

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 211**

51 Int. Cl.:

**G01N 30/78** (2006.01)

**G01N 30/74** (2006.01)

**G01N 33/497** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2010 PCT/EP2010/067859**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2011 WO11061308**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2010 E 10788038 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 2502065**

54 Título: **Dispositivo y procedimiento para el análisis de muestras para el diagnóstico de enfermedades**

30 Prioridad:

**20.11.2009 GB 0920315**

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

**27.05.2020**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF THE WEST OF ENGLAND,  
BRISTOL (50.0%)  
Frenchay Campus, Coldharbour Lane  
Bristol BS16 1QY, GB y  
THE UNIVERSITY OF BRISTOL (50.0%)**

72 Inventor/es:

**RATCLIFFE, NORMAN;  
COSTELLO, BENJAMIN;  
EWEN, RICHARD y  
PROBERT, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

**DURAN-CORRETJER, S.L.P**

ES 2 763 211 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

Dispositivo y procedimiento para el análisis de muestras para el diagnóstico de enfermedades

- 5 La presente solicitud hace referencia a un aparato de diagnóstico para el análisis de una muestra para diagnosticar una enfermedad, y a un método para diagnosticar una enfermedad utilizando dicho aparato.
- Las enfermedades infecciosas tales como *Clostridioides difficile* (*C. difficile*), norovirus, cólera y campilobacteriosis se pueden propagar rápidamente, causando sufrimiento e incluso morbilidad a los afectados, y considerables dificultades y gastos para las autoridades de la salud pública que tratan a los pacientes e intentan gestionar los brotes de dichas enfermedades. Un problema importante en la gestión de los brotes es que, a menudo, existe un retraso entre la presentación de los síntomas de la enfermedad y la realización de un diagnóstico, debido a técnicas de diagnóstico prolongadas que requieren análisis de laboratorio manuales de las muestras, por ejemplo, muestras de heces, proporcionadas por los pacientes. En algunos casos, los resultados de dicho análisis pueden tardar hasta cinco días en estar disponibles, lo que lleva a retrasos innecesariamente largos en el diagnóstico del paciente. Hasta que se realiza un diagnóstico preciso, el tratamiento efectivo del paciente puede ser difícil, lo que puede conducir a un deterioro de la condición del paciente y al sufrimiento prolongado e innecesario del paciente. Adicionalmente, mientras el paciente está esperando el diagnóstico, la enfermedad se puede propagar a través del contacto con el paciente por parte del personal médico, parientes y otros, o por transmisión aérea. De este modo, los retrasos en el diagnóstico de enfermedades infecciosas pueden conducir a un brote extendido de la enfermedad.
- 10
- Las enfermedades no infecciosas pueden ser diagnosticadas, asimismo, mediante el análisis de una muestra proporcionada por un paciente. Por ejemplo, el cáncer de próstata generalmente se diagnostica mediante una combinación de técnicas como el examen rectal digital, una prueba de antígeno prostático específico (PSA, prostate specific antigen) en suero y una biopsia de próstata guiada por ultrasonido endorrectales. En todo el mundo, la utilización de los niveles séricos de PSA como prueba de cribado sigue siendo controvertida, debido a su baja especificidad (38 %) y a la alta tasa reconocida de resultados negativos falsos (hasta un 20 % con nivel de PSA < 4 ng ml<sup>-1</sup>). Un examen rectal digital y una biopsia de próstata guiada por ultrasonido endorrectales son procedimientos invasivos que son estresantes para el sujeto, y pueden disuadir a los pacientes de presentarse para la prueba.
- 15
- A la vista de esto, existe la necesidad de un sistema de diagnóstico altamente sensible, específico, no invasivo y rentable para diagnosticar la enfermedad de manera rápida y fácil en el punto de atención del paciente.
- 20
- Se han realizado esfuerzos para desarrollar técnicas de diagnóstico mediante las cuales la enfermedad se puede diagnosticar de manera rápida y precisa analizando muestras tales como muestras de heces, muestras de orina u otros mediante el análisis de biomarcadores volátiles. No obstante, estos esfuerzos no han tenido éxito hasta la fecha y se han visto obstaculizados por dificultades técnicas tales como el alto contenido de humedad de las muestras y la presencia en las muestras de sulfuros que son perjudiciales para los sensores. No obstante, lo más importante es la dificultad de seleccionar cómo analizar las muestras. Por ejemplo, se ha demostrado de manera experimental que las muestras de heces pueden contener una gran cantidad de diferentes compuestos orgánicos volátiles (VOC, volatile organic compounds); en un estudio de cohorte de muestras de heces proporcionadas por 30 donantes, se identificaron 297 VOC diferentes en las muestras de heces. Determinar cuál de estos compuestos y sustancias podría ser indicativo de enfermedad representa un problema importante que hasta ahora no ha sido resuelto.
- 25
- La publicación "Quantitative Determination of Volatile Organic Compounds in Indoor Dust Using Gas Chromatography-UV Spectrometry" de Nilsson *et al.*, describe una técnica que se utilizó para cuantificar compuestos orgánicos volátiles (VOC) en polvo depositado de 389 residencias en Suecia. Las muestras de polvo fueron desorbidas térmicamente en una atmósfera inerte y los compuestos evaporados fueron concentrados mediante microextracción en fase sólida y separados mediante GC capilar. Los compuestos eluyentes fueron detectados, identificados y cuantificados utilizando un espectrofotómetro UV de matriz de diodos.
- 30
- La publicación "Volatile Organic Compounds from Feces and their Potential for Diagnosis of Gastrointestinal Disease", de Garner *et al.*, describe una técnica en la que los volátiles de las heces fueron recogidos por microextracción en fase sólida, y analizados por cromatografía de gases/espectrometría de masas.
- La Patente US2002/182739 describe métodos y dispositivos para, de manera rápida y simultánea, detectar, cuantificar y obtener imágenes de gases, olores, malos olores, volátiles y semivolátiles mediante cromatografía de gases acoplada con matrices de polímeros conductores orgánicos. Los métodos utilizan cambios en la conductividad del polímero en función de la temperatura para detectar moléculas orgánicas volátiles tras la adsorción a los polímeros. Mediante la elevación de la temperatura del sensor, los materiales adsorbidos son, además, desorbidos. Esto elimina los problemas fundamentales de ensuciamiento del sensor que resultan de la exposición a azufre, nitrógeno o cetonas que contienen malos olores. En una segunda realización, los efluentes de gas resultantes del conjunto de sensores se mezclan con aire, oxígeno o hidrógeno para producir una nube de luminancia que es detectada mediante un dispositivo de carga acoplada.
- 35

5 La Patente EP0926492 describe una disposición capilar de múltiples pasos formada a partir de material de vidrio dúctil, mediante un nuevo método de arrastre en un conjunto que tiene una sección transversal exterior esencialmente redonda y pasos de múltiples capilares con diámetros de 250 micras o menos. El conjunto de múltiples capilares proporciona pasos con un tamaño de múltiples capilares de una forma regularmente recurrente en un solo paquete cohesivo. La sección transversal exterior redonda facilita la utilización de los múltiples capilares mediante la disposición de una superficie adecuada para las conexiones. La disposición de múltiples capilares se realiza mediante un método que proporciona pasos de capilares uniformes o casi uniformes en toda la disposición. El conjunto de múltiples capilares es útil para aplicaciones cromatográficas, y como limitadores del flujo.

10 Según la invención, se da a conocer un aparato de diagnóstico, configurado para analizar un gas obtenido a partir de una muestra biológica y para proporcionar como salida un diagnóstico, comprendiendo el aparato de diagnóstico: un elemento de separación, para separar el gas obtenido a partir de la muestra biológica en partes componentes; un sensor, configurado para detectar compuestos presentes en el gas que pueden ser indicativos de enfermedad, comprendiendo el sensor un elemento de óxido metálico que comprende una mezcla de óxido de zinc y óxido de estaño, estando el sensor acoplado al elemento de separación de tal manera que una parte componente del gas es dirigida hacia el sensor; y un elemento de procesamiento, acoplado a una salida del sensor, estando configurado el elemento de procesamiento para procesar una señal entregada por la disposición del sensor para proporcionar el diagnóstico. El aparato de diagnóstico de la presente invención permite un diagnóstico rápido y preciso mediante la detección de compuestos o grupos de compuestos presentes en la muestra que son indicativos de enfermedad. El aparato puede estar dispuesto como un dispositivo independiente que puede ser instalado en hospitales, consultorios médicos y otras instalaciones médicas, para permitir un diagnóstico rápido y preciso en el punto de atención, lo que permite a un médico, enfermera o a otro profesional sanitario iniciar rápidamente un tratamiento efectivo, y para implementar cualquier medida que pueda ser necesaria para prevenir o limitar la propagación de la enfermedad. La muestra puede ser una muestra de un fluido corporal, tal como orina o saliva, o puede ser una muestra de un sólido o semisólido, tal como heces. Alternativa o adicionalmente, la muestra puede comprender un gas desprendido de un líquido o sólido, tal como orina o heces.

El elemento de separación puede comprender una columna de múltiples capilares.

Alternativa o adicionalmente, el elemento de separación puede comprender una columna de un solo capilar, o puede comprender una pluralidad de columnas de un solo capilar.

20 El aparato puede comprender uno o varios sensores adicionales seleccionados del grupo que comprende un sensor de óxido metálico, un sensor activado mediante UV y un sensor de amoníaco o amina.

En este contexto, el término "sensor de óxido metálico" hace referencia a un sensor que utiliza un elemento de óxido metálico caliente para detectar ciertos compuestos volátiles, mientras que el término "sensor activado mediante UV" hace referencia a un sensor que utiliza un elemento de óxido metálico activado por luz ultravioleta o cercana a ultravioleta para detectar ciertos compuestos volátiles. El término "sensor de amoníaco o amina" hace referencia a un sensor que detecta amoníaco o aminas.

25 Preferentemente, el aparato comprende dos o más sensores dispuestos en una configuración en serie.

Alternativamente, el aparato puede comprender dos o más sensores dispuestos en una configuración en paralelo.

El sensor puede estar configurado para detectar uno o varios compuestos volátiles presentes en el gas. Por ejemplo, el sensor puede estar configurado para detectar uno o varios compuestos orgánicos volátiles en el gas.

30 El sensor puede estar configurado para generar una señal indicativa del tiempo de elución de un compuesto volátil en la muestra.

Alternativamente, la disposición de sensores puede comprender dos o más sensores dispuestos en una configuración en paralelo.

La disposición de sensores puede estar configurada para detectar uno o varios compuestos volátiles presentes en el gas. Por ejemplo, la disposición de sensores puede estar configurada para detectar uno o varios compuestos orgánicos volátiles en el gas.

35 La disposición de sensores puede estar configurada para generar una señal indicativa del tiempo de elución de un compuesto volátil en la muestra.

El elemento de procesamiento puede estar configurado para comparar la señal generada por la disposición de sensores con un perfil conocido de una o varias muestras diagnosticadas previamente.

El aparato puede comprender, además, una etapa de pretratamiento para alterar los parámetros fisicoquímicos de la

muestra.

El aparato puede comprender, además, medios de calentamiento para calentar la muestra, para favorecer la liberación del gas.

5

El aparato puede comprender, además, medios para acidificar o basificar la muestra, para alterar el número o la concentración de compuestos volátiles detectados por la disposición de sensores.

El elemento de procesamiento puede implementar una red neuronal artificial para proporcionar el diagnóstico.

A continuación, se describirán realizaciones de la invención, estrictamente a modo de ejemplo solamente, haciendo referencia a los dibujos adjuntos, de los cuales:

10

la figura 1 es una representación esquemática de un aparato de diagnóstico;

la figura 2 es una representación esquemática de una realización de una etapa de detección del aparato de diagnóstico de la figura 1;

la figura 3 es una representación esquemática de una realización alternativa de una etapa de detección del aparato de diagnóstico de la figura 1;

15

la figura 4 es una representación esquemática de un sensor de amoníaco o amina adicional utilizado en ciertas realizaciones del aparato de diagnóstico mostrado en la figura 1;

la figura 5 es una representación esquemática de una realización alternativa de un sensor de amoníaco o amina adicional utilizado en ciertas realizaciones del aparato de diagnóstico mostrado en la figura 1;

la figura 6 es una representación esquemática de un sensor de óxido metálico caliente utilizado en ciertas realizaciones del aparato de diagnóstico mostrado en la figura 1;

20

la figura 7 es un diagrama de flujo que muestra un proceso para obtener datos para entrenar una red neuronal artificial utilizada en ciertas realizaciones del aparato mostrado en la figura 1;

la figura 8 es un diagrama de flujo que muestra un proceso utilizado para producir tramos de datos para su utilización en la red neuronal artificial utilizada en ciertas realizaciones del aparato mostrado en la figura 1;

la figura 9 es un diagrama de flujo que muestra un proceso de entrenamiento para la red neuronal artificial, utilizado en ciertas realizaciones del aparato de la figura 1;

25

la figura 10 es un diagrama de flujo que muestra un proceso utilizado por la red neuronal artificial, utilizado en ciertas realizaciones del aparato de la figura 1 para realizar un diagnóstico en tiempo real de una enfermedad;

la figura 11 es un diagrama que muestra los resultados de un análisis discriminante realizado sobre los resultados del análisis de muestras de heces utilizando un prototipo de aparato de diagnóstico;

la figura 12 es una captura de pantalla que muestra los resultados de un análisis de una muestra de orina fresca no tratada, producida utilizando un prototipo de aparato de diagnóstico; y

30

la figura 13 es una captura de pantalla que muestra los resultados de un análisis de una muestra de orina acidificada producida utilizando el prototipo de aparato de diagnóstico.

35

Haciendo referencia, en primer lugar, a la figura 1, se muestra un aparato de diagnóstico en forma esquemática en 10. El aparato 10 tiene un horno 12 de cromatografía de gases con un orificio 14 de entrada a través del cual el gas desprendido de una muestra de un fluido corporal suministrado por un paciente puede ser inyectado en una entrada de una o varias columnas de separación alojadas en el horno 12 de cromatografía de gases. En algunas realizaciones, el orificio 14 de entrada comunica directamente con una salida de un recipiente en el que está almacenada la muestra, y en el que la muestra puede ser calentada, a una temperatura de aproximadamente 60 °C, por ejemplo (aunque otras temperaturas también pueden ser adecuadas), para liberar el gas, mientras que, en otras realizaciones, el almacenamiento y la recogida de gas se lleva a cabo en otro lugar, por ejemplo en un vial con un espacio vacío superior, con un tabique integrado desde el que se puede recoger gas en una jeringa y, a continuación, inyectarlo o bombearlo al horno 12 de cromatografía de gases a través del orificio 14 de entrada.

Se ha encontrado que las realizaciones en las que el orificio 14 de entrada comunica directamente con la salida del recipiente de muestras dan lugar a mejoras significativas en el rendimiento en comparación con las realizaciones en las que el gas es inyectado o bombeado al horno 12 de cromatografía de gases a través del orificio de entrada.

5 Esto se debe a que, en estas realizaciones de “bucle cerrado”, se pueden utilizar una serie de válvulas para extraer el gas desprendido de la muestra utilizando aire limpio. El gas recogido de esta manera puede, a continuación, ser dirigido a una etapa de separación 16, que se describe con más detalle a continuación. Además, en las realizaciones de bucle cerrado en las que el orificio 14 de entrada comunica directamente con la salida del recipiente de muestras, hay menos posibilidad de pérdida de la muestra, puesto que la muestra es proporcionada directamente al orificio de entrada, en lugar de ser extraída en una jeringa, que está habitualmente a temperatura ambiente, antes de ser transferida al orificio 14 de entrada del horno 12 de cromatografía de gases. Adicionalmente, en las realizaciones de “bucle cerrado”, en las que el orificio 14 de entrada comunica directamente con la salida del recipiente de muestras, todos los componentes del sistema de muestreo se pueden mantener a altas temperaturas (por ejemplo, aproximadamente entre 90 y 100 °C).

10 En algunas realizaciones del aparato 10, puede existir una etapa de pretratamiento 11, para alterar los parámetros físico-químicos de la muestra con el fin de optimizar las concentraciones relativas de compuestos volátiles en el gas desprendido de la muestra, para fines de diagnóstico. Por ejemplo, en la etapa de pretratamiento 11, los compuestos volátiles del gas desprendido de la muestra pueden ser recogidos en una o varias fibras de microextracción en fase sólida (SPME, solid-phase microextraction) para concentrar los compuestos volátiles, fibra o fibras que son introducidas en el orificio 14 de entrada y calentadas para hacer que los compuestos orgánicos recogidos en la SPME de la fibra o fibras sean desorbidos de la fibra o fibras. El gas desprendido de la muestra puede, asimismo, ser recogido y almacenado utilizando tubos de desorción térmica automatizada que pueden ser introducidos de manera similar en el orificio 14 de entrada. Adicional o alternativamente, la etapa de pretratamiento 11 puede incluir un baño de agua caliente u otros medios de calentamiento para calentar la muestra, con el fin de favorecer o acelerar la liberación de gas. La etapa de pretratamiento 11 puede incluir medios para acidificar o basificar la muestra antes de la recogida de gas, para alterar el número y/o la concentración de compuestos volátiles desprendidos de la muestra. Por ejemplo, la etapa de pretratamiento 11 puede incluir uno o varios inyectores, para inyectar una cantidad predeterminada de un ácido (por ejemplo, ácido sulfúrico) o una base (por ejemplo, hidróxido de sodio) en el recipiente en el que está almacenada la muestra. La etapa de pretratamiento 11 puede ser integral con otras etapas del aparato 10, o puede estar dispuesta como un dispositivo dedicado que está separado de las otras etapas del aparato 10. Además, la etapa de pretratamiento 11 puede tener una serie de sub-etapas discretas, por ejemplo, una sub-etapa de calentamiento, una etapa de concentración y una etapa de acidificación o basificación.

20 El aparato 10 puede incluir una bomba 30 que suministra un flujo de aire para transportar el gas alrededor del aparato 10. En la realización mostrada en la figura 1, la bomba 30 suministra aire desde el exterior del aparato 10. El solicitante ha descubierto que los sensores utilizados en el aparato 10 (sensores que se describen en detalle a continuación) funcionan de manera óptima en aire. Adicionalmente, el aire está fácilmente disponible y no requiere cilindros voluminosos para su almacenamiento. Para evitar que los compuestos volátiles del aire y otros contaminantes del entorno en el que está instalado el aparato 10 interfieran con el funcionamiento del aparato 10, está dispuesto un filtro, tal como un filtro de carbón o un filtro de carbón activado, en la, o en cada salida de la bomba 30 de esta realización, de tal manera que el aire bombeado alrededor del aparato 10 es filtrado antes de salir de la bomba 30. El caudal de aire filtrado puede ser de aproximadamente 200 ml/minuto. Se apreciará, por supuesto, que se pueden emplear otros tipos de filtro con el fin de filtrar el aire. En otras realizaciones, la bomba 30 puede incluir una entrada a cuyo través se puede introducir un gas portador, tal como helio purificado, gas portador que puede transportar el gas desprendido de la muestra alrededor del aparato 10.

30 Una entrada 14 del horno 12 de cromatografía de gases comunica con una etapa de separación 16 que está compuesta por una o varias columnas de separación. En la realización mostrada en la figura 1, la etapa de separación 16 está alojada en el interior del horno 12. Esta disposición proporciona una temperatura estable para la etapa de separación 16, de tal manera que los tiempos de elución para los compuestos volátiles contenidos en el gas desprendido de la muestra permanecen iguales con independencia de cualquier diferencia en la temperatura del entorno en el que está funcionando el aparato 10. La entrada 14 de la etapa de separación puede estar contenida en el interior del horno 12, o puede ser externa al horno 12. La temperatura de la entrada 14 es independiente de la temperatura del horno 12, y puede ser ajustada de manera independiente de la temperatura del horno 12 de cromatografía de gases. El solicitante ha descubierto que una temperatura de entrada de 100 °C y una temperatura del horno comprendida entre 30 °C y 40 °C producen buenos resultados.

En una realización, se utilizan dos columnas capilares de 30 metros en la etapa de separación 16, dividiéndose la salida de cada columna en dos, de tal manera que los componentes separados del gas llegan simultáneamente a cuatro salidas.

35 En una realización alternativa, en la etapa de separación 16 se utiliza una columna de múltiples capilares que tiene una longitud de aproximadamente 0,5 metros. No obstante, se apreciará que se pueden utilizar diferentes longitudes y configuraciones de columnas y, de hecho, se pueden utilizar una pluralidad de columnas de múltiples capilares. Por ejemplo, la etapa de separación puede incluir una columna de un solo capilar o una pluralidad de columnas de un solo capilar de longitudes iguales o diferentes.

La columna de múltiples capilares utilizada en este ejemplo puede tener aproximadamente 1.200 capilares

5 separados. Una ventaja de utilizar una columna de múltiples capilares de este tipo en la etapa de separación es que es capaz de separar rápidamente compuestos volátiles tales como compuestos orgánicos volátiles en el gas. Por ejemplo, los compuestos volátiles de las muestras de heces pueden ser separados aproximadamente en 5 minutos. La columna de múltiples capilares puede ser utilizada, asimismo, a temperatura ambiente, mientras que su pequeño tamaño es ventajoso, puesto que permite que el aparato 10 sea pequeño y portátil, de tal manera que puede ser alojado fácilmente en un punto de atención al paciente, tal como en un consultorio médico, una clínica u otros.

10 La etapa de separación 16 se puede modificar para cambiar sus características de separación, por ejemplo, para cambiar el tiempo de elución de ciertos compuestos volátiles. Una pared interior de los capilares de la etapa de separación 16 (ya sean columnas de un solo capilar, tal como las utilizadas en la primera realización descrita anteriormente, o una columna de múltiples capilares, tal como la utilizada en la realización alternativa descrita anteriormente) está recubierta con una capa delgada de una fase estacionaria, y el grosor y las propiedades químicas de este recubrimiento de fase estacionaria afectan a las capacidades de separación de los capilares, por ejemplo, alterando el tiempo de elución de ciertos compuestos. En ciertas aplicaciones del aparato 10 puede ser beneficioso utilizar una pluralidad de capilares, cada uno con un recubrimiento interno de fase estacionaria diferente, en los capilares de la etapa de separación 16, para mejorar la capacidad de diferenciación del aparato 10, mejorando de este modo la capacidad del aparato 10 para diagnosticar la enfermedad de manera precisa.

15 La salida o salidas de la etapa de separación 16 están acopladas a una o a varias entradas de una etapa de detección 18 que está configurada para detectar uno o varios compuestos volátiles presentes en el gas obtenido a partir de la muestra. La etapa de detección 18 incluye uno o varios sensores para detectar compuestos volátiles concretos o grupos de compuestos volátiles, tal como se explica con más detalle a continuación. En una realización, está dispuesta una matriz de sensores, conteniendo la matriz uno o varios de un sensor de óxido metálico y, adicionalmente un sensor de UV y un sensor de amoníaco o amina.

20 El sensor o sensores de la etapa de detección 18 pueden estar alojados en un recipiente que está posicionado en el interior del horno 12 de cromatografía de gases. El recipiente puede estar fabricado de aluminio o de cualquier otro material adecuado. El recipiente debe estar aislado eléctricamente de los componentes electrónicos del sensor o sensores de la etapa de detección 18, para evitar cualquier riesgo de conexiones eléctricas no deseadas entre componentes electrónicos. Alojar de esta manera el sensor o sensores de la etapa de detección 18 en un recipiente separado garantiza que el sensor o sensores se mantengan en condiciones ambientales constantes, lo que ayuda a mejorar la respuesta y la estabilidad del sensor o sensores. Adicionalmente, el recipiente en el que están alojados el sensor o sensores de la etapa de detección 18 ayuda a aislar los sensores de los volátiles potencialmente interferentes, de otros componentes del aparato 10.

25 El sensor o sensores de la etapa de detección 18 producen salidas eléctricas que cambian cuando se detecta un compuesto volátil. Las salidas del sensor o sensores de la etapa de detección 18 están conectadas a un procesador 20 que funciona para interpretar la salida o salidas del sensor o sensores para determinar si los compuestos volátiles que son indicativos de enfermedad están presentes en el gas obtenido a partir de la muestra, y para proporcionar un diagnóstico de la enfermedad en una pantalla 22 del aparato 10. El funcionamiento del procesador 20 se describe con más detalle a continuación.

30 El funcionamiento del aparato 10 está controlado mediante un sistema de control 24, y el aparato 10 puede tener un dispositivo de almacenamiento 26 tal como una unidad de disco duro, una memoria no volátil o un dispositivo de almacenamiento óptico, tal como un grabador de CD o DVD u otros, para almacenar y recuperar diferentes programas de diagnóstico (tal como se explica con más detalle a continuación) y para almacenar diagnósticos y otros resultados producidos por el aparato 10. Alternativamente, los programas de diagnóstico, diagnósticos y otros resultados pueden estar almacenados en la memoria en el procesador 20, en el sistema de control 24 o en ambos. Los planes de tratamiento propuestos pueden ser almacenados, asimismo, en el dispositivo de almacenamiento 26, en el procesador 20 o en el sistema de control, estando cada plan de tratamiento asociado con un diagnóstico concreto, de tal manera que, en el diagnóstico con éxito mediante el aparato 10, con el diagnóstico se proporciona un plan de tratamiento propuesto.

35 La figura 2 es una representación esquemática de una etapa de detección 18 utilizada en una realización del aparato 10. En esta realización, la etapa de separación 16 tiene una sola salida que comunica con una entrada 40 de la etapa de detección 18 a cuyo través los compuestos volátiles del gas obtenido a partir de la muestra son dirigidos a una matriz de sensores, que se muestra con un contorno de puntos en 42 en la figura 2. La matriz 42 de sensores en este ejemplo incluye cuatro sensores: un sensor 44 de amoníaco o amina (de un tipo descrito con más detalle a continuación), un sensor 46 (de un tipo que será familiar para los expertos en la técnica) que utiliza un elemento de óxido metálico activado mediante luz ultravioleta (o casi ultravioleta) a temperatura ambiente para detectar ciertos compuestos volátiles (denominado, en adelante en el presente documento, sensor de UV) y sensores 48, 50 del tipo que se describe a continuación, que utilizan un elemento de óxido metálico caliente para detectar ciertos compuestos volátiles (denominados, en adelante, en el presente documento, sensores 48, 50 de óxido metálico caliente). No obstante, se apreciará que se podrían utilizar otros sensores de gas en la matriz 42 de sensores del aparato 10, junto con uno o varios de los sensores 44, 46, 48, 50.

5 Los sensores 44, 46, 48, 50 están dispuestos en una configuración en serie, de tal manera que los compuestos volátiles que pasan de la entrada 40 a una salida 52 de la etapa de detección atraviesan cada sensor 44, 46, 48, 50 en secuencia. Tal como se describe con más detalle a continuación, los sensores 48, 50 de óxido metálico caliente incluyen calentadores que calientan los sensores 48, 50 a temperaturas en el rango de 300 °C a 600 °C. Estas temperaturas son suficientes para destruir cualesquiera virus u otros contaminantes microbiológicos que pueden estar presentes en los compuestos volátiles que entran en la etapa de detección 18. De este modo, colocar estos sensores en el extremo de la trayectoria del flujo para los compuestos volátiles en la etapa de detección 18, garantiza que cualesquiera virus presente en los compuestos volátiles se destruyen antes de que se escape cualquier gas de escape a través de la salida 52 de la etapa de detección 18.

10 Cada uno de los sensores 44, 46, 48, 50 tiene una entrada de control 54, a cuyo través se pueden recibir señales de control desde el sistema de control 24 para controlar el funcionamiento de los sensores 44, 46, 48, 50, y una salida de señal 56, para transmitir señales de salida al procesador 20 y al sistema de control 24. Las señales de salida pueden estar condicionadas por una etapa de preprocesamiento, o pueden ser transmitidas directamente al procesador 20 para su procesamiento. Los sensores 48, 50 de óxido metálico tienen, asimismo, entradas de señal de control de la temperatura 58 por medio de las cuales el sistema de control 24 puede controlar la temperatura del sensor 48, 50, mientras que las salidas 60 de medición de la temperatura proporcionan señales indicativas de la temperatura de los sensores 48, 50 al sistema de control 24.

15 Una disposición alternativa de la etapa de detección 18 se muestra en la figura 3, en la que se utilizan los mismos numerales de referencia para identificar elementos comunes a las realizaciones de las figuras 2 y 3. En la disposición mostrada en la figura 3, la etapa de separación 16 tiene cuatro columnas de salida que comunican, cada una, con una entrada 62 respectiva de la etapa de detección 18. Cada una de las entradas 62 está acoplada a uno de los sensores 44, 46, 48, 50 respectivos en una configuración en paralelo. La disposición de la figura 3 adolece de una reducción en la sensibilidad en comparación con la que se muestra en la figura 2, puesto que el flujo de compuestos volátiles está dividido, a la vez que existe un mayor riesgo de que los virus y similares, presentes en los compuestos volátiles, no puedan ser destruidos antes de ser expulsados a través del orificio de escape 52, puesto que no todas las corrientes de compuestos volátiles atraviesan los sensores 48, 50 de óxido metálico caliente.

20 Un sensor 44 de amoníaco o amina se muestra esquemáticamente en la figura 4, y comprende una fuente de luz visible 70 que, en este ejemplo, es un diodo emisor de luz (LED, Light Emitting Diode) naranja que tiene una longitud de onda máxima de 602 nm y un fotodetector 72 que, en este ejemplo, es un fotodiodo amplificado. El LED 70 y el fotodiodo 72 están dispuestos de tal manera que la luz emitida por el LED está dirigida hacia una superficie de detección del fotodiodo 72. Un material 74 sensible al amoníaco o a la amina que consiste en un colorante sensible al pH, tal como azul de bromofenol en una solución mezclada con polivinilpirrolidona, está dispuesto entre el LED 70 y la superficie de detección del fotodiodo 72. La película de colorante 74 sensible al amoníaco o a la amina se puede depositar directamente sobre uno o ambos del LED 70 y la superficie de detección del fotodiodo 72, o puede estar dispuesta en un medio 76 sustancialmente transparente dispuesto en una trayectoria óptica entre el LED 70 y la superficie de detección del fotodiodo 72.

25 En el funcionamiento del sensor 44 de amoníaco o amina, se recibe una señal de control desde el sistema de control 54 para accionar la fuente de luz 70. El fotodetector 72 detecta la luz de la fuente de luz 70 y entrega una tensión en el rango de 0 a 2,5 V, tensión de salida que depende de la intensidad de la luz recibida por el fotodetector 72. En este ejemplo, cuando no hay amoníaco o amina presente, el material 74 sensible al amoníaco o a la amina tiene una transmisividad máxima a 606 nm y, de este modo, permite que sustancialmente toda la luz de la fuente de luz 70 pase al fotodetector 72, de tal manera que el fotodetector produce una alta tensión de salida (por ejemplo, en 2,5 V o cerca de la misma). No obstante, cuando está presente amoníaco o amina, la transmisividad óptica a 606 nm del material 74 sensible al amoníaco o a la amina se reduce, teniendo en este ejemplo una transmisividad máxima a 432 nm. Por lo tanto, la intensidad de la luz recibida por el fotodetector 72 se reduce y la tensión de salida del fotodetector 72 se reduce. La salida del fotodetector 72 se pasa al procesador 20 (con o sin preprocesamiento), que procesa la señal de salida junto con las señales emitidas por los otros sensores 46, 48, 50 para determinar si los compuestos volátiles presentes en el gas obtenido a partir de la muestra suministrada por el paciente son indicativos de enfermedad. Por supuesto, se apreciará que el material sensible al amoníaco o a la amina puede tener propiedades ópticas diferentes de las mencionadas en el ejemplo anterior, de tal manera que el rango de longitudes de onda ópticas que pasa en ausencia de amoníaco o amina y el rango de longitudes de onda ópticas que pasa en presencia de amoníaco o amina puede ser diferente, y se debe utilizar una fuente de luz que tiene una longitud de onda máxima que se encuentra dentro de la banda de paso del material sensible al amoníaco o a la amina en ausencia de amoníaco, pero fuera de la banda de paso del material sensible al amoníaco o a la amina en presencia de amoníaco o amina.

30

35

Una realización alternativa de un sensor 44 de amoníaco o amina se muestra en la figura 5, en la que se utilizan los mismos numerales de referencia para identificar elementos comunes a las realizaciones de las figuras 4 y 5. En esta realización, está dispuesto un segundo LED 78 que emite luz azul que tiene una longitud de onda máxima en el rango de 432 nm, es decir dentro de la banda de paso principal del material sensible al amoníaco o a la amina en presencia de amoníaco o amina, así como el LED 70 que emite luz naranja, que tiene una longitud de onda máxima

en el rango de 602 nm.

Los LED 70, 78 están dispuestos de tal manera que la luz emitida por ambos LED 70, 78 incide en el fotodetector 72. Un material 74 sensible al amoníaco o a la amina que, en este ejemplo, es una película de colorante sensible al amoníaco o a la amina que consiste en un colorante sensible al pH, tal como azul de bromofenol en una solución mezclada con polivinilpirrolidona, está dispuesto entre el LED 70 y la superficie de detección del fotodiodo 72. La película de colorante 74 sensible al amoníaco o a la amina se puede depositar directamente en los LED 70, 78 o en la superficie de detección del fotodiodo 72 o en ambos, o puede estar dispuesta en un medio 76 sustancialmente transparente dispuesto en una trayectoria óptica entre los LED 70, 78 y la superficie de detección del fotodiodo 72.

En el funcionamiento de esta realización del sensor 44 de amoníaco o amina, una señal de control es recibida desde el sistema de control 54 para accionar los LED de manera alternante, para garantizar que no hay ninguna interferencia entre los dos LED 70, 78. El fotodetector 72 detecta la luz de los LED 70, 78 y entrega una tensión en el rango de 0 a 2,5 V, tensión de salida que depende de la intensidad de la luz recibida por el fotodetector 72. En esta realización, cuando no está presente ni amoníaco ni amina, el material 74 sensible al amoníaco o a la amina tiene un pico de transmisividad a 606 nm y, por lo tanto, permite que pase sustancialmente toda la luz del LED 70 naranja al fotodetector 72, al tiempo que reduce la intensidad de la luz recibida del LED azul 78 por el fotodetector 72. De este modo, en ausencia de amoníaco o amina, el fotodetector 72 produce una alta tensión de salida (por ejemplo, en 2,5V o cerca de la misma) cuando se acciona el LED 70 naranja. Cuando está presente amoníaco o amina, la transmisividad óptica del material 74 sensible al amoníaco o a la amina se reduce, teniendo en este ejemplo una transmisividad máxima a 432 nm. De este modo, la intensidad de la luz recibida del LED 70 naranja por el fotodetector 72 se reduce, mientras que la intensidad de la luz recibida por el fotodetector 72 del LED 78 azul aumenta. De este modo, en presencia de amoníaco, el fotodetector 72 produce una alta tensión de salida cuando se acciona el LED 78 azul. El procesador 20 mide la salida del fotodetector 72 en sincronización con el accionamiento alternativo de los LED 70 y 72 naranja y azul para proporcionar una indicación de la transmisividad óptica de la película de colorante 74 sensible al amoníaco o a la amina cuando cada uno de los LED 70, 78 es accionado. Esto permite medir la transmisividad óptica de la película de colorante 74 sensible al amoníaco o a la amina para ambas fuentes de luz 70, 78 utilizando un solo fotodetector 72. Esta realización del sensor 44 de amoníaco o amina es ventajosa por que es capaz de proporcionar una indicación de un fallo con el sensor 44. Si el fotodetector 72 estuviera parcialmente oscurecido o ensombrecido por una razón que no sea la exposición al amoníaco o a la amina, la transmisividad de la película de colorante 74 sensible al amoníaco o a la amina disminuiría tanto en la longitud de onda de 602 nm como en la de 432 nm (es decir, cuando un LED 70, 78 es accionado). De este modo, si se detecta para ambas longitudes de onda una disminución en la transmisividad óptica de la película 74 sensible al amoníaco o a la amina, tal como lo indica la tensión de salida del fotodetector 72 cuando se activa cada uno de los LED 70, 78, es evidente que hay un fallo con el sensor 44.

En lugar de proporcionar un solo fotodetector 72, el sensor 44 alternativo de amoníaco o amina puede estar dotado de un segundo fotodetector en una cámara estanca a la luz, hermética, con el LED 78 azul. No obstante, esta disposición requiere una división adicional del flujo de compuestos volátiles, lo que no es deseable por las razones explicadas anteriormente.

La figura 6 es una ilustración esquemática de un sensor 48, 50 de óxido metálico caliente utilizado en la etapa de detección 18. El sensor 48, 50 de óxido metálico caliente comprende un sustrato 80 de alúmina que tiene en un lado del mismo un calentador de platino 82, que se muestra en líneas discontinuas en la figura 5. Una pluralidad (seis en este ejemplo) de electrodos de oro 84 interdigitados están dispuestos en el otro lado del sustrato 80, y una película de sensor está aplicada a los electrodos de oro 84 interdigitados. La película del sensor, en este ejemplo, está realizada de una pasta compuesta por el mismo peso de polvos de óxido de zinc y óxido de estaño mezclados en agua. Alternativamente, la película del sensor puede estar realizada de una pasta que comprende un aglutinante no acuoso con el mismo peso de óxido de zinc y óxido de estaño.

Se aplica una corriente al calentador de platino 82 para conseguir una temperatura de funcionamiento deseada de los sensores 48, 50. En el ejemplo que se muestra en las figuras 2 y 3, uno de los sensores 48, 50 de óxido metálico funciona a una temperatura de 400 °C, mientras que el otro sensor 50, 48 de óxido metálico funciona a una temperatura de 450 °C. La temperatura de funcionamiento de los sensores 48, 50 de óxido metálico determina su selectividad y sensibilidad a compuestos volátiles y, se ha encontrado que estas temperaturas de funcionamiento proporcionan un nivel adecuado de selectividad y sensibilidad. El sistema de control 24 controla la temperatura de funcionamiento de los sensores 48, 50 de óxido metálico midiendo la resistencia del calentador de platino 82 y comparando la resistencia medida del calentador de platino 82 con la resistencia requerida a la temperatura deseada (consultando una tabla de consulta, por ejemplo) y ajustando la corriente aplicada al calentador de platino 82 para conseguir la resistencia requerida y, por lo tanto, la temperatura deseada.

En la utilización del sensor 48, 50 de óxido metálico caliente, se aplica una tensión a la película del sensor y se mide la corriente que circula a través de la película del sensor. La corriente que circula a través de la película del sensor varía dependiendo de la presencia de compuestos volátiles. De este modo, una corriente medida concreta puede ser interpretada como indicativa de la presencia de un compuesto volátil concreto.

La corriente medida en los sensores 48, 50 de óxido metálico se convierte en una tensión comprendida entre 0 y 2,5V, y esta tensión se pasa al procesador 20 (con o sin preprocesamiento), que procesa esta señal de salida junto con señales emitidas por los otros sensores 46, 48 para determinar si los compuestos volátiles presentes en el gas obtenido a partir de la muestra suministrada por el paciente son indicativos de enfermedad.

5

Los sensores 48, 50 de óxido metálico funcionan a temperaturas tan bajas como 150 °C, y el sistema de control 24 es capaz de controlar sus temperaturas de funcionamiento según la aplicación para la que se va a utilizar el aparato 10. Por ejemplo, los sensores 48, 50 de óxido metálico pueden ser más sensibles a compuestos volátiles que son indicativos de una enfermedad concreta a una temperatura de funcionamiento, y más sensibles a otros compuestos volátiles que son indicativos de una enfermedad diferente a una temperatura de funcionamiento diferente. Cambiando la temperatura de funcionamiento de los sensores 48, 50 de óxido metálico según la aplicación concreta para la que se va a utilizar el aparato 10, la precisión y la efectividad de diagnóstico pueden ser optimizadas. No obstante, el solicitante ha descubierto que, a temperaturas de 300 °C e inferiores, la respuesta de los sensores 48, 50 de óxido metálico puede estar enmascarada, debido a la presencia de agua que es eluida de la etapa de separación 16, lo que puede causar señales de salida más pequeñas que pueden ser indicativas de la presencia de compuestos volátiles concretos a oscurecer. Se ha encontrado que las temperaturas en el rango de 400 °C a 500 °C son especialmente adecuadas.

10

Se apreciará que los sensores 44, 46, 48, 50 tienen una vida útil limitada. Se prevé que los sensores 44, 46, 48, 50 utilizados en las realizaciones descritas en el presente documento tendrán una vida útil superior a un año, pero esto dependerá, en cierta medida, del número de operaciones de diagnóstico realizadas por el aparato 10. Para facilitar el mantenimiento del aparato 10, los sensores 44, 46, 48, 50 pueden ser implementados como módulos separados que pueden ser reemplazados de manera individual cuando sea necesario. Para este fin, los módulos de sensor pueden estar provistos de conectores de liberación rápida, por medio de los cuales pueden ser conectados y desconectados de la etapa de detección 18.

15

El procesador 20 puede incluir un convertidor de analógico a digital (ADC, Analog to Digital Converter), para convertir las tensiones suministrados por las salidas de los sensores 44, 46, 48, 50 en señales digitales que pueden ser utilizadas por el procesador. Alternativamente, las señales de salida del sensor pueden ser preprocesadas para convertir las tensiones de salida en un formato digital.

20

El procesador 20 está programado para producir, a partir de las salidas de los sensores 44, 46, 48, 50, una gráfica de tensión, corriente o resistencia frente al tiempo para cada uno de los sensores 44, 46, 48, 50. Estas gráficas incluyen picos en ciertos momentos (a medida que los compuestos volátiles diferentes son eluidos de la etapa de separación 16 en diferentes momentos), que indican cuándo fueron detectados compuestos volátiles concretos por los sensores 44, 46, 48, 50. En una realización, el procesador 20 compara estas gráficas con gráficas o perfiles conocidos de una o varias muestras diagnosticadas previamente que contienen compuestos volátiles concretos o combinaciones de compuestos volátiles que son indicativos de enfermedades concretas. Si el procesador 20 identifica una correlación entre las gráficas producidas a partir de una muestra actual y las asociadas con una enfermedad particular, un diagnóstico de esas enfermedades se puede realizar y mostrar en la pantalla 22. Tal como se explicó anteriormente, un plan de tratamiento propuesto puede estar asociado con cada enfermedad, de tal manera que, cuando el procesador 20 identifique una correlación u otra relación entre las gráficas producidas por la muestra actual y las asociadas con la enfermedad, y diagnostica la enfermedad, se puede mostrar un plan de tratamiento propuesto con el diagnóstico, para permitir que un profesional sanitario inicie sin demora el tratamiento del paciente.

25

En otra realización, se utiliza una red neuronal artificial (ANN, artificial neural network) para analizar las gráficas producidas a partir de la salida de los sensores 44, 46, 48, 50 para diagnosticar enfermedades particulares en base a los compuestos volátiles detectados por los sensores 44, 46, 48, 50 de la etapa de detección 18.

30

La figura 7 es un diagrama de flujo que muestra un proceso para obtener datos para entrenar la ANN utilizada para analizar las gráficas para diagnosticar enfermedades en base a los compuestos volátiles detectados por los sensores 44, 46, 48, 50 de la etapa de detección 18.

En la etapa 90 se establecen los parámetros iniciales para una ejecución de obtención de datos. Estos parámetros incluyen el nombre de la muestra, la duración de la ejecución de obtención de datos y la velocidad de obtención de datos. La velocidad de obtención de datos puede estar establecida en cualquier valor apropiado, pero se ha encontrado que una velocidad comprendida entre dos y cinco lecturas o muestras de datos por segundo da buenos resultados, puesto que se pueden observar picos no resueltos o superpuestos que representan los diferentes compuestos volátiles que emergen de la etapa de separación 16, tal como se explicará con más detalle a continuación.

35

En la etapa 92, se inyecta una muestra del paciente en el horno 12 de cromatografía de gases y se coloca un marcador en las gráficas producidas por el procesador 20 a partir de las salidas de los sensores 44, 46, 48, 50 para que el momento en el que se inyectó la muestra pueda ser identificado.

- 5 En la etapa 94, se obtiene un cromatograma de la etapa de detección 18 como una serie de puntos de datos, cada uno de los cuales representa una salida de un sensor 44, 46, 48, 50. Con una velocidad de obtención de datos de 2 lecturas o muestras de datos por segundo se producen 2 puntos de datos del cromatograma en cada intervalo de un segundo. Estos puntos de datos se guardan en la etapa 96, y se realiza una prueba en la etapa 98 para determinar si se va a inyectar otra muestra en el aparato 10. Si se va a inyectar otra muestra más, el procesamiento vuelve a la etapa 90, mientras que, si no se va a inyectar ninguna otra muestra, el proceso se detiene en la etapa 99.
- 10 En una ejecución habitual de obtención de datos de 30 minutos, se recogerán 3.600 puntos de datos (120 muestras/minuto x 30 minutos). Para simplificar la introducción de los datos guardados en la ANN, el número de puntos de datos se reduce dividiendo el eje de tiempo del cromatograma en intervalos de tiempo T regulares, que pueden ser, por ejemplo, de 15 segundos de duración. Los datos procesados del cromatograma se suman en cada uno de estos intervalos. Un intervalo de tiempo que contiene los valores sumados se conoce como "tramo". La figura 8 es un diagrama de flujo que muestra un proceso utilizado para producir los tramos.
- 15 En la etapa 100 se definen e inicializan los parámetros del tramo, tales como el número de tramos N, el ancho de cada tramo (por ejemplo, un tramo de 15 segundos o un tramo de 20 segundos con una superposición de 5 segundos), la altura del tramo (que es un umbral por debajo del cual los datos pueden ser descartados como ruido) y un umbral de área del tramo.
- En la etapa 102 se obtiene el cromatograma, y se aplica un algoritmo de reducción de ruido en la etapa 104. Se toma el primer diferencial del cromatograma con respecto al tiempo,  $dR/dt$  (donde R es la resistencia del sensor en el tiempo t) en la etapa 106, restando el valor de cada punto de datos del punto de datos anterior, y dividiendo el resultado por el intervalo de tiempo entre el punto de datos y el punto de datos anterior, y se inicia un contador i de bucle en la etapa 108. Un bucle de procesamiento es introducido a continuación en la etapa 110, en el que se calcula un valor de tramo para cada tramo sumando los puntos de datos del cromatograma diferenciados por encima del umbral de altura preestablecido, dentro del tiempo de los tramos respectivos. Si el tramo calculado tiene un área menor que el umbral preestablecido, su valor se establece en 0. Este proceso se repite para todos los N tramos de datos.
- 20 Una vez se han calculado todos los tramos, estos son normalizados en la etapa 120, y los datos de los tramos normalizados son guardados en la etapa 122.
- 25 La figura 9 es un diagrama de flujo que muestra un proceso de entrenamiento para la ANN. En la etapa 130 se inicializan los parámetros de entrenamiento para la ANN. Por ejemplo, se puede seleccionar un sensor, se introducen los valores de umbral del tramo y el ancho de los tramos de datos (explicados anteriormente). Se selecciona un formato de salida (por ejemplo, el diagnóstico de una enfermedad concreta o la identificación de todo tipo de enfermedades). Se identifica la ubicación de los datos de entrenamiento y se seleccionan los parámetros de la red neuronal.
- El proceso de entrenamiento se inicia en la etapa 132 y un primer archivo de datos que contiene datos de entrenamiento se carga en la etapa 134. Los tramos de datos son cargados en la etapa 138 y los datos de los tramos son propagados a través del motor de la red en la etapa 140. En la etapa 142, la salida de la ANN es comparada con la salida requerida y se generan valores de error. Los factores de corrección de errores son calculados en la etapa 144 y propagados a través de la ANN en la etapa 146, mediante ajuste de ponderaciones. En la etapa 148 se realiza una prueba para determinar si el archivo de datos que se está procesando en ese momento es el último archivo de datos. Si no, se lee el siguiente archivo de datos (en la etapa 136) y el procesamiento vuelve a la etapa 138. Si el archivo de datos actual es el último archivo de datos, se calcula un error total para el conjunto de entrenamiento en la etapa 150. En la etapa 152 se realiza una prueba para determinar si el error total es inferior a un umbral. Si no, el procesamiento vuelve a la etapa 134 y se vuelven a introducir los datos de entrenamiento. Si el error total es inferior al umbral, la red es guardada en la etapa 154 y, posteriormente, puede ser utilizada por el
- 30 aparato 10 para el diagnóstico en tiempo real de la enfermedad a partir de una muestra de un fluido corporal proporcionada por un paciente.
- 35 La figura 10 es un diagrama de flujo que muestra el proceso utilizado por la ANN del aparato 10 para realizar un diagnóstico en tiempo real de una enfermedad. El proceso se inicia en la etapa 160, y en la etapa 162 se selecciona y se carga una ANN apropiada. Los parámetros de ejecución que incluyen el nombre de la muestra y el tiempo de ejecución se establecen en la etapa 164. Se inyecta una muestra en el horno 12 de cromatografía de gases en la etapa 166, y los sensores 44, 46, 48, 50 de la etapa de detección 18 obtienen un cromatograma en la etapa 168. Los datos se guardan en la etapa 170 y se cargan en tramos de datos en la etapa 172. Los datos de los tramos se propagan a través de toda la ANN en la etapa 174 y la ANN toma una decisión, para producir un diagnóstico, que se muestra en la pantalla 22 del aparato 10 y es guardada en la etapa 176. Se realiza una prueba en la etapa 178 para determinar si se va a analizar otra muestra. Si no, el proceso finaliza en la etapa 182. Si se va a analizar otra muestra, se realiza una prueba en la etapa 180 para determinar si se utilizará la misma ANN. Si es así, el procesamiento se reinicia en la etapa 164. Si no, se selecciona una nueva ANN y se carga en la etapa 162 antes de que el procesamiento se inicie de nuevo en la etapa 164.

- 5 Se apreciará que se pueden utilizar otras metodologías de reconocimiento de patrones en el aparato 10 en lugar de una ANN o junto con la misma, para diagnosticar la enfermedad en base a compuestos volátiles detectados mediante la etapa de detección 18. Por ejemplo, el procesador podría implementar una transformación canónica de Fourier, una transformación de ondícula, un Bayesiano, un análisis de componentes principales (PCA, principal component analysis) o un algoritmo de reconocimiento de patrones de k vecinos más próximos (KNN, K Nearest Neighbour), o un algoritmo estadístico fijo, un umbral o un algoritmo Booleano.
- El aparato 10 se puede utilizar para diagnosticar enfermedades gastrointestinales tales como *C. difficile*, norovirus, campilobacteriosis, salmonela y otras tomando una muestra de heces de un paciente, analizándola para identificar compuestos volátiles contenidos en el gas obtenido a partir de la muestra y utilizando el método de comparación o el método de ANN descrito anteriormente.
- 10 El aparato 10 puede ser utilizado, asimismo, para diagnosticar otras afecciones mediante el análisis de otro fluido corporal. Por ejemplo, se pueden analizar muestras de orina para diagnosticar una enfermedad renal y otras afecciones, mientras que se pueden analizar muestras de aliento para diagnosticar una enfermedad pulmonar.
- 15 Aunque el aparato 10 de la presente invención se describe teniendo cuatro sensores 44, 46, 48, 50, se apreciará que se pueden utilizar más, menos o diferentes combinaciones de sensores. Por ejemplo, en un dispositivo diseñado únicamente para diagnosticar la *C. difficile* mediante el análisis del gas obtenido a partir de muestras de heces proporcionadas por los pacientes, solo se puede proporcionar una combinación de un sensor 46 de amoníaco o amina y un solo sensor 48, 50 de óxido metálico caliente. Cuando se utiliza una combinación de dos o más sensores, incluido un sensor 48, 50 de óxido metálico caliente, se prefiere que los sensores estén dispuestos en una configuración en serie, estando dispuestos el sensor o sensores 48, 50 de óxido metálico caliente como el sensor o sensores finales en la serie, para aumentar la probabilidad de que cualquier virus u otros contaminantes microbiológicos presentes en los compuestos volátiles producidos por la etapa de separación sean destruidos antes de ser expulsados de la etapa de detección 18 a través del orificio de escape.
- 20 El aparato 10 puede estar dispuesto como un dispositivo integrado para múltiples propósitos que es capaz de analizar diferentes tipos de muestra para diagnosticar una variedad de afecciones diferentes. Por ejemplo, en un modo, el aparato 10 puede estar configurado para diagnosticar una afección gastrointestinal tal como *C. difficile* mediante el análisis de una muestra de heces. En un segundo modo, el aparato 10 puede estar configurado para analizar una muestra de heces para diagnosticar una gama de afecciones gastrointestinales tales como *C. difficile*, colitis ulcerosa, cáncer colorrectal u otras. En un tercer modo de funcionamiento, el aparato 10 puede estar configurado para analizar una muestra de orina para diagnosticar el cáncer de próstata.
- 25 Se apreciará que es probable que diferentes afecciones produzcan diferentes gráficas o perfiles de compuestos en muestras y, por lo tanto, para producir un diagnóstico rápidamente, el aparato 10 puede almacenar una pluralidad de gráficas o perfiles conocidos de muestras previamente diagnosticadas que contienen compuestos volátiles o combinaciones de compuestos volátiles concretos que son indicativos de enfermedades concretas, en el almacén 26. Se puede recuperar una gráfica o perfil apropiado cuando sea necesario para un tipo concreto de análisis o diagnóstico. En el ejemplo descrito anteriormente, una primera gráfica o perfil de una muestra tomada de un paciente previamente diagnosticado con *C. difficile* puede estar almacenada en el dispositivo de almacenamiento 26, junto con una segunda gráfica o perfil que puede ser una gráfica compuesta o una amalgama de gráficas o perfiles de muestras tomadas de pacientes previamente diagnosticados con una variedad de afecciones tales como *C. difficile*, colitis ulcerosa, cáncer colorrectal y otras. Una tercera gráfica o perfil de una muestra tomada de un paciente previamente diagnosticado con cáncer de próstata también puede estar almacenada en el dispositivo de almacenamiento 26. Por lo tanto, se puede seleccionar una gráfica o perfil apropiado según el análisis o diagnóstico que se realiza, comparándose la gráfica producida por la muestra del paciente con la gráfica almacenada, para producir un diagnóstico.
- 30 Adicional o alternativamente, diferentes ANN pueden estar almacenadas en el dispositivo de almacenamiento 26 o en la memoria del procesador 20 o en el sistema de control 24, estando cada ANN entrenada para diagnosticar una afección concreta o una variedad concreta de afecciones. De este modo, se puede seleccionar una ANN apropiada según el análisis o diagnóstico que se esté llevando a cabo.
- 35 Esta capacidad para almacenar y recuperar diferentes gráficas y/o ANN confiere al aparato 10 una gran flexibilidad, puesto que permite que se utilice un solo dispositivo para diagnosticar una variedad de afecciones. Adicionalmente, el aparato 10 puede ser actualizado con gráficas y ANN revisadas a medida que se obtienen datos mejorados y a medida que se descubren nuevos compuestos o combinaciones de compuestos que son indicativos de afecciones concretas. De este modo, el aparato 10 es ampliable para cumplir con necesidades de diagnóstico futuras.
- La descripción anterior presenta realizaciones a modo de ejemplo del aparato de la presente invención. Por completitud, a continuación, se describirán dos prototipos del sistema utilizados por el solicitante en el desarrollo del aparato de la presente invención. Se apreciará que estos prototipos del sistema también constituyen realizaciones del aparato de la presente invención.

- 5 El primer prototipo del aparato comprende un horno de cromatografía de gases con un orificio de inyección en el que pueden ser inyectadas muestras de gas recogidas de muestras de pacientes, tales como muestras de heces. El gas es recogido de las muestras en un proceso separado en el que las muestras son calentadas en viales con un espacio vacío superior, que tienen un tabique integrado a través del cual se puede usar el gas del espacio vacío superior utilizando una jeringa estanca frente a gases. El gas del espacio vacío superior puede ser inyectado directamente en el horno de cromatografía de gases.
- 10 Una etapa de separación de este primer prototipo de aparato utiliza dos columnas capilares de 30 metros disponibles comercialmente con un diámetro interno de 0,32 mm y un grosor de película de fase estacionaria de 4  $\mu\text{m}$  que están conectadas al orificio de inyección utilizando conectores de vidrio de ajuste a presión, y dos piezas de columna de protección de sílice, para proporcionar cuatro salidas separadas de la etapa de separación. Tres de las salidas están interconectadas a una matriz de sensores (que se describe en detalle a continuación), mientras que la cuarta está interconectada a un detector de ionización de llama (FID, flame ionisation detector) convencional que es parte integral del horno de cromatografía de gases. Una bomba está dispuesta para bombear aire del cilindro seco mezclado alrededor de este sistema para transportar el gas recogido de las muestras.
- 15 Se utilizan dos tipos de sensores en la matriz de sensores de este sistema. El primero es un sensor de óxido metálico del tipo descrito en detalle anteriormente, y el segundo es un sensor adicional de amoníaco o amina del tipo descrito en detalle anteriormente. Se utilizan dos sensores de óxido metálico en la matriz de sensores, con un solo sensor de amoníaco o amina. El sensor de amoníaco o amina está envuelto en una carcasa exterior estanca a la luz antes de ser integrado en la matriz de sensores, para garantizar que la luz de fuentes distintas al LED sea excluida y, por lo tanto, no pueda influir en la salida del sensor de amoníaco o amina.
- 20 Los sensores están controlados y sus señales condicionadas por un circuito de control a medida. Está dispuesto un bucle de retroalimentación de hardware, que mantiene la temperatura de cada uno de los sensores de óxido metálico en un valor predefinido, con independencia de las pérdidas de calor. La temperatura del calentador de cada sensor de óxido metálico está monitorizada de manera continua, midiendo las tensiones que permiten calcular la resistencia del calentador de platino, a partir de la cual se puede obtener la temperatura. Las señales emitidas por los sensores (cambio de resistencia para los sensores de óxido metálico caliente y cambio de tensión para el sensor de amoníaco o de amina) y las tensiones del calentador del sensor son acondicionadas mediante circuitos de acondicionamiento y alimentadas por medio de un convertidor de analógico a digital a través de una conexión USB a un ordenador personal con software de diagnóstico personalizado.
- El software proporciona una pantalla de desplazamiento de resistencia o tensión frente al tiempo, y una actualización constante de las temperaturas del sensor. Cuando se inyecta una muestra, se agrega un marcador con información de la muestra a la gráfica. Este marcador se utiliza como punto de referencia de "tiempo cero" para el cálculo posterior de los valores de tiempo de retención (ver a continuación). La información se guarda en un archivo único.
- 25 Los datos recogidos de cada sensor de una muestra son transformados, de tal manera que se muestra el cambio en la resistencia con el tiempo ( $dR/dt$ ), para facilitar la desconvolución de los picos que son eluidos con tiempos de retención similares. Se aplica también suavizado a las gráficas para reducir los efectos del ruido eléctrico y se aplica un umbral de altura para excluir pequeñas fluctuaciones de la referencia, causadas por el ruido. Los archivos de datos se guardan en formato Microsoft Excel. Los archivos contienen una serie de valores de tiempo de retención (el tiempo necesario para que compuestos específicos sean eluidos de las columnas) y el área de pico respectiva para cada sensor. Estos archivos de datos son recogidos y analizados para cinco tipos de heces: campilobacteriosis, *C. difficile*, normal (individuos asintomáticos), salmonela y sin diagnosticar. El software incluye una red neuronal artificial (ANN) para llevar a cabo este diagnóstico.
- 30 La entrada a la ANN se consigue dividiendo el lapso de tiempo de 30 minutos (1.800 segundos) de cada ejecución de obtención de datos en 120 segmentos consecutivos de quince segundos ('tramos'), e integrando los picos de la pantalla diferenciada en cada tramo, creando, de este modo, una matriz de 120 tramos de entrada. A continuación, los tramos son normalizados proporcionalmente, de tal manera que el tramo más grande sea igual a 1. Por consiguiente, los tramos contienen una representación normalizada del cromatograma. El software incluye una opción para hacer que los tramos sean más anchos para que los tramos se superpongan en 5 o 15 segundos, en caso de que los picos abarquen tramos adyacentes.
- 35 La salida da la ANN puede ser seleccionada para que tenga solo dos canales (por ejemplo, *C. difficile*/No *C. difficile*), o seis canales, uno para cada tipo de enfermedad más uno para los datos de calibración producidos utilizando una muestra de etanol.
- En la utilización experimental del primer prototipo del sistema, se utilizó una proporción de los archivos de datos para entrenar la ANN (conjunto de entrenamiento), y la validación de la ANN se realizó utilizando los datos restantes (conjunto de validación), tal como se muestra en la siguiente tabla 1.

Tabla 1: Números de cada tipo de enfermedad en los conjuntos de entrenamiento y validación.

Tipo	Conjunto de entrenamiento	Conjunto de validación
Normal	22	11
C. difficile	22	10
Campilobacteriosis	23	9
Etanol	7	4
Salmonela	15	5
No diagnosticado	7	5
<b>Total</b>	<b>96</b>	<b>44</b>

Además de los 120 tramos de entrada (capa de entrada de 120 unidades) y las 2 o 6 salidas (capa de salida de 2 o 6 unidades), la ANN tiene una o varias capas ocultas. El número de unidades en cada capa oculta puede afectar a la precisión de la red neuronal artificial. Como no es posible predecir el número óptimo de unidades en una capa oculta, es necesario probar tantas combinaciones como sea posible. Con este fin, el software permite al usuario crear y validar automáticamente las ANN en las que el número de unidades en la capa oculta antes de la capa de salida (que es la única capa oculta en las redes de una sola capa oculta) se reduce de 120 al número de salidas. Esto se llevó a cabo para las ANN de una sola capa oculta utilizando todas las combinaciones de los siguientes parámetros: umbral de altura de 0 o 50; umbral de área de 0 o 200; 2 salidas o 6 salidas; superposiciones de tramos de 0, 5 o 15 segundos; utilizando áreas de tramo normalizadas o áreas de tramo transformadas binarias (1 si área tramo > 0, 0 en caso contrario).

Se descubrió que las mejores ANN tenían los siguientes parámetros: umbral de altura = 50; umbral de área = 200; superposición de tramos = 15 segundos; áreas de tramo normalizadas.

Utilizando estos parámetros, los resultados para la red de 6 salidas se muestran en la tabla 2, y los resultados para la red de 2 salidas se muestran en la tabla 3.

Tabla 2: Resultados de la red de 6 salidas

Tipo	Coincidentes	Total	% correctas
Normal	8	11	72,7
C. difficile	8	10	80,0
Campilobacteriosis	4	9	44,4
Etanol	4	4	100,0
Salmonela	2	5	40,0
No diagnosticado	4	5	80,0
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>44</b>	<b>68,2</b>

Tabla 3: Resultados de la red de 2 salidas

Tipo	Coincidentes	Total	% correctas
No C. difficile	29	34	85,3
C. difficile	8	10	80,0
<b>Total</b>	<b>37</b>	<b>44</b>	<b>84,1</b>

Puesto que las muestras de salmonela y campilobacteriosis rara vez se encuentran en un entorno hospitalario, la diferenciación de pacientes con C. difficile frente a pacientes con diarrea de etiología desconocida o pacientes que pueden ser asintomáticos, es más importante en relación con la utilización propuesta del prototipo. Por lo tanto, la ANN fue entrenada utilizando el mismo conjunto de datos que anteriormente (tabla 1), pero con las muestras de etanol, campilobacteriosis y salmonela retiradas de los conjuntos de entrenamiento y validación. Estos resultados se muestran en las tablas 4 y 5.

Tabla 4: Resultados de la red de 2 salidas excluyendo las muestras de etanol, salmonela y campilobacteriosis de los conjuntos de entrenamiento y validación.

Tipo	Coincidentes	N.º en el conjunto de validación	% correctas
No C. difficile	18	18	100,0
C. difficile	8	10	80,0
<b>Total</b>	<b>26</b>	<b>28</b>	<b>92,9</b>

Tabla 5: Resultados de la red de 6 salidas excluyendo las muestras de etanol, salmonela y campilobacteriosis de los conjuntos de entrenamiento y validación.

Tipo	Coincidentes	N.º en el conjunto de validación	% correctas
Normal	9	10	90,0
C. difficile	9	10	90,0
No diagnosticado	5	5	100,0
<b>Total</b>	<b>23</b>	<b>25</b>	<b>92,0</b>

A modo de comparación, las redes neuronales fueron generadas utilizando datos obtenidos de un detector FID convencional, recogidas al mismo tiempo que los resultados de la unidad de detector de GC. Los resultados se muestran en las tablas 6 y 7 para las redes de 6 salidas y 2 salidas respectivamente.

Tabla 6: Resultados de la red de 6 salidas utilizando datos de un detector FID

Tipo	Coincidentes	Total	% correctas
Normal	7	10	70,0
C. difficile	4	10	40,0
Campilobacteriosis	1	9	11,1
Etanol	3	4	75,0
Salmonela	1	6	16,7
No diagnosticado	4	5	80,0
<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>44</b>	<b>45,5</b>

Tabla 7: Resultados de la red de 2 salidas utilizando datos de un detector FID

Tipo	Coincidentes	Total	% correctas
No C. difficile	25	34	73,5
C. difficile	4	10	40,0
<b>Total</b>	<b>29</b>	<b>44</b>	<b>65,9</b>

Tal como se puede ver en las tablas anteriores, las redes generadas utilizando datos del prototipo del sistema proporcionan decisiones más precisas que las redes generadas utilizando los datos del FID.

El segundo prototipo del sistema es similar al primero, pero utiliza una columna de múltiples capilares disponible comercialmente de 50 cm de longitud y que tiene 1.200 capilares de 4 µm de diámetro interno y un grosor de película de fase estacionaria de 0,2 µm en la etapa de separación. Una bomba está dispuesta para bombear aire del laboratorio a la columna de múltiples capilares para transportar el gas recogido de las muestras, y el aire del laboratorio es filtrado mediante filtros de carbón para eliminar cualesquiera contaminantes del aire del laboratorio antes de la entrada en la columna de múltiples capilares. Una salida de la columna de múltiples capilares está interconectada directamente a un sensor de óxido metálico caliente del tipo descrito anteriormente, que funciona a una temperatura de 450 °C.

El sensor de óxido metálico caliente está controlado y sus señales están condicionadas por un circuito de control a medida. Está dispuesto un bucle de retroalimentación de hardware que mantiene la temperatura de cada uno de los sensores de óxido metálico en un valor predefinido, con independencia de las pérdidas de calor. La temperatura del calentador de cada sensor de óxido metálico es monitorizada de manera continua midiendo las tensiones, lo que permite calcular la resistencia del calentador de platino, a partir de la cual se puede obtener la temperatura. La señal de cambio de resistencia entregada por el sensor y la tensión del calentador del sensor son acondicionadas mediante circuitos de acondicionamiento y alimentadas a través de un convertidor de analógico a digital a través de una conexión USB a un ordenador personal con software de diagnóstico personalizado.

El software proporciona una pantalla de desplazamiento de resistencia o tensión frente al tiempo, y una actualización constante de las temperaturas del sensor. Cuando se inyecta una muestra, se agrega un marcador con información de la muestra a la gráfica. Este marcador se utiliza como punto de referencia de "tiempo cero" para el cálculo posterior de los valores de tiempo de retención (ver a continuación). La información se guarda en un archivo único.

Los datos recogidos de cada sensor de una muestra son transformados, de tal manera que se muestra el cambio en la resistencia con el tiempo (dR/dt), para facilitar la desconvolución de los picos que son eluidos con tiempos de retención similares. También se aplica suavizado a las gráficas para reducir los efectos del ruido eléctrico y se aplica un umbral de altura para excluir pequeñas fluctuaciones de la referencia, causadas por el ruido. Los archivos de datos se guardan en formato Microsoft Excel. Los archivos contienen una serie de valores de tiempo de retención (el tiempo necesario para que compuestos específicos sean eluidos de las columnas) y el área de pico respectiva para cada sensor. Estos archivos de datos son recogidos y analizados para cuatro tipos de heces: campilobacteriosis, C. difficile, normal (individuos asintomáticos), y sin diagnosticar. El software incluye una red neuronal artificial (ANN)

para llevar a cabo este diagnóstico.

5 La entrada a la ANN se consigue dividiendo el lapso de tiempo de 10 minutos (600 segundos) de cada ejecución de obtención de datos en 40 segmentos consecutivos de quince segundos ('tramos'), e integrando los picos de la pantalla diferenciada en cada tramo, creando, de este modo, una matriz de 40 tramos de entrada. A continuación, los tramos son normalizados proporcionalmente, de tal manera que el tramo más grande sea igual a 1. Por consiguiente, los tramos contienen una representación normalizada del cromatograma. El software incluye una opción para hacer que los tramos sean más anchos para que los tramos se puedan superponer en 5 o 15 segundos, en caso de que los picos abarquen tramos adyacentes.

La salida da la ANN puede ser seleccionada para que tenga solo dos canales (C. difficile/No C. difficile), o cinco canales, uno para cada tipo de enfermedad más uno para los datos de calibración producidos utilizando una muestra de etanol.

10 En la utilización experimental del segundo prototipo, se utilizó una proporción de los archivos de datos para entrenar la ANN (conjunto de entrenamiento); la validación de la ANN se realizó utilizando los datos restantes (conjunto de validación), tal como se muestra en la siguiente tabla 8.

Tabla 8: Muestras utilizadas en el entrenamiento y validación del segundo prototipo con columna de múltiples capilares

Muestra	Total	Conjunto de entrenamiento	Conjunto de validación
Normal	14	7	7
C. difficile	26	13	13
Campilobacteriosis	11	5	6
Etanol	6	3	3
Salmonela	0	0	0
No diagnosticado	7	3	4
<b>Total</b>	<b>64</b>	<b>31</b>	<b>33</b>

20 La siguiente tabla 9 muestra los resultados obtenidos con una ANN de 2 salidas (C. difficile/No C. difficile) con 1 o 2 capas ocultas. La clasificación global correcta de las muestras fue del 82 % si se utilizaban 2 capas ocultas en la ANN. Esto se compara con una clasificación global de solo el 73 % si se utilizaba 1 capa oculta. Estos resultados demuestran que el segundo prototipo que utiliza una columna de microcapilares corta puede proporcionar resultados de diagnóstico de enfermedad en 10 minutos.

Tabla 9: La clasificación del conjunto de validación utilizando una ANN de 2 salidas con 1 o 2 capas ocultas.

Detalles de la ANN	N.º de unidades en capa oculta	Tipo	Coincidentes	Total	% correctas
<b>Una capa oculta</b>	70	No C. difficile	14	20	70.0
Tramos de 40x15 s, no superposición, Umbral 50, Umbral de Área 0		C. difficile	10	13	76,9
		Total	24	33	72,7
<b>Dos capas ocultas</b>	70, 107	No C. difficile	17	20	85.0
Tramos de 40x15 s, no superposición, Umbral 50, Umbral de Área 0		C. difficile	10	13	76,9
		Total	27	33	81,8

Se describirán a continuación aplicaciones a modo de ejemplo del aparato 10 haciendo referencia a los resultados de los experimentos llevados a cabo por el presente solicitante utilizando un prototipo del aparato 10.

35 En un primer experimento, el prototipo fue utilizado para diagnosticar C. difficile a partir de una muestra de heces proporcionada por un paciente. En este experimento, muestras de heces sanas y muestras de heces de pacientes previamente diagnosticados con C. difficile y con colitis ulcerosa fueron analizadas utilizando el prototipo del aparato, y los compuestos volátiles presentes en cada uno de los tipos de muestra fueron cotejados y sometidos a un análisis discriminante, cuyos resultados se muestran en el gráfico de la figura 11. A partir de este gráfico se puede ver claramente que los compuestos encontrados en las muestras de heces de pacientes diagnosticados con C. difficile se encuentran en un agrupamiento distinto y, a partir de esta información, el aparato 10 puede ser configurado para diagnosticar C. difficile mediante el análisis de muestras de heces, ya sea por comparación directa con un perfil conocido para compuestos que contienen heces indicativo de C. difficile, o mediante la implementación de una ANN

entrenada con datos recogidos de muestras tomadas de pacientes diagnosticados con *C. difficile*

5 En un segundo experimento, el prototipo utilizado en el primer experimento fue utilizado para analizar muestras de orina proporcionadas por dos voluntarios sanos, para producir gráficas indicativas de diferentes compuestos volátiles encontrados en las muestras. El gas se desprendió de las muestras y se hizo pasar por la etapa de detección para producir las gráficas.

10 Se utilizaron dos métodos para extraer compuestos volátiles del gas desprendido de las muestras de orina. En el primer método, se extrajo aire de un espacio vacío superior sobre la muestra de orina, mientras que en el segundo método se expuso una fibra de SPME al espacio vacío superior sobre la muestra de orina y, posteriormente se introdujo en el orificio de inyección del horno de cromatografía de gases para su desorción y posterior análisis. En ambos métodos, las muestras de orina fueron calentadas aproximadamente a 60 °C antes de la extracción del aire del espacio vacío superior o de la exposición de la fibra de SPME al aire del espacio vacío superior, para favorecer la liberación de compuestos volátiles de las muestras de orina. El horno de cromatografía de gases fue precalentado a una temperatura de 30 °C, temperatura que se mantuvo durante seis minutos después de la inyección del aire del espacio vacío superior o la fibra de SPME en el horno. La temperatura del horno de cromatografía de gases fue incrementada posteriormente en 5 °C por minuto hasta que se alcanzó una temperatura final de 100 °C. La temperatura se mantuvo a 100 °C durante 40 minutos, resultando un tiempo de ejecución total de 60 minutos. En ambos métodos, se analizaron tres muestras en paralelo, siendo acidificada una primera muestra de orina de 6 ml con 1 ml de ácido sulfúrico (1 M), siendo basificada una segunda muestra de orina de 6 ml con 0,5 ml de hidróxido de sodio (0,5 M) y siendo tratada una tercera muestra de 6 ml con una cantidad equivalente de agua desionizada. Las muestras acidificadas y basificadas produjeron más compuestos volátiles que la muestra no tratada.

15 La siguiente tabla 10 muestra los resultados del análisis de las muestras de orina de los voluntarios sanos HV1 y HV2 utilizando el primer método. Se debe observar que los compuestos volátiles fueron detectados en la etapa de detección 18 en 45 tiempos de retención distintos, lo que indica la presencia en las muestras de orina de hasta 45 compuestos volátiles. Adicionalmente, se detectaron más compuestos volátiles para las muestras acidificadas que para las muestras basificadas y las muestras no tratadas.

Tabla 10

	RT	HV1			HV2		
		no tratada	acidificada	basificada	no tratada	acidificada	basificada
20	1		x				
	2	x		x		x	
	3		x		x		x
	4	x	x		x	x	
	5	x	x			x	
	6	x		x			
	7			x			
25	8	x	x			x	
	9			x	x		
	10		x				
	11		x				
	12						x
	13		x				
	14		x				
30	15	x	x	x			
	16		x				
	17	x	x	x			
	18		x	x			
	19	x					
	20		x				
	21	x	x	x		x	
	22	x		x			
35	23		x				
	24		x				
	25		x	x		x	
	26	x					
	27		x				

	RT	HV1			HV2		
		no tratada	acidificada	basificada	no tratada	acidificada	basificada
28	17,02	x	x	x			
29	18,10	x					
30	18,50		x				
31	19,29	x			x		
32	19,66	x	x			x	
33	21,47		x	x			
34	22,79		x				
35	23,44		x				x
36	23,98		x				
37	24,42		x			x	
38	24,69	x					
39	25,57	x					
40	27,06	x					
41	29,39		x			x	
42	36,24		x				
43	37,96	x					
44	58,80			x			
45	59,61	x					
Total		20	29	13	4	9	3

La siguiente tabla 11 muestra los resultados del análisis de las muestras de orina proporcionadas por los voluntarios sanos HV1 y HV2 utilizando el segundo método. Con este método, los compuestos volátiles fueron detectados mediante la etapa de detección 18 en 90 tiempos de retención distintos, lo que indica la presencia en la muestra de orina de hasta 90 compuestos volátiles. Como antes, se detectaron más compuestos volátiles para las muestras acidificadas que para las muestras basificadas y las muestras no tratadas, tal como se muestra en las figuras 12 y 13, que son capturas de pantalla que muestran los resultados del análisis utilizando el segundo método de la muestra de orina no tratada y la muestra de orina acidificada, respectivamente.

5

Tabla 11

	RT	HV1			HV2		
		no tratada	acidificada	basificada	no tratada	acidificada	basificada
1	1,12	x	x	x	x	x	x
2	1,22	x		x			
3	1,58	x	x	x	x	x	x
4	1,96	x					
5	2,32		x				x
6	2,54	x		x			
7	3,02			x			
8	3,23						x
9	4,07		x	x			
10	4,40					x	
11	4,80		x				x
12	5,19		x	x			
13	6,00		x			x	
14	6,29		x				
15	6,90			x			
16	8,24						x
17	8,39		x				
18	8,85			x		x	x
19	9,11	x	x				
20	10,74	x	x	x		x	
21	11,60		x				
22	12,13		x				
23	12,77	x					

ES 2 763 211 T3

	RT	HV1			HV2		
		no tratada	acidificada	basificada	no tratada	acidificada	basificada
24	12,95						x
25	13,11	x	x	x		x	
26	13,38	x					
27	13,80	x		x	x		
28	14,09		x				
29	14,24			x			
30	14,74		x	x			
31	15,24	x					
32	15,57		x				
33	15,71						x
34	15,94			x		x	
35	16,15	x	x				x
36	16,33		x	x			
37	16,83						x
38	17,78	x					
39	18,55	x	x			x	
40	18,78		x				
41	18,97			x			
42	19,33	x			x		
43	19,73	x	x	x		x	
44	20,35	x		x	x		x
45	21,12						x
46	21,48		x	x			
47	22,70		x	x		x	
48	23,19	x					
49	23,38			x			
50	23,78		x				x
51	24,46		x	x		x	
52	24,73		x				
53	25,45	x			x		
54	25,69		x				
55	26,16		x			x	
56	26,93		x				
57	27,17						x
58	27,26		x				
59	27,48	x					
60	28,04		x			x	
61	29,32		x				
62	29,60		x	x	x	x	
63	30,35	x	x	x			x
64	32,17		x				x
65	33,18		x				
66	34,52		x	x		x	
67	34,90	x					
68	34,94	x					
69	35,32		x				
70	36,30		x	x			
71	36,60						x
72	37,30		x				
73	38,07						x
74	38,45		x				
75	39,11			x			

	RT	HV1			HV2		
		no tratada	acidificada	basificada	no tratada	acidificada	basificada
76	40,33		x				
77	40,97						x
78	41,28		x				
79	44,43		x				
80	45,83		x				
81	46,33		x				
82	47,43						x
83	47,8		x				
84	48,17			x			
85	50,23		x				
86	52,66		x				
87	55,19	x		x			
88	56,70		x			x	
89	59,54	x	x	x			
90	61,24		x	x		x	
Total		26	53	32	7	18	21

Estos resultados demuestran que el aparato 10 puede ser utilizado para diagnosticar enfermedades mediante el análisis de muestras de orina para detectar compuestos que pueden ser indicativos de enfermedad, de la misma manera que se ha descrito anteriormente con relación a la detección de enfermedades mediante el análisis de muestras de heces.

5

En otro experimento, el prototipo utilizado en los dos primeros experimentos fue utilizado para analizar 52 muestras de orina, 17 de las cuales fueron tomadas de pacientes diagnosticados mediante biopsia con cáncer de próstata, y las restantes 35 fueron tomadas de pacientes en los que los resultados de la biopsia para cáncer de próstata fueron negativos.

En este experimento, la ANN fue entrenada utilizando 11 muestras de orina de pacientes diagnosticados mediante biopsia con cáncer de próstata y 22 muestras en las que los resultados de la biopsia para detectar cáncer de próstata fueron negativos, para proporcionar datos de entrenamiento. Después del entrenamiento de la ANN, las 52 muestras fueron analizadas utilizando el método que se describe a continuación.

10

Para cada muestra, se transfirió una parte alícuota de orina fresca, 6 ml, a un vial con espacio vacío superior y se trató con 1 ml de ácido sulfúrico (1 M). Se dejó que la muestra se estabilizara a temperatura ambiente durante 30 minutos y, a continuación, se calentó durante 20 minutos a 60 °C antes de extraer 2 cm<sup>3</sup> de aire del espacio vacío superior. Después de la extracción, el aire del espacio vacío superior fue inmediatamente inyectado en el orificio de inyección (100 °C) del horno 12 de cromatografía de gases para su análisis.

El horno 12 de cromatografía de gases se arrancó a una temperatura de 30 °C y se mantuvo durante 6 minutos. A continuación, se aplicó una rampa de 5 °C por minuto hasta alcanzar una temperatura final de 100 °C. La temperatura se mantuvo a 100 °C durante 40 minutos, resultando un tiempo de ejecución total de 60 minutos.

15

Aumentar la temperatura del horno aumenta el número de picos detectados por el sistema de sensores. Esta etapa es necesaria para detectar compuestos volátiles en orina, puesto que las concentraciones son más bajas en las muestras de heces.

La ANN utilizada en este experimento dio un 83 % de identificación positiva de muestras de cáncer de próstata y un 69 % de identificación positiva de muestras negativas. La clasificación global de las muestras fue del 74 %.

20

25

## REIVINDICACIONES

1. Aparato de diagnóstico (10) configurado para analizar el gas obtenido a partir de una muestra biológica y proporcionar como salida un diagnóstico, comprendiendo el aparato de diagnóstico:
- 5 un elemento de separación (16), para separar el gas obtenido a partir de la muestra biológica en partes componentes;  
un sensor (48), configurado para detectar compuestos presentes en el gas que pueden ser indicativos de enfermedad, estando acoplado el sensor (48) al elemento de separación (16) de tal manera que una parte componente del gas se dirige hacia el sensor (48); y  
un elemento de procesamiento (20), acoplado a una salida del sensor (48), estando configurado el elemento de procesamiento (20) para procesar una señal entregada por el sensor (20) para proporcionar el diagnóstico;  
**caracterizado por que** el sensor (48) comprende:
- 10 un sustrato (80), que tiene un primer y un segundo lados;  
un calentador resistivo (82) en el primer lado;  
electrodos (84) en el segundo lado; y  
una mezcla (48, 50) de óxido de zinc y óxido de estaño aplicada a los electrodos, para permitir que la corriente circule entre los electrodos.
2. Aparato de diagnóstico, según la reivindicación 1, en el que el elemento de separación comprende una columna de múltiples capilares.
- 15 3. Aparato de diagnóstico, según la reivindicación 1, en el que el elemento de separación comprende una columna de un solo capilar o una pluralidad de columnas de un solo capilar.
4. Aparato de diagnóstico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la disposición de sensores comprende uno o varios sensores adicionales seleccionados del grupo que comprende:
- 20 un sensor de óxido metálico, comprendiendo el sensor de óxido metálico un elemento de óxido metálico caliente configurado para detectar compuestos volátiles;  
un sensor activado mediante UV, comprendiendo el sensor activado mediante UV un sensor que utiliza un elemento de óxido metálico activado mediante luz ultravioleta o casi ultravioleta para detectar ciertos compuestos volátiles; y  
un sensor de amoníaco o amina.
5. Aparato de diagnóstico, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende dos o más sensores dispuestos en una configuración en serie.
6. Aparato de diagnóstico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende dos o más sensores dispuestos en una configuración en paralelo.
- 25 7. Aparato de diagnóstico, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sensor está configurado para detectar uno o varios compuestos volátiles presentes en el gas.
8. Aparato de diagnóstico, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sensor está configurado para detectar uno o varios compuestos orgánicos volátiles presentes en el gas.
9. Aparato de diagnóstico, según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que el sensor está configurado para generar una señal indicativa del tiempo de elución de un compuesto volátil en la muestra.
- 30 10. Aparato de diagnóstico, según la reivindicación 9, en el que el elemento de procesamiento está configurado para comparar la señal generada por la disposición de sensor con un perfil conocido de una o varias muestras diagnosticadas previamente.
11. Aparato de diagnóstico, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, además, una etapa de pretratamiento para alterar los parámetros fisicoquímicos de la muestra.
12. Aparato de diagnóstico, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, además, medios de calentamiento para calentar la muestra, con el fin de favorecer la liberación del gas.
- 35 13. Aparato de diagnóstico, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, además, medios para acidificar o basificar la muestra, con el fin de alterar el número o la concentración de compuestos volátiles detectados mediante la disposición de sensores.
14. Aparato de diagnóstico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el elemento de procesamiento implementa una red neuronal artificial para proporcionar el diagnóstico.

15. Aparato de diagnóstico, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, cuando se utiliza el aparato, el elemento de óxido metálico se calienta a una temperatura de alrededor de 450 °C.

16. Aparato de diagnóstico, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra biológica es, o se obtiene a partir de, una muestra de orina o heces.

5

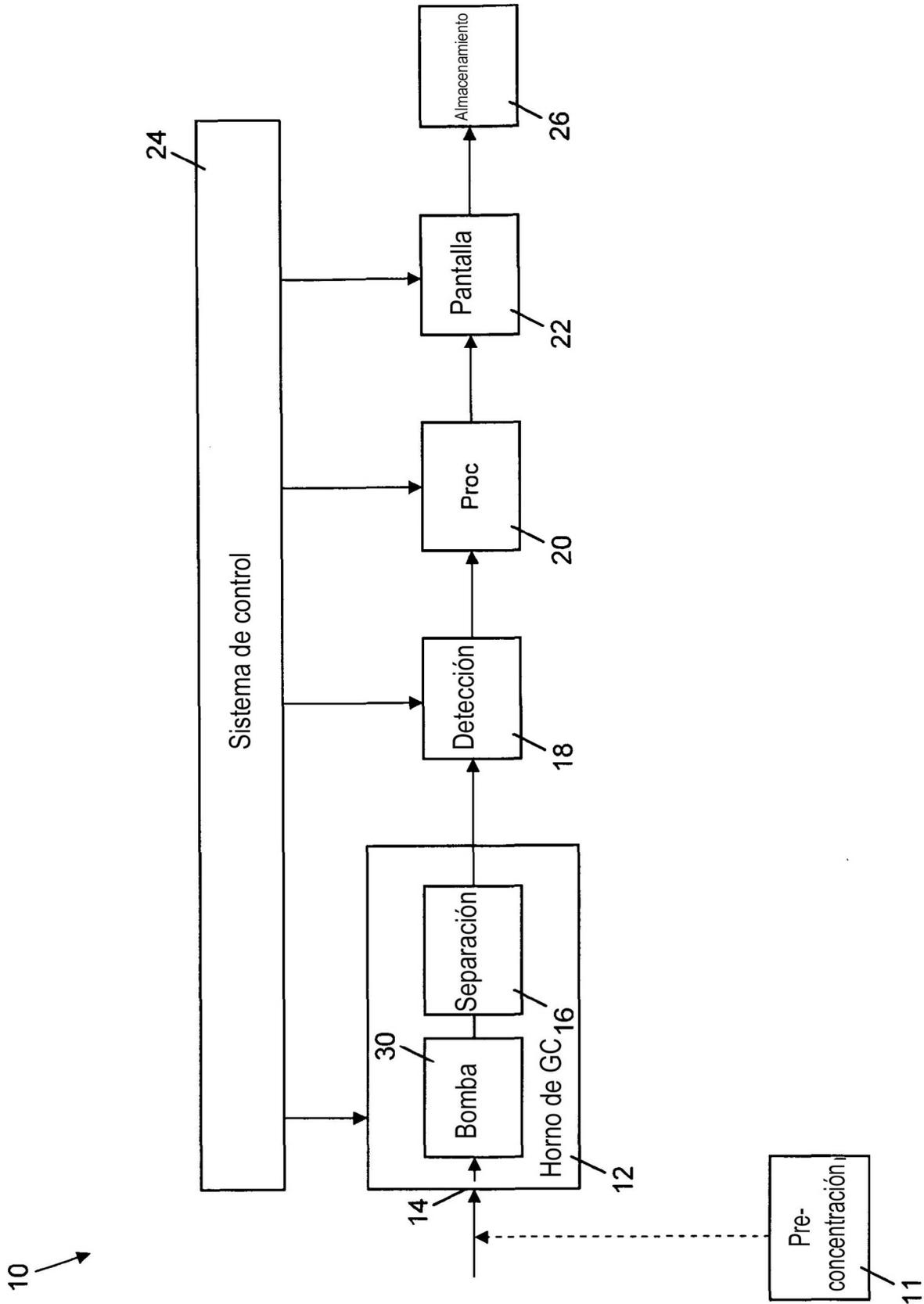


FIG. 1

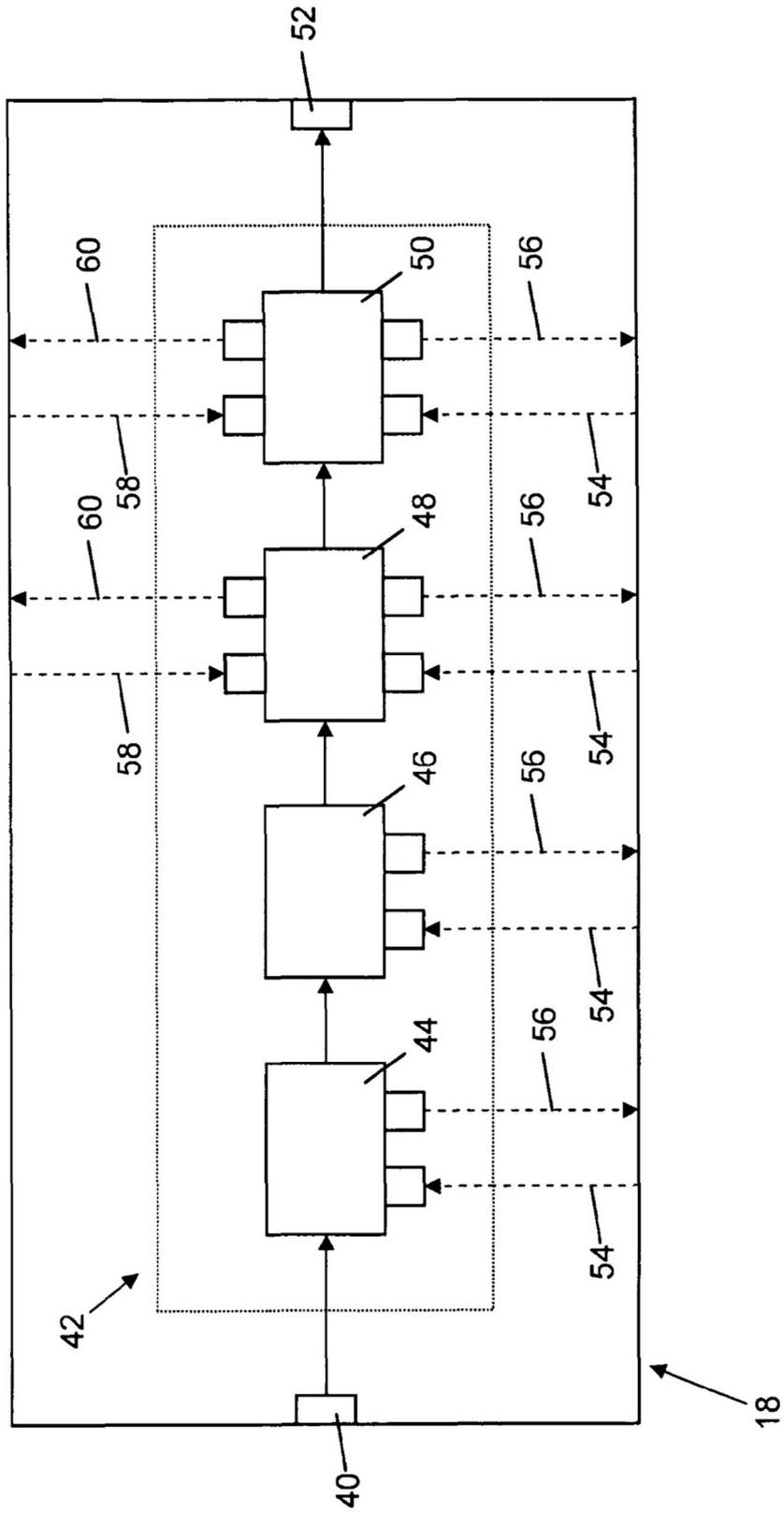


FIG. 2

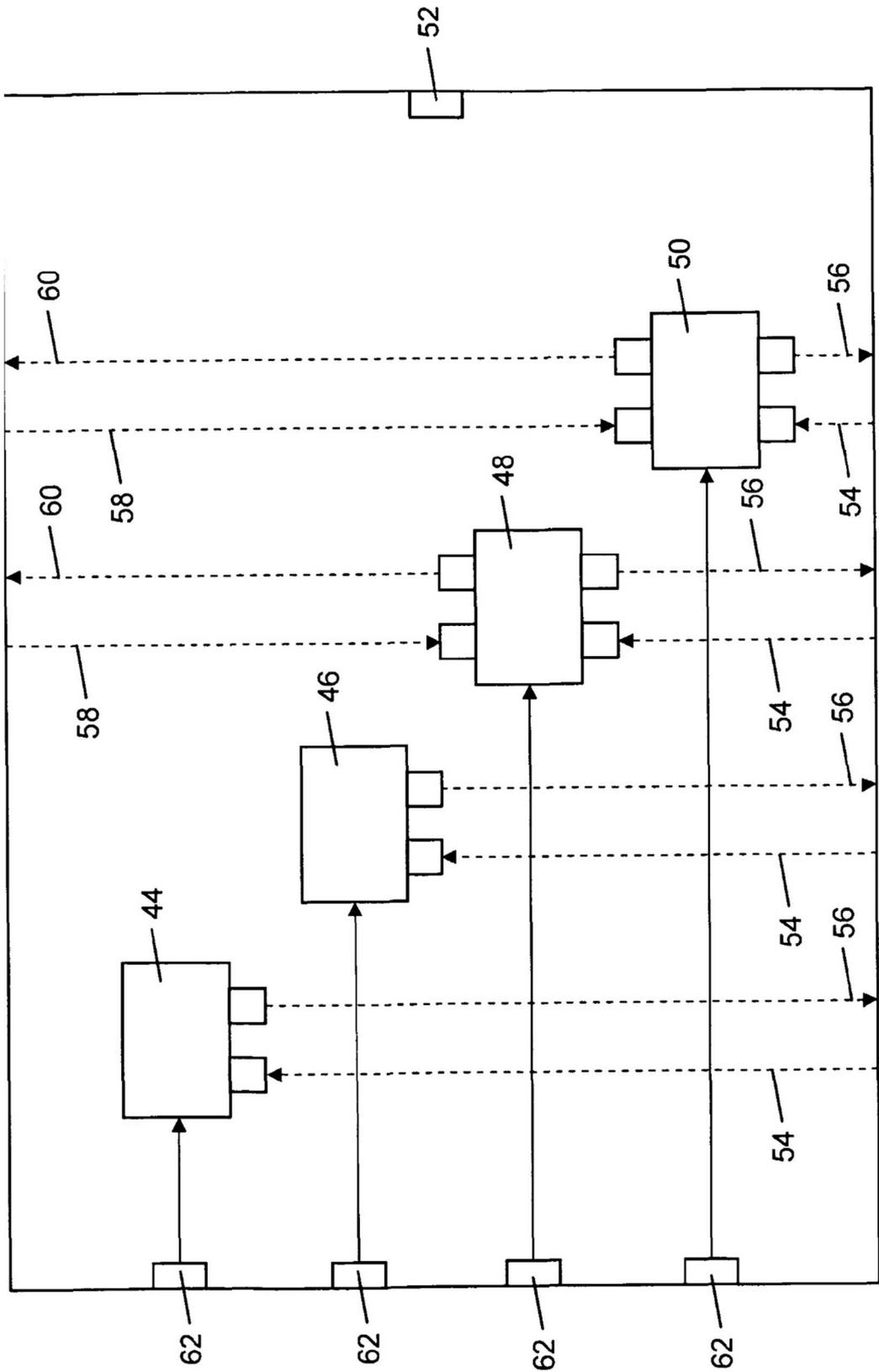


FIG. 3

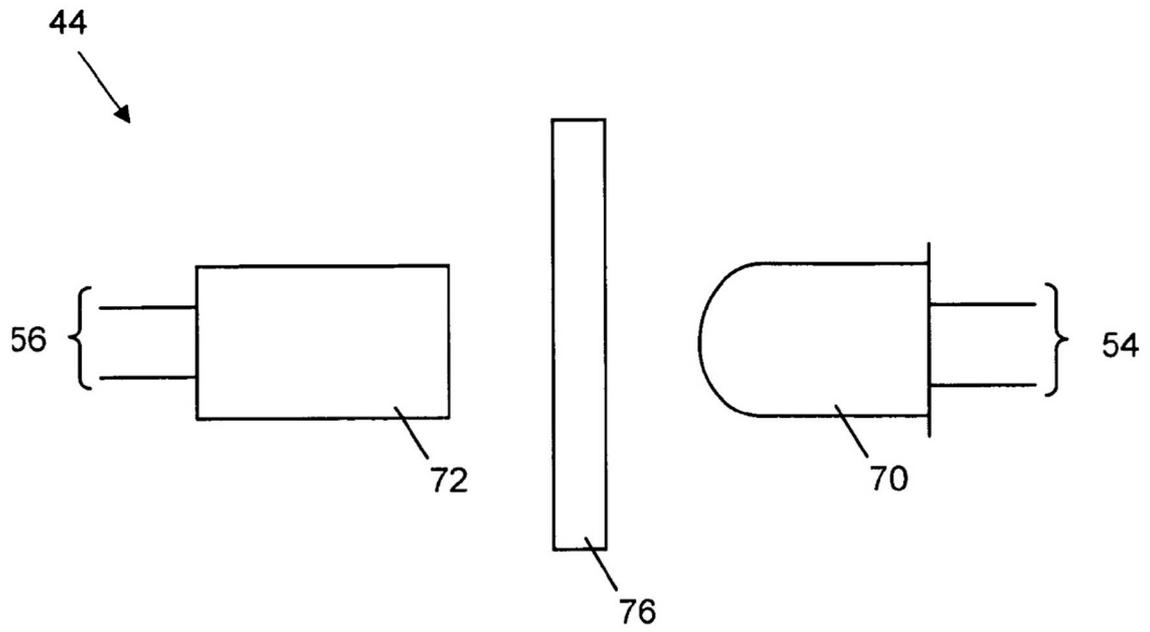


FIG. 4

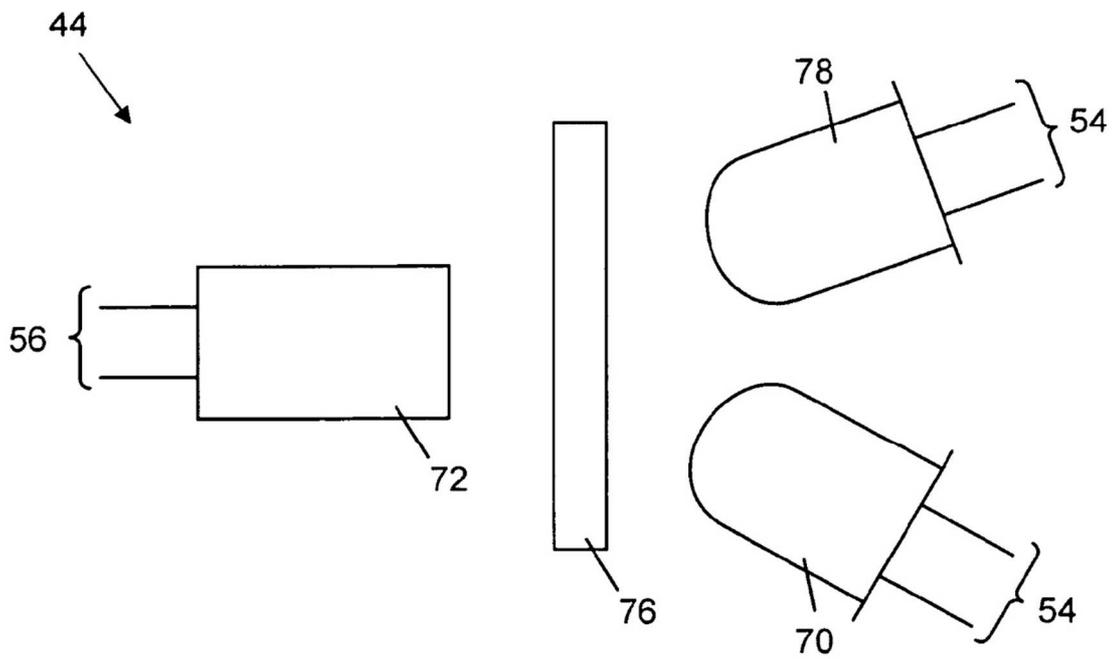


FIG. 5

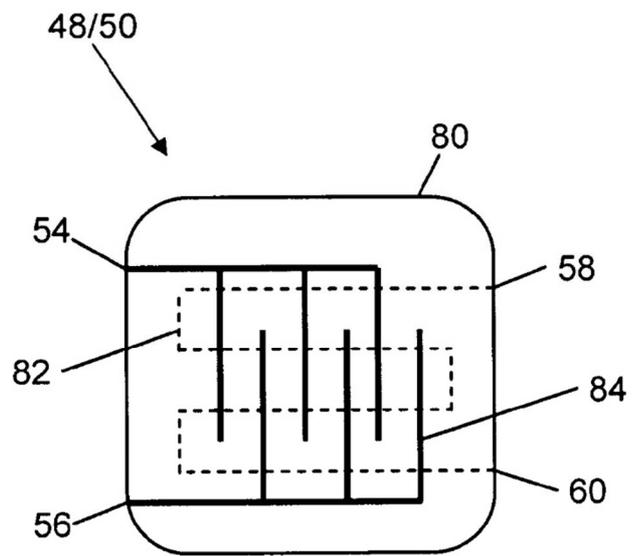


FIG. 6

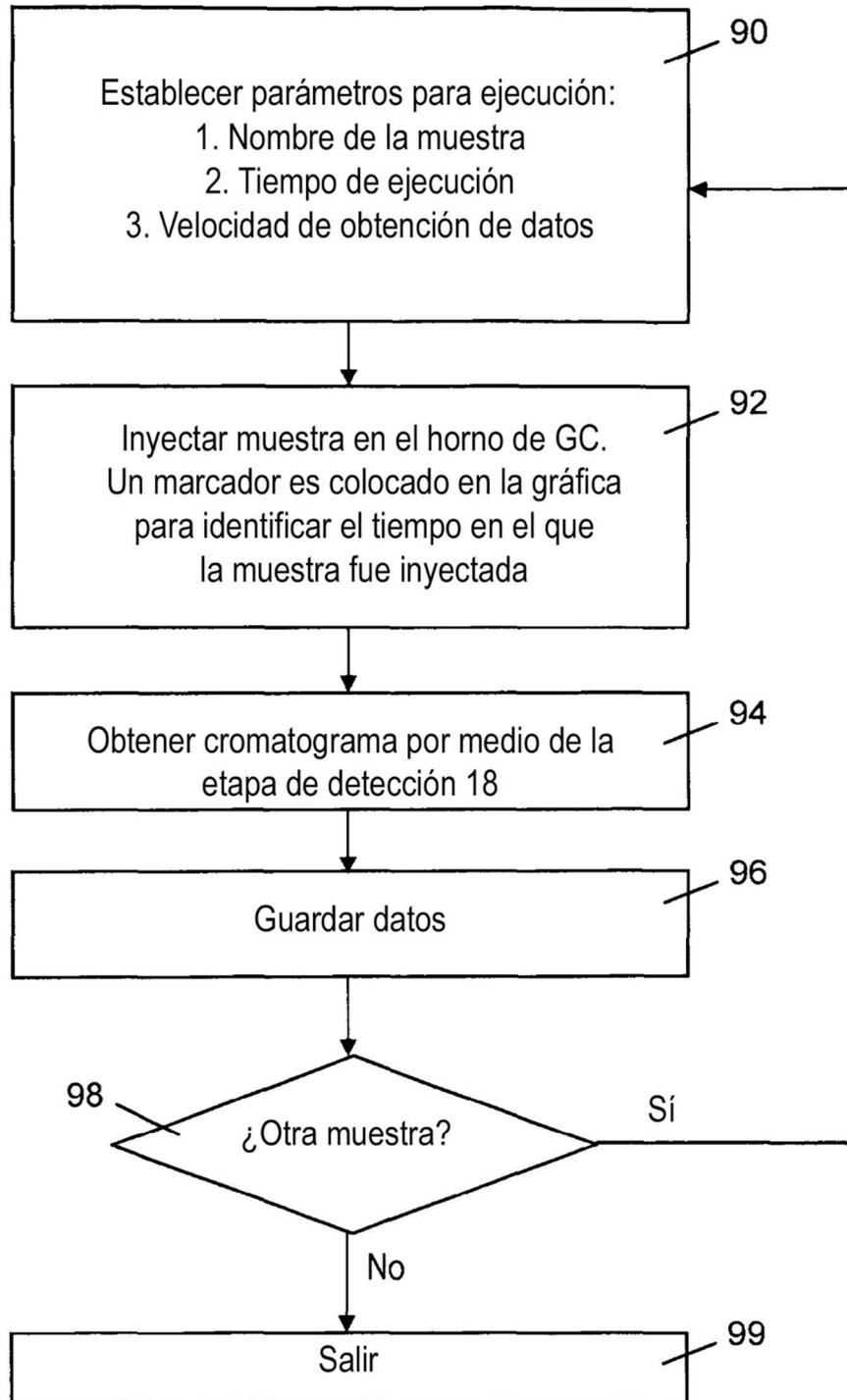


FIG. 7

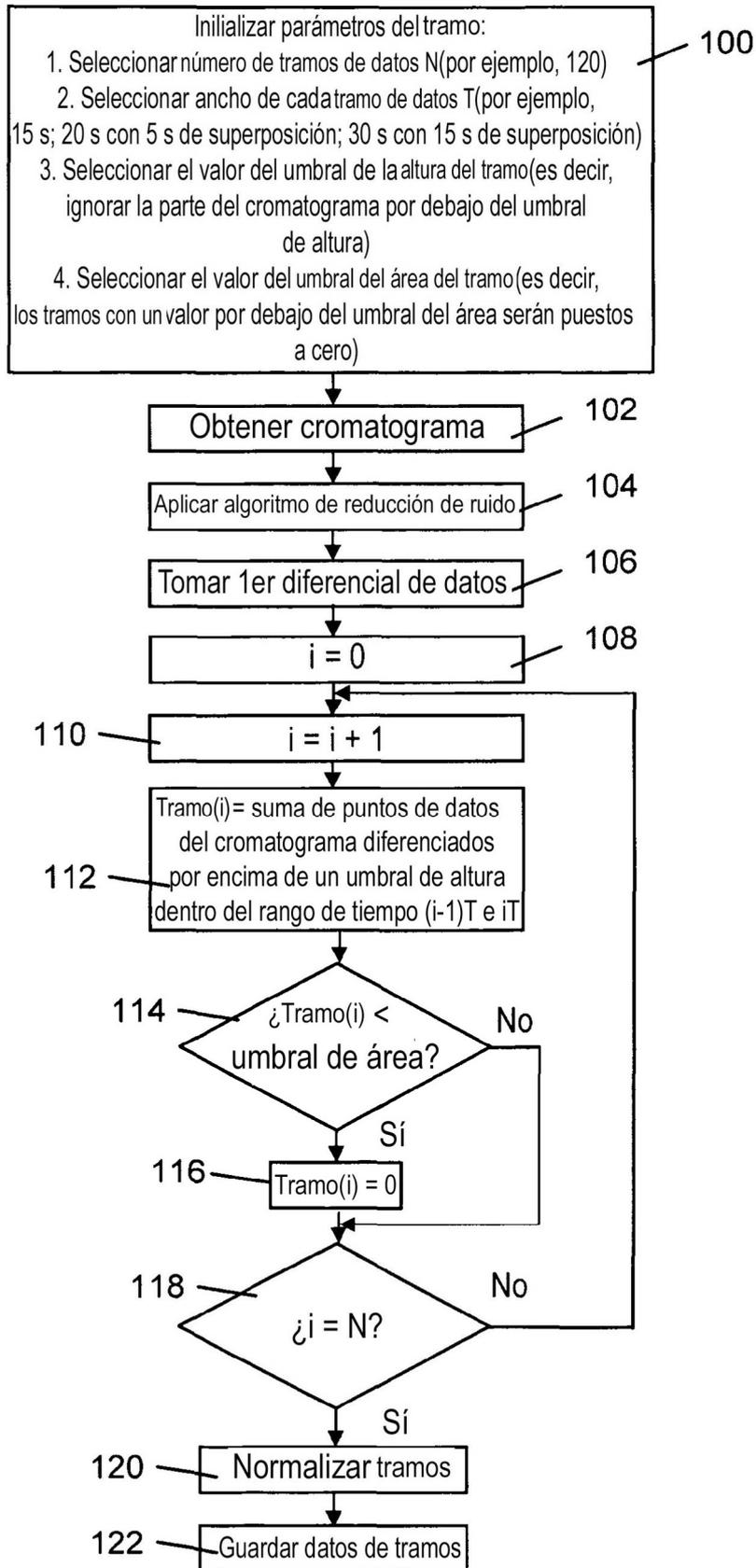


FIG. 8

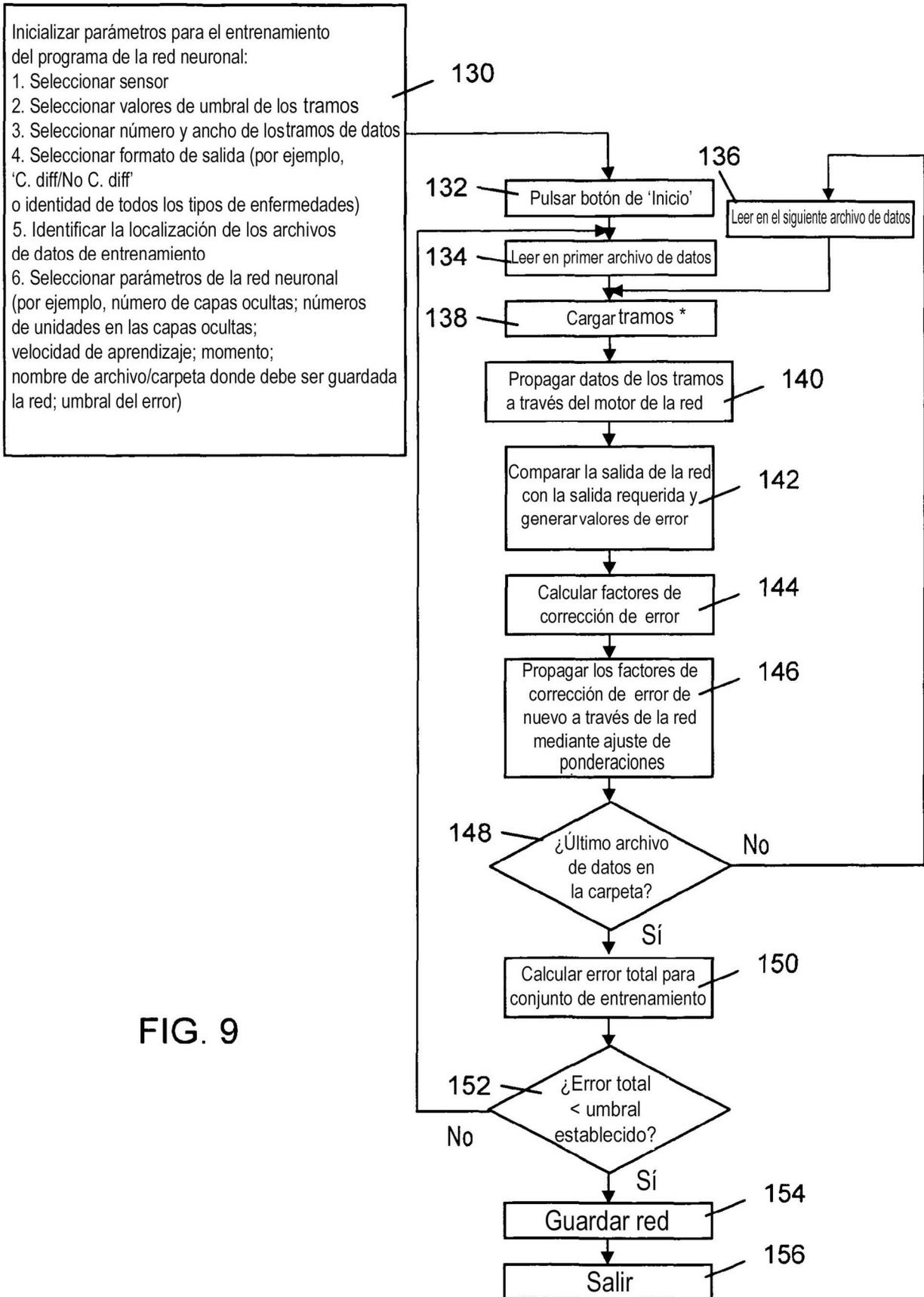


FIG. 9

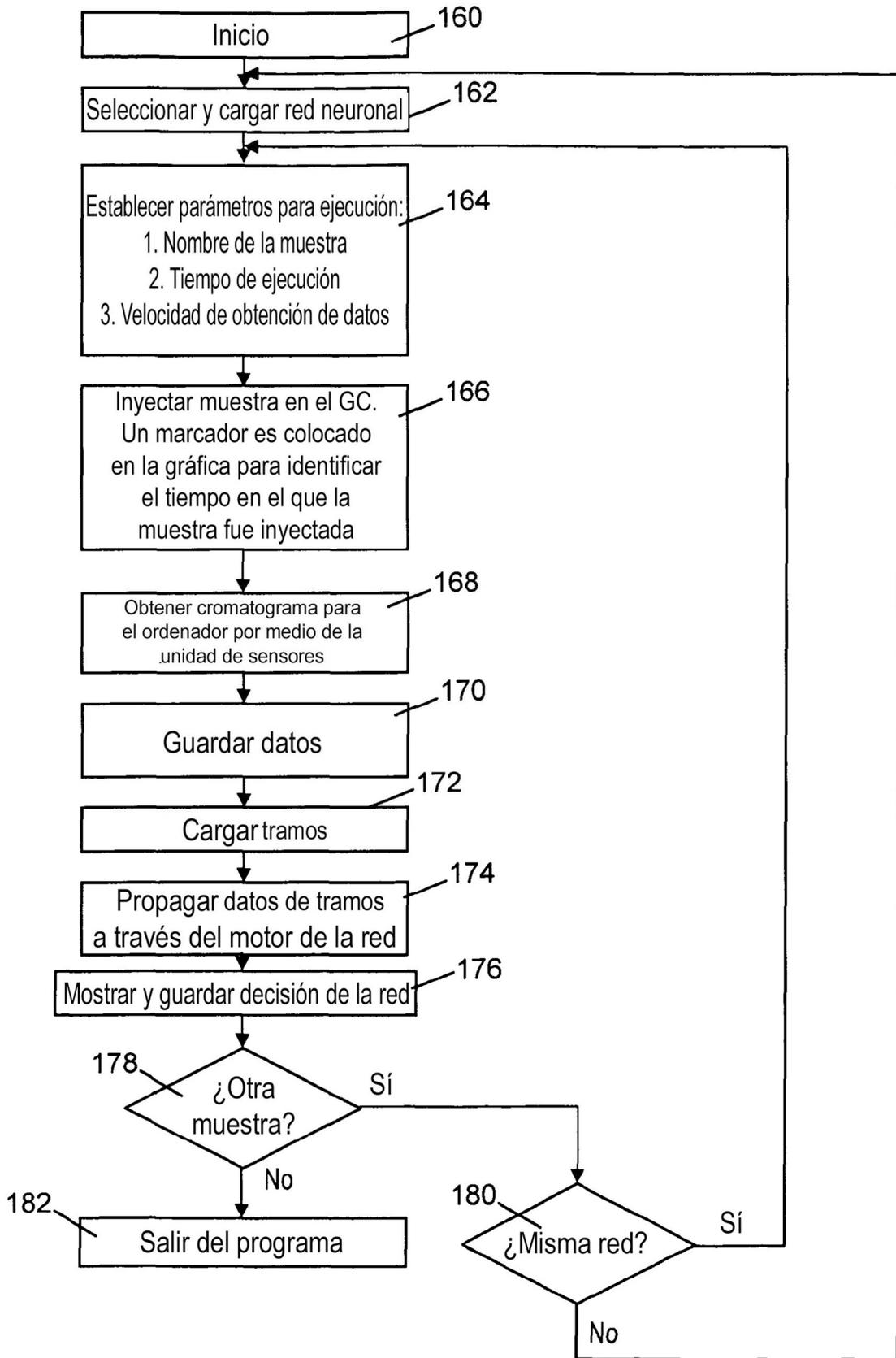
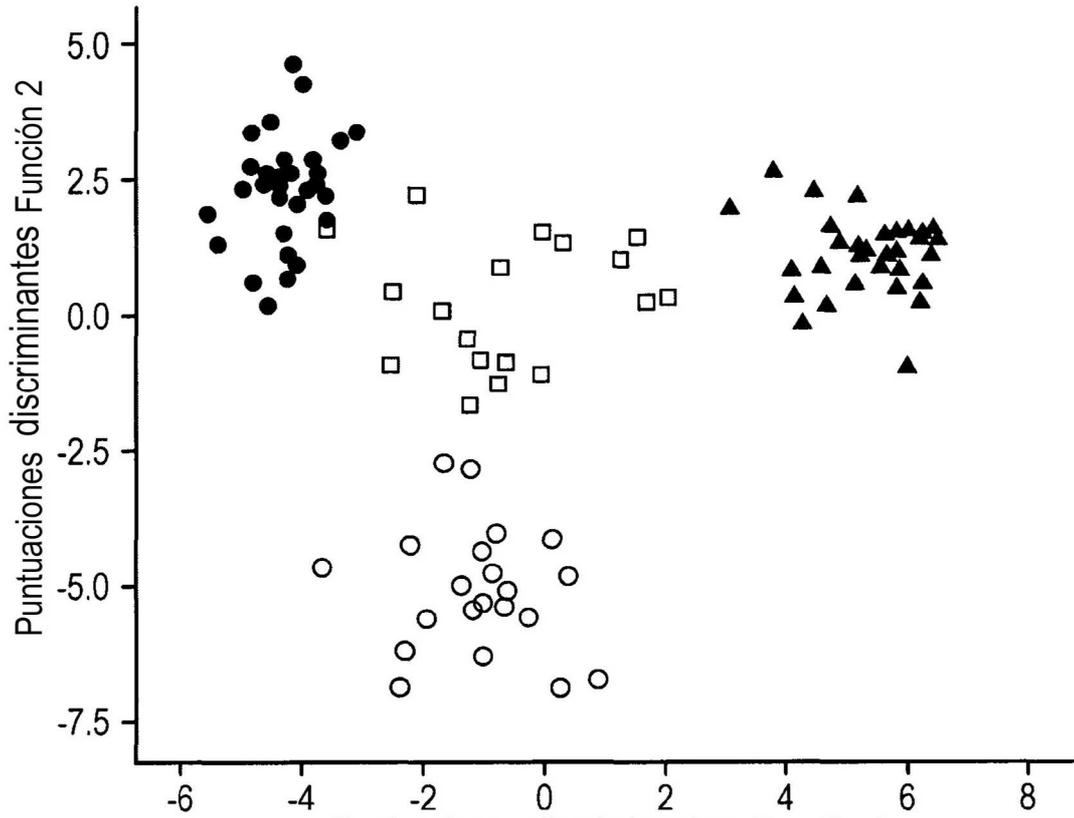


FIG. 10



Puntuaciones discriminantes. Función 1  
Gráfico bidimensional de las puntuaciones discriminantes derivadas de datos de VOC de las heces de voluntarios asintomáticos (●), pacientes con campilobacteriosis jejuni (▲), pacientes con colitis ulcerosa (□), y pacientes con clostridioides difficile (○)

FIG. 11

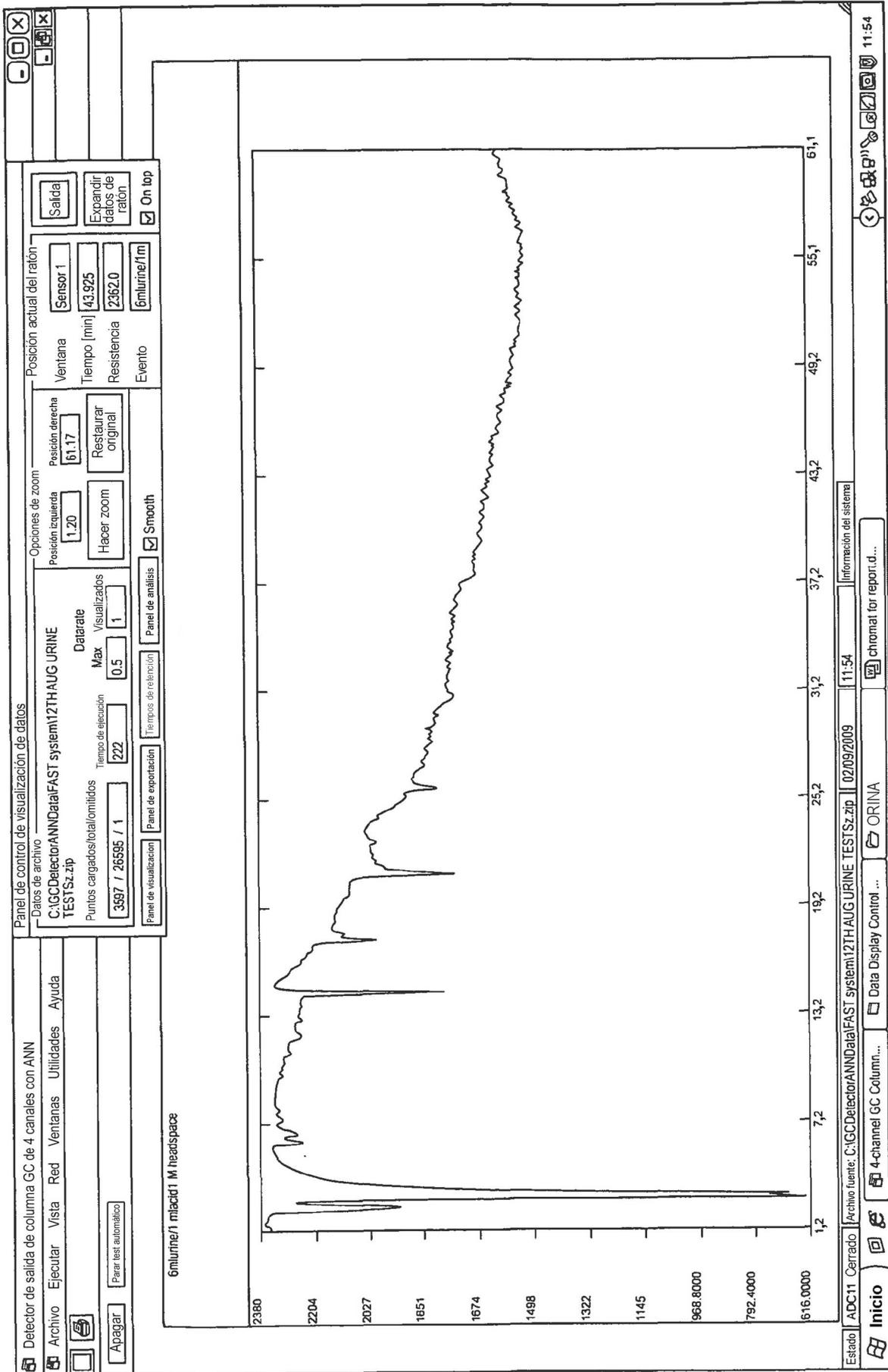


FIG. 12

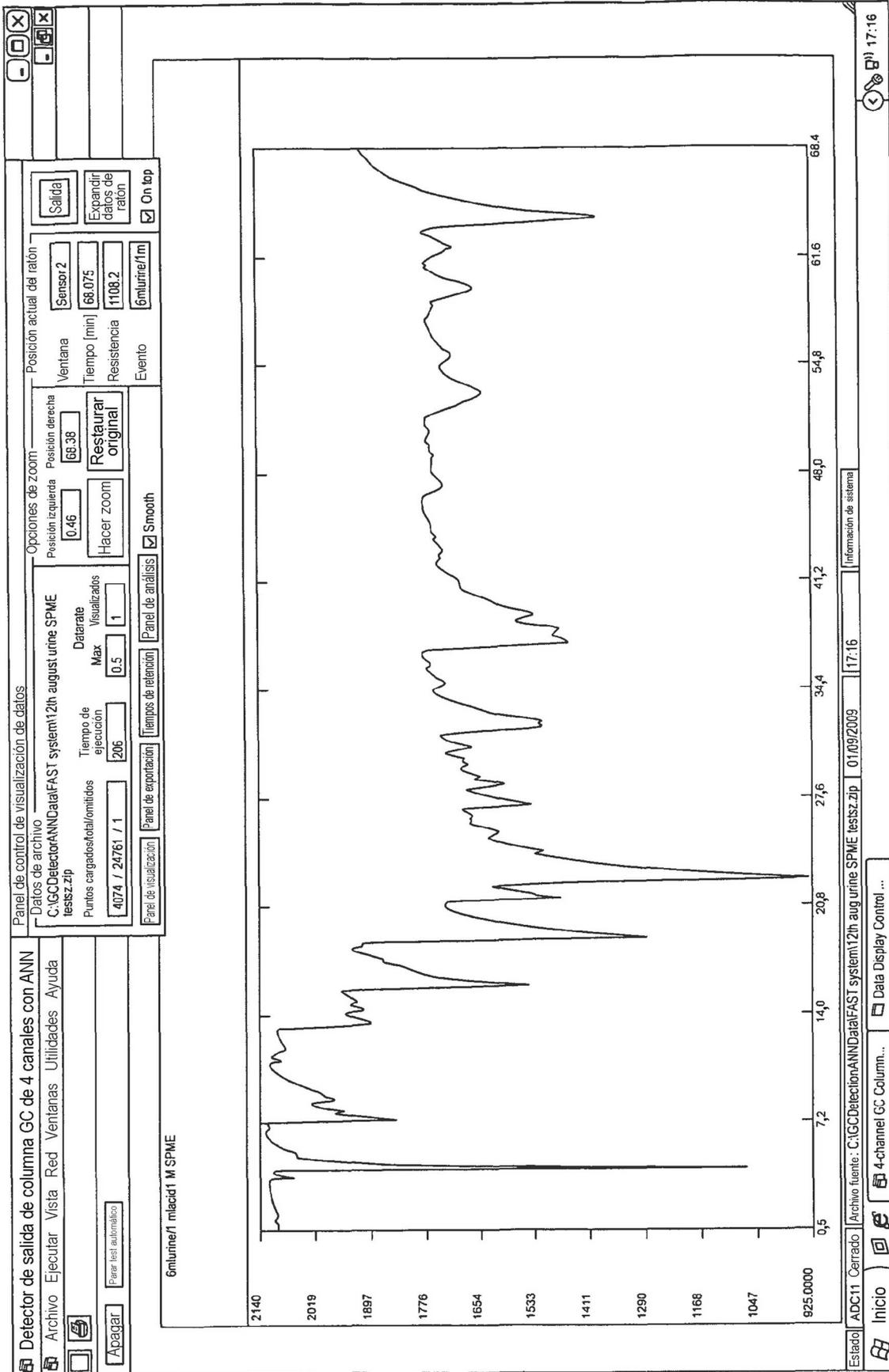


FIG. 13

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

5 *Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.*

**Documentos de patentes citados en la descripción**

10

- US 2002182739 A
- EP 0926492 A