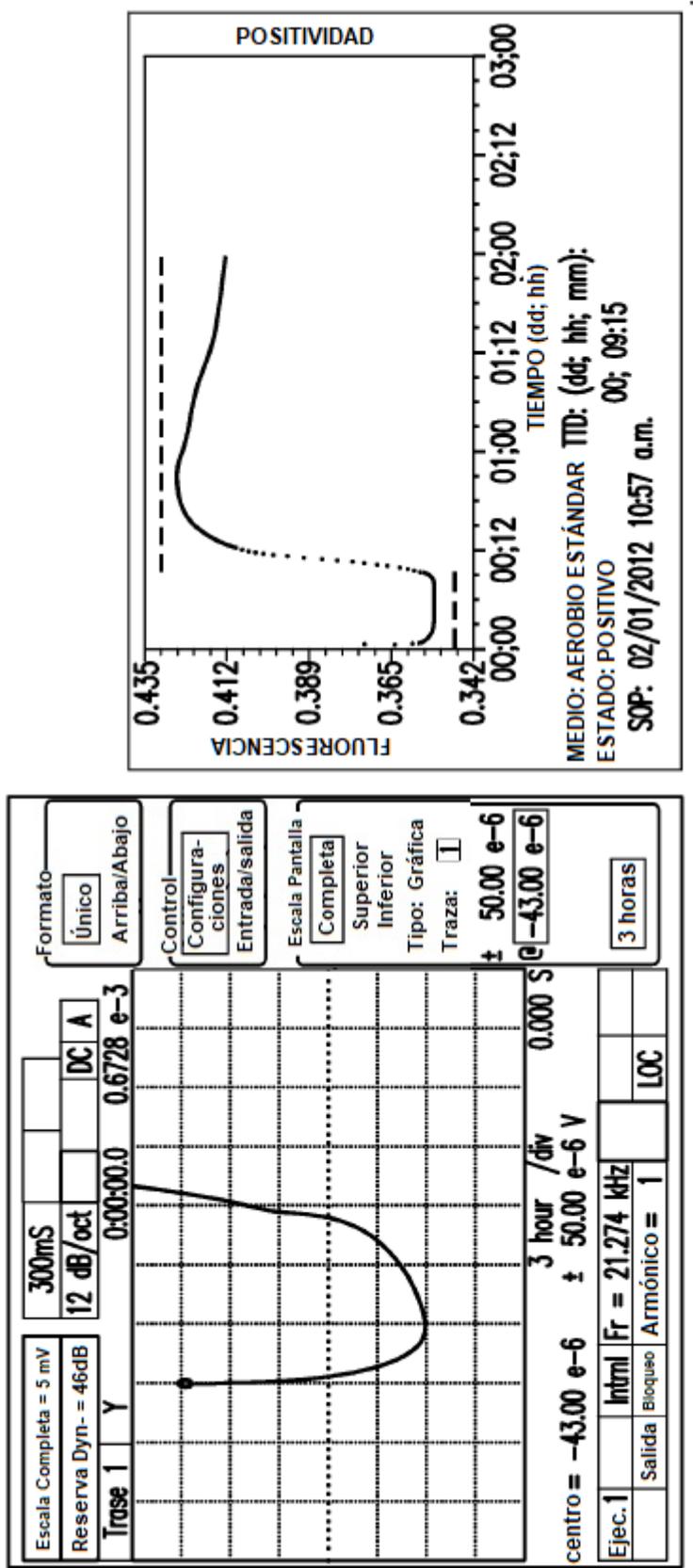


FIG.16

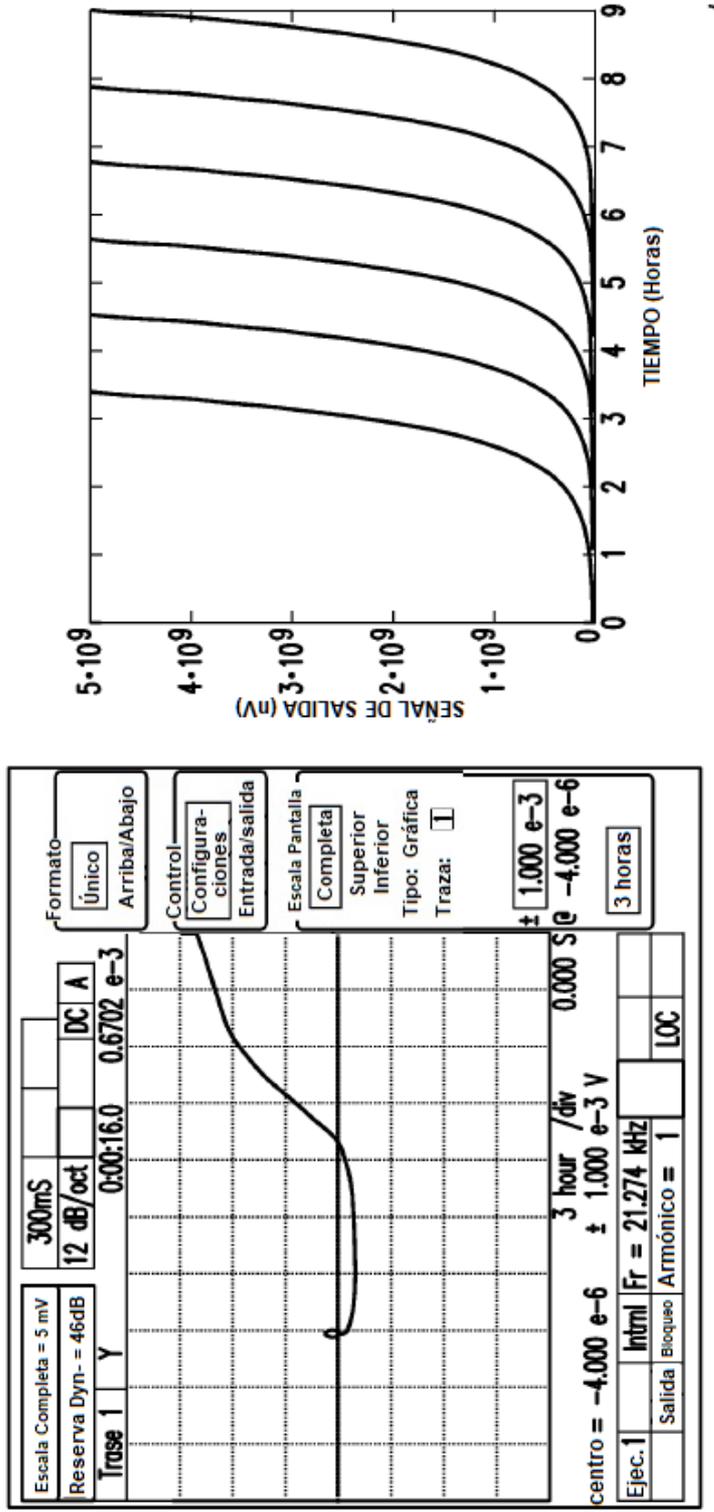


FIG.17

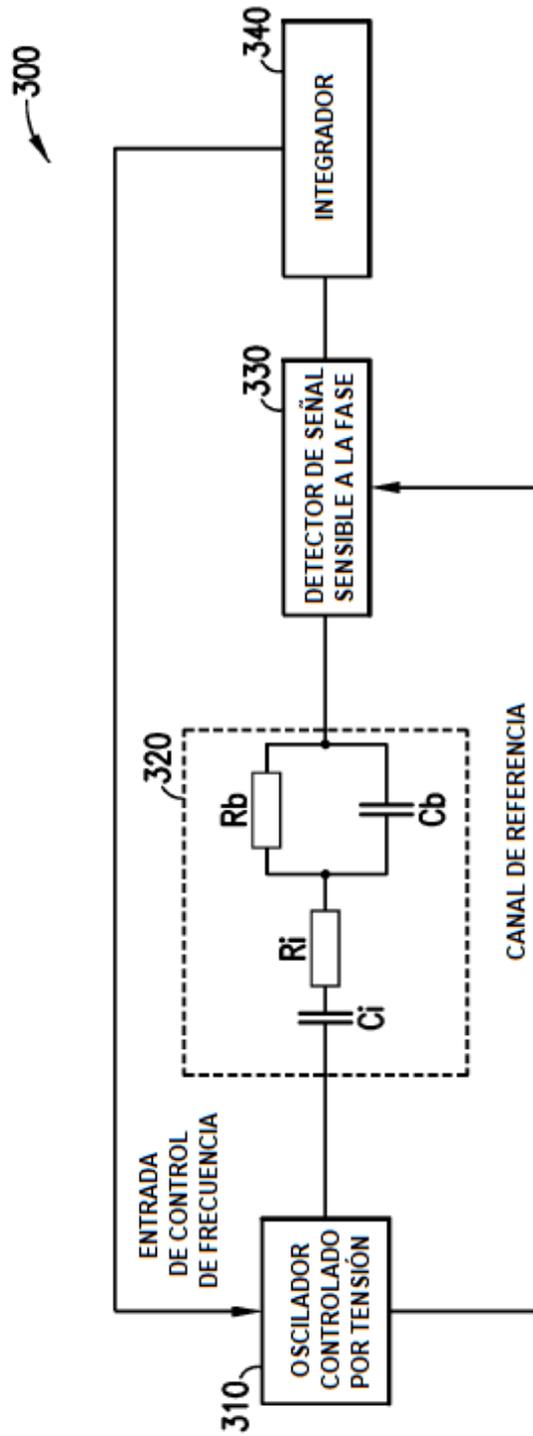


FIG.18