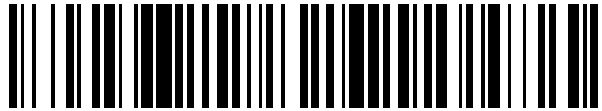


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 006**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.11.2016 PCT/IB2016/057162**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.06.2017 WO17090015**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2016 E 16820341 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 3380842**

54 Título: **Método para determinar actividad bacteriana en una muestra biológica**

30 Prioridad:

27.11.2015 IT UB20155975

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

24.06.2020

73 Titular/es:

**ALIFAX S.R.L. (100.0%)
Via Petrarca 2/1
35020 Polverara (PD), IT**

72 Inventor/es:

GALIANO, PAOLO

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 769 006 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

Método para determinar actividad bacteriana en una muestra biológica

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para detectar la actividad y la presencia de especies bacterianas en muestras biológicas, en particular, pero no únicamente, muestras de sangre, usando técnicas basadas en microcromatografía de gases en una unidad de detección.

10 El método de acuerdo con la presente invención puede adoptarse, por ejemplo, en diagnóstico para seres humanos, en el campo veterinario, el campo de alimentos y cualquier otro campo, para detectar la presencia de bacterias en las diversas muestras biológicas analizadas.

15 **Antecedentes de la invención**

La detección rápida y precisa de bacterias y actividad microbiana en una muestra biológica es fundamental en el diagnóstico de enfermedades infecciosas y, por tanto, en la formulación del tratamiento antibiótico correcto.

20 El método directo principal para detectar actividad bacteriana proporciona poner una muestra biológica en medios de cultivo o caldos con elementos nutrientes específicos que pueden aumentar el crecimiento de las bacterias.

Las técnicas que proporcionan el uso de un medio de cultivo o caldo se caracterizan por un tiempo de espera que varía de acuerdo con las características del medio de cultivo o caldo y las condiciones que aumentan el propio crecimiento bacteriano.

25 Otra técnica para detectar la presencia de bacterias proporciona analizar el gas presente en el espacio vacío de un tubo de ensayo u otro recipiente adecuado, tal como, por ejemplo, los llamados genéricamente viales.

30 Por "espacio vacío" se entiende el volumen libre dentro de un tubo de ensayo cerrado ubicado por encima de la muestra examinada.

Actualmente, se usan tubos de ensayo que usan pastillas dispuestas en el fondo del tubo de ensayo, en contacto con la muestra biológica que contiene la carga bacteriana, con medio de cultivo o caldo añadido; la función de las pastillas es absorber los gases producidos por las bacterias.

35 La solicitud de patente US-A-2010/0255529 describe un método para detectar sustancias gaseosas de una muestra biológica inoculando la última en un medio de cultivo en un tubo de ensayo.

40 Además, este documento proporciona una medición repetida de dióxido de carbono (CO₂) a diferentes intervalos de tiempo para excluir posibles mediciones erróneas y para definir si la muestra biológica es positiva o negativa midiendo el aumento en CO₂ en comparación con la cantidad normalmente presente en el aire, como una señal de que las bacterias están presentes en la muestra y se están replicando.

45 Si la detección de CO₂ es incierta, es decir, no excede un valor umbral determinado de aceptabilidad para atestiguar la presencia de bacterias, se realiza una segunda etapa de incubación, además de la primera etapa, para permitir que los gases saturan de nuevo el espacio vacío.

50 Estas técnicas, aunque tienen mejoras sobre otros procedimientos más tradicionales, requieren tiempos de detección del CO₂ que varían dependiendo de la carga bacteriana presente en la muestra, que puede incluso tardar varios días de incubación y permite la detección positiva correspondiente debido a la presencia de bacterias.

A menudo sucede que los tiempos de detección no son compatibles con la urgencia de la respuesta.

55 Se sabe que para analizar un gas en muestras de sangre completa, puede usarse un dispositivo que captura el gas para detectar el CO₂. Por ejemplo, pueden usarse los dispositivos habitualmente conocidos en el estado de la técnica y propuestos, por ejemplo, por Biomerieux y Becton Dickenson.

60 Otras soluciones en el sector alimenticio, descritas por ejemplo en el documento de F. Gardini *et al.*, Journal of Microbiological Methods 29 (1997), 103-114, proporcionan el análisis del CO₂ en el espacio vacío de un tubo de ensayo cerrado en que están ubicadas muestras de alimentos, correlacionando el número de bacterias presentes en el último únicamente con el porcentaje de CO₂ medido en el espacio vacío.

65 Esta solución está limitada a este campo particular, ya que permite obtener información sobre el número de bacterias en la muestra de alimento, midiendo altas cantidades de CO₂, es decir, cantidades mayores de 300 ppm (partes por millón), que son considerablemente mayores que las cantidades de CO₂ presentes típicamente en el

caso de muestras de sangre.

La solución descrita por F. Gardini *et al.* también requiere largos tiempos para obtener resultados que no dan indicaciones precisas y fiables cuando las cantidades de CO₂ son inferiores a 300 ppm.

5 Como alternativa, la presencia bacteriana puede detectarse detectando la variación en la presión determinada y medida por un detector ubicado en el tapón del propio tubo de ensayo, por ejemplo, usando dispositivos Versatrek-Thermofischer.

10 Otra técnica para detectar actividad bacteriana proporciona evaluar la diferencia en la presión dentro del tubo de ensayo, sin identificar la especie gaseosa detectada que se mide, por ejemplo, CO₂, O₂, H₂.

15 Otras soluciones conocidas, tales como, por ejemplo, el documento WO 2014/128629 (WO'629) y el documento WO 2006/079846 (WO'846), describen métodos para identificar especies bacterianas presentes en la muestra analizada, retirar y analizar las sustancias volátiles, que en este caso específico se refieren a sustancias orgánicas o sustancias derivadas orgánicamente, presentes en el espacio vacío.

20 Estas soluciones conocidas proporcionan realizar una sola medición, también llamada una detección, que no da información respecto al crecimiento y replicación de las bacterias posiblemente presentes en la muestra examinada.

Un propósito de la presente invención es perfeccionar un método para detectar la actividad y la presencia de bacterias en una muestra biológica que sea rápido, fácil de aplicar y que garantice resultados seguros.

25 Otro propósito de la presente invención es proporcionar un método que permita detectar la presencia de CO₂ y O₂ simultáneamente, permitiendo verificar simultáneamente, por ejemplo, un aumento en la cantidad de CO₂ y una disminución en O₂, que se usa para formar el enlace de carbono y oxígeno. La medición puede producirse en un flujo de medición continuo de los componentes gaseosos.

30 Otro propósito es proporcionar un método que pueda reducir la cantidad de muestra biológica necesaria para detectar las bacterias presentes que, con métodos conocidos para detectar CO₂, en muestras de sangre, requiere tubos de ensayo en que se usan más de 10 ml de sangre completa.

35 El solicitante ha ideado, ensayado y plasmado la presente invención para superar los inconvenientes del estado de la técnica y para obtener estos y otros propósitos y ventajas.

Sumario de la invención

40 La presente invención se expone y caracteriza en la reivindicación independiente, mientras que las reivindicaciones dependientes describen otras características de la invención o variantes de la idea innovadora principal.

45 De acuerdo con los propósitos anteriores, la presente invención se refiere a un método para detectar actividad bacteriana, es decir, bacterias vivas que se replican en una muestra biológica analizando sustancias gaseosas inorgánicas, tales como, en particular, aunque no únicamente, CO₂, H₂, O₂ en el espacio vacío de un tubo de ensayo cerrado dentro del que se ha introducido la muestra biológica.

La presente invención se basa en el principio de que las bacterias vivas tienen uno de sus metabolismos activos que implica el desarrollo de CO₂ como signo de su metabolismo y la medición simultánea de disminución de O₂.

50 Las mediciones de CO₂ y O₂ se realizan ventajosamente como una medición dinámica, es decir, en un flujo continuo de las sustancias gaseosas dentro del espacio vacío en diversos momentos de lectura.

55 La secuencia de mediciones dinámicas, por tanto, puede aportar una curva de medición temporal, de la que se construye la dinámica activa de la replicación bacteriana que, en particular, se determina por el aumento en CO₂ y por la disminución en O₂ que se une con el carbono, en el espacio vacío de la muestra biológica insertada en un vial cerrado.

El método también se aplica en la detección de hongos y levaduras presentes en muestras biológicas.

60 El método, por tanto, proporciona retirar los gases contenidos en el espacio vacío para analizar el contenido de sustancias gaseosas inorgánicas tales como, en particular, CO₂, H₂ y/u O₂.

65 En una realización, para facilitar la replicación de las bacterias posiblemente presentes en una muestra biológica, la invención proporciona introducir, en el espacio vacío, sustancias adyuvantes tales como hidrocarburos (metano, etano, propano y otras sustancias similares o comparables) que aceleren la replicación bacteriana.

En una realización ventajosa, la presente invención proporciona introducir sustancias lisantes dentro del vial para

recoger muestras, que descomponen los glóbulos rojos y permiten que las bacterias intercelulares se repliquen en el tubo de ensayo de muestra.

5 La detección de la presencia de las sustancias gaseosas inorgánicas detectadas, por ejemplo, a un tiempo T0 al inicio de la lectura y releídas a lo largo del tiempo en intervalos posteriores T1, T2, ..., Tn, permite construir una curva de detección temporal que, basándose en su dinámica de crecimiento y, por lo tanto, su detección exponencial, permite reducir los tiempos de detección de la presencia de bacterias inducida por la detección de las sustancias inorgánicas.

10 A diferencia de las aplicaciones conocidas en el estado de la técnica, la invención, por tanto, permite obtener una curva de crecimiento de detección y tal como para cuantificar cantidades en ppm.

15 De acuerdo con posibles realizaciones, por lo tanto, la invención permite identificar sustancias inorgánicas correlacionadas con la presencia de bacterias en la muestra biológica, tales como CO₂, por ejemplo, en un intervalo comprendido entre 1 ppm y 10 ppm.

20 En una realización, también se proporciona introducir un medio de cultivo o caldo provisto de sustancias nutritivas para las bacterias y que, ventajosamente, aumentan su crecimiento. De esta manera, se crea un cultivo favorable para el crecimiento bacteriano con la reducción consecuente en los tiempos necesarios para el análisis.

25 En una realización, el análisis para la detección de variaciones en la concentración de CO₂, H₂ y/u O₂ se produce usando un cromatógrafo de gases en miniatura de alta velocidad con detección de la conductividad térmica.

30 En particular, usando un microcromatógrafo de gases, se proporciona la retirada de una cantidad de gas del espacio vacío introduciendo una aguja dentro del tubo de ensayo.

En esta solución, la aguja se conecta a un miembro de succión que puede retirar los gases que se han desarrollado dentro del espacio vacío del tubo de ensayo.

35 De acuerdo con una variante de la invención, también se proporciona la reintroducción de la cantidad de gas recogido del interior del tubo de ensayo mediante una segunda aguja.

40 La reintroducción del volumen del espacio vacío en el interior del microcromatógrafo de gases permite crear una circulación de gas que facilita la detección de las sustancias gaseosas inorgánicas por el microcromatógrafo de gases. El flujo de medición permite medir los valores de aumento (delta) de las cantidades gaseosas detectables a lo largo del tiempo, para permitir que la bomba conectada a la aguja tenga una sustancia gaseosa disponible para aspirarse. La medición de flujo continuo permite que el segundo muestreo encuentre gas medible y disponible, y comparar en los tiempos de medición el aumento en CO₂ y la disminución en O₂.

45 Sin este reciclado del flujo, el segundo muestreo no encontraría gas disponible, ya que se habría extraído por el primer muestreo.

En una realización, puede proporcionarse un elemento magnético dentro del tubo de ensayo para permitir la agitación de la muestra biológica, o el cultivo bacteriano. La mezcla de la muestra en examen ayuda a la replicación bacteriana para aportar material nutritivo al caldo de cultivo, así como facilitar la lisis de los glóbulos rojos con la inserción de las sustancias lisantes.

Breve descripción de los dibujos

50 Estas y otras características de la presente invención llegarán a ser evidentes a partir de la siguiente descripción de algunas realizaciones, dada como ejemplo no restrictivo con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- la figura 1 es una representación esquemática de un método de detección de acuerdo con una realización.

55 Para facilitar la comprensión, se han usado los mismos números de referencia, cuando ha sido posible, para identificar elementos comunes idénticos en los dibujos. Se entiende que elementos y características de una realización pueden incorporarse convenientemente en otras realizaciones sin aclaraciones adicionales.

Descripción detallada de algunas realizaciones

60 La figura 1 se usa para describir un método 10 para detectar actividad bacteriana, es decir, para detectar la existencia de bacterias vivas y en replicación, detectando la presencia y cantidad de CO₂, H₂ y/u O₂ en un tubo de ensayo cerrado herméticamente con una muestra biológica.

65 Por ejemplo, la muestra biológica 14 puede comprender, pero no únicamente, sangre, orina, saliva, moco, lágrimas u otra muestra adecuada.

En una realización, la muestra biológica 14 se inserta en un tubo de ensayo o vial 12, se cierra adecuadamente y se esteriliza.

- 5 El tubo de ensayo 12 se cierra mediante un tapón 16 que comprende una membrana, por ejemplo, de caucho, de autocierre y que permite que las agujas pasen, por ejemplo.

La muestra biológica 14 se analiza introduciendo dentro del tubo de ensayo 12 una cantidad mínima de muestra biológica 14, por ejemplo, menos de 5 ml.

- 10 Este aspecto permite, ventajosamente, aplicar el presente método incluso cuando están disponibles cantidades pequeñas de muestra biológica 14, por ejemplo, en el caso de análisis en recién nacidos.

- 15 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, un volumen libre o espacio vacío 18 se deja dentro del tubo de ensayo 12, definido entre el tapón 16 y el nivel de la muestra biológica 14, es decir, por encima de la muestra biológica 14.

- 20 La acumulación de gas o sustancias volátiles está permitida en el espacio vacío 18, es decir, sustancias gaseosas inorgánicas producidas por las bacterias (catabolismo bacteriano) durante su crecimiento dentro del tubo de ensayo 12.

Aquí y a partir de ahora se hará referencia a sustancias volátiles comprendidas como sustancias gaseosas inorgánicas, tales como CO₂, H₂ y/u O₂, que, debido a la manera en que se definen en la presente divulgación, no comprenden sustancias orgánicas.

- 25 En una realización, se envía una cantidad volumétricamente fija de gas a una unidad de detección 22, descrita a continuación.

- 30 Por lo tanto, se proporciona al menos una etapa de tomar una muestra volátil del espacio vacío 18, presente dentro del tubo de ensayo 12.

En otra realización, la unidad de detección 22 es un microcromatógrafo de gases 22 para realizar el análisis de CG.

- 35 El microcromatógrafo de gases 22, que está configurado para miniaturizar y reducir a un mínimo la masa de transferencia, también está equipado con un dispositivo para perforar el tapón 16.

En una realización, tomar la muestra volátil del interior del espacio vacío 18 proporciona el uso de un dispositivo de aguja 20 que perfora el tapón 16 del tubo de ensayo 12 y aspira una cantidad deseada de masa gaseosa por encima de la muestra biológica 14 dentro de la que está el gas generado por las bacterias.

- 40 La muestra volátil posteriormente se analiza por el microcromatógrafo de gases 22 para detectar la presencia y/o cantidad de CO₂, H₂ y/u O₂.

En particular, el microcromatógrafo de gases 22 proporciona un dispositivo de control y mando 28.

- 45 De acuerdo con posibles realizaciones, el microcromatógrafo de gases 22 está configurado para identificar sustancias inorgánicas, tales como, por ejemplo, CO₂, H₂ y/u O₂, correlacionadas con la presencia de bacterias en la muestra biológica, en un intervalo comprendido entre 1 ppm y 10 ppm.

- 50 El dispositivo de control y mando 28 puede procesar un patrón de detección de CO₂ 30, es decir, de las sustancias catabólicas gaseosas producidas y presentes en el espacio vacío 18.

Además, como alternativa a o además de medir el CO₂, el dispositivo de control y mando 28 puede procesar un patrón de detección de O₂ 32.

- 55 La posibilidad de medir simultáneamente la variación temporal de dos o más sustancias gaseosas inorgánicas tales como CO₂ y/u O₂ permite correlacionar los patrones respectivos y obtener un resultado preciso, fiable y completo.

- 60 Además, la medición se realiza volviendo a introducir el gas en el espacio vacío después de cada medición, de modo que sea posible realizar mediciones en secuencia y obtener la evolución temporal de cada secuencia y, por tanto, de la actividad bacteriana correlacionada.

- 65 En particular, un procedimiento de retirada y posterior reintroducción puede proporcionar que, en un tiempo de medición 0, se retire el componente de gas completo dentro del tubo de ensayo. Una segunda lectura del mismo tubo de ensayo en tiempo T1 daría un vacío, conocido como presión negativa, debido a haber aspirado toda la sustancia ya antes de la succión.

ES 2 769 006 T3

Por lo tanto, la reintroducción de la sustancia aspirada en el mismo tubo de ensayo permite, en la segunda, tercera o cuarta lectura en tiempo T0, T1, T2, T3 ... una evaluación de medición para los componentes objeto de la detección de las bacterias.

- 5 En las mediciones temporales y subdivididas en tiempo T0, T1, T2, T3 ... por lo tanto, es posible detectar si el componente inorgánico aumenta o está estable a lo largo del tiempo. En una realización, el dispositivo de aguja 20 comprende una aguja 24 para tomar una muestra volátil del espacio vacío 18.

10 La toma de la muestra volátil se hace posible mediante la presión positiva en el tubo de ensayo 12 que permite que la muestra volátil entre dentro del microcromatógrafo de gases 22.

15 En una realización, la muestra volátil puede tomarse del tubo de ensayo 12 mediante aspiración usando un miembro de succión 29 integrado en el circuito del dispositivo de aguja 20 y conectado a la aguja 24, para facilitar la medición de la especie gaseosa dentro del espacio vacío 18, también para concentraciones pequeñas de la especie gaseosa presente y que se está examinando, si la presión dentro del tubo de ensayo 12 fuera igual a la presión atmosférica o presión negativa.

20 En otra realización, el dispositivo de aguja 20 comprende dos agujas 24. En particular, la segunda aguja 24 es adecuada para reintroducir la cantidad de gas tomada del espacio vacío 18 dentro del tubo de ensayo 12.

La segunda aguja 24 puede conectarse a un miembro de introducción 33 de la cantidad de muestra volátil dentro del tubo de ensayo 12.

25 La presencia de dos agujas 24 permite aplicar una recirculación del gas dentro del tubo de ensayo 12, evitando tiempos de espera, previamente descritos en el estado de la técnica, para liberar el CO₂ al espacio vacío 18.

30 Además, la medición periódica de CO₂, aumentará el O₂ según aumente el metabolismo de las bacterias, facilitando también la posible medición periódica de O₂. La medición periódica del espacio vacío, realizada a uno o más intervalos de tiempo definidos, da una medición dinámica, es decir, correlacionada con el tiempo, como una función de la cantidad de bacterias presentes. El microcromatógrafo de gases 22, por tanto, permite detectar cantidades crecientes de sustancias gaseosas a detectar y medir, para obtener una dinámica de crecimiento, posiblemente representada por un gráfico, de las sustancias gaseosas detectadas con respecto al tiempo.

35 En una realización, la muestra biológica 14 puede introducirse, inocularse, dentro de un tubo de ensayo 12 donde hay un caldo de cultivo.

La muestra biológica 14, junto con el medio de cultivo o caldo forma un cultivo bacteriano 26 después de esperar durante el periodo de incubación.

40 En otra realización, el método proporciona exclusivamente introducir la muestra biológica nativa 14 dentro del tubo de ensayo 12 sin caldo eugónico.

45 En otra realización, pueden introducirse sustancias adyuvantes dentro del tubo de ensayo 12, que pueden acelerar el proceso metabólico de la especie bacteriana posiblemente presentes en la muestra biológica 14.

Por ejemplo, por sustancias adyuvantes se entiende sustancias gaseosas tales como metano, etano, propano u otros gases, o sustancias líquidas o sólidas.

50 En otra realización, pueden introducirse sustancias lisantes dentro de la muestra biológica 14 o el cultivo bacteriano 26, para liberar las bacterias dentro de los glóbulos rojos.

Por ejemplo, por sustancias secuestrantes se entiende carbono o resinas u otras sustancias que pueden realizar una acción secuestrante sobre las sustancias antibióticas presentes en la muestra después del inicio del tratamiento con antibióticos.

55 En otra realización, no mostrada en los dibujos, se introduce un elemento magnético en el fondo del tubo de ensayo 12 para agitar el cultivo bacteriano 26.

60 El elemento metabólico interactúa con un dispositivo de agitación que causa que gire y, por tanto, facilita el contacto de las bacterias con las sustancias metabólicas presentes en el medio de cultivo o caldo, aumentando su crecimiento y mejorando la mezcla de las sustancias lisantes para romper los glóbulos rojos dentro de los que pueden existir las bacterias.

65 El análisis de los gases, en particular CO₂ y/u O₂, presentes en la muestra volátil, usando un microcromatógrafo de gases 22, permite obtener un resultado muy rápidamente, por ejemplo, de 5 a 40 segundos.

En una realización, el método también puede aplicarse con tipos particulares de tubos de ensayo de vacío 12.

De esta manera, es posible tomar la muestra biológica 14 directamente de un sistema para retirar líquidos biológicos, por ejemplo, sangre, directamente del paciente.

5 De acuerdo con una realización variante, si llegara a ser necesario, el método 10 puede proporcionar una etapa de detección de la presión dentro del tubo de ensayo 12. De esta manera, es posible detectar un parámetro adicional para identificar la clase o especie de bacterias presentes en la muestra biológica.

10 Por ejemplo, es posible medir y detectar las especies gaseosas presentes en el espacio vacío 18, producidas por el catabolismo bacteriano, y al mismo tiempo medir la variación total en la presión en el tubo de ensayo 12 mediante un detector miniaturizado.

15 Está claro que pueden hacerse modificaciones y/o adiciones de partes al método 10 y la unidad de detección 22 como se describe hasta ahora, sin alejarse del campo y alcance de la presente invención. Está claro también que, aunque la presente invención se ha descrito con referencia a algunos ejemplos específicos, un experto en la materia ciertamente será capaz de conseguir muchas otras formas equivalentes del método 10 y la unidad de detección 22, que tendrán las características como se expone en las reivindicaciones y, por tanto, entrarán todas dentro del campo de protección definido por las mismas.

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar actividad bacteriana en una muestra biológica (14), en particular, pero no únicamente, muestras de sangre, **caracterizado por que** proporciona:
- 5
- introducir la muestra biológica (14) en un tubo de ensayo cerrado y esterilizado (12);
 - definir un espacio vacío (18) para la acumulación de gas dentro de dicho tubo de ensayo (12) y por encima de la muestra biológica (14);
 - tomar una muestra volátil de dicho espacio vacío;
- 10
- analizar el contenido de las sustancias gaseosas inorgánicas, tales como, en particular, CO₂, H₂ y/u O₂ presentes en dicha muestra volátil mediante un microcromatógrafo de gases (22) con un flujo adecuado para detectar la presencia de sustancias inorgánicas generadas por el metabolismo bacteriano en dicha muestra biológica (14) en un intervalo comprendido entre 1 ppm y 10 ppm, realizándose dicha detección de las sustancias inorgánicas en un flujo continuo a diversos tiempos de muestreo para obtener una curva de crecimiento que se refiere a las sustancias inorgánicas medidas tanto con CO₂ creciente como con O₂ decreciente.
- 15
2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado por que** proporciona tomar una muestra volátil del espacio vacío (18) y al mismo tiempo medir la variación total en la presión en el tubo de ensayo (12) mediante un detector.
- 20
3. Método según cualquier reivindicación anterior en este documento, **caracterizado por que** proporciona:
- tomar una muestra volátil de dicho espacio vacío (18) introduciendo una aguja (24) en el tubo de ensayo (12) a través de un tapón (16);
 - reintroducir la cantidad de muestra volátil tomada del tubo de ensayo (12) en el tubo de ensayo (12) usando una segunda aguja (24) conectada a un miembro de introducción (33) para permitir la recirculación del volumen gaseoso presente en el espacio vacío (18).
- 25
4. Método según cualquier reivindicación anterior, **caracterizado por que** proporciona realizar, mediante dicho microcromatógrafo de gases (22), una medición dinámica de las sustancias gaseosas presentes en dicho espacio vacío (18), en uno o más intervalos de tiempo determinados, para obtener una dinámica de crecimiento de las sustancias gaseosas inorgánicas individuales presentes en dicho espacio vacío (18).
- 30
5. Método según las reivindicaciones 3 o 4, **caracterizado por que**, después de tomar cada muestra volátil, proporciona reintroducir la muestra volátil en dicho espacio vacío, y realizar una nueva medición en secuencia, para detectar si el componente orgánico dentro de la misma aumenta o es constante a lo largo del tiempo.
- 35
6. Método según cualquier reivindicación anterior, **caracterizado por que** proporciona introducir un medio de cultivo o caldo junto con la muestra biológica (14) dentro del tubo de ensayo (12).
- 40
7. Método según cualquier reivindicación anterior 1 a 5, **caracterizado por que** proporciona la introducción exclusiva de la muestra biológica nativa (14) dentro del tubo de ensayo (12).
- 45
8. Método según cualquier reivindicación anterior, **caracterizado por que** proporciona introducir sustancias adyuvantes en dicho tubo de ensayo (12), adecuadas para acelerar la replicación bacteriana.
9. Método según la reivindicación 8, **caracterizado por que** dichas sustancias adyuvantes son hidrocarburos, tales como metano, etano, propano o sustancias similares o comparables.
- 50
10. Método según la reivindicación 8, **caracterizado por que** proporciona el uso de sustancias lisantes que pueden aumentar la presencia y/o la capacidad de detección de las bacterias en dicha muestra biológica (14), pudiendo dichas sustancias lisantes aumentar la detección de bacterias dentro de los glóbulos rojos.
- 55
11. Método según cualquier reivindicación, **caracterizado por que** proporciona introducir un elemento magnético para agitar la muestra biológica (14).
12. Método según cualquier reivindicación, **caracterizado por que** proporciona introducir dicha muestra biológica (14) en un tubo de ensayo (12) al vacío, para tomar la muestra biológica (14) directamente de un paciente.
- 60
13. Método según cualquier reivindicación anterior, **caracterizado por que** se introducen sustancias secuestrantes de posibles sustancias antibióticas dentro de una muestra biológica (14) o un cultivo bacteriano (26).
14. Método según cualquier reivindicación, **caracterizado por que** proporciona detectar la presión presente en el tubo de ensayo (12).

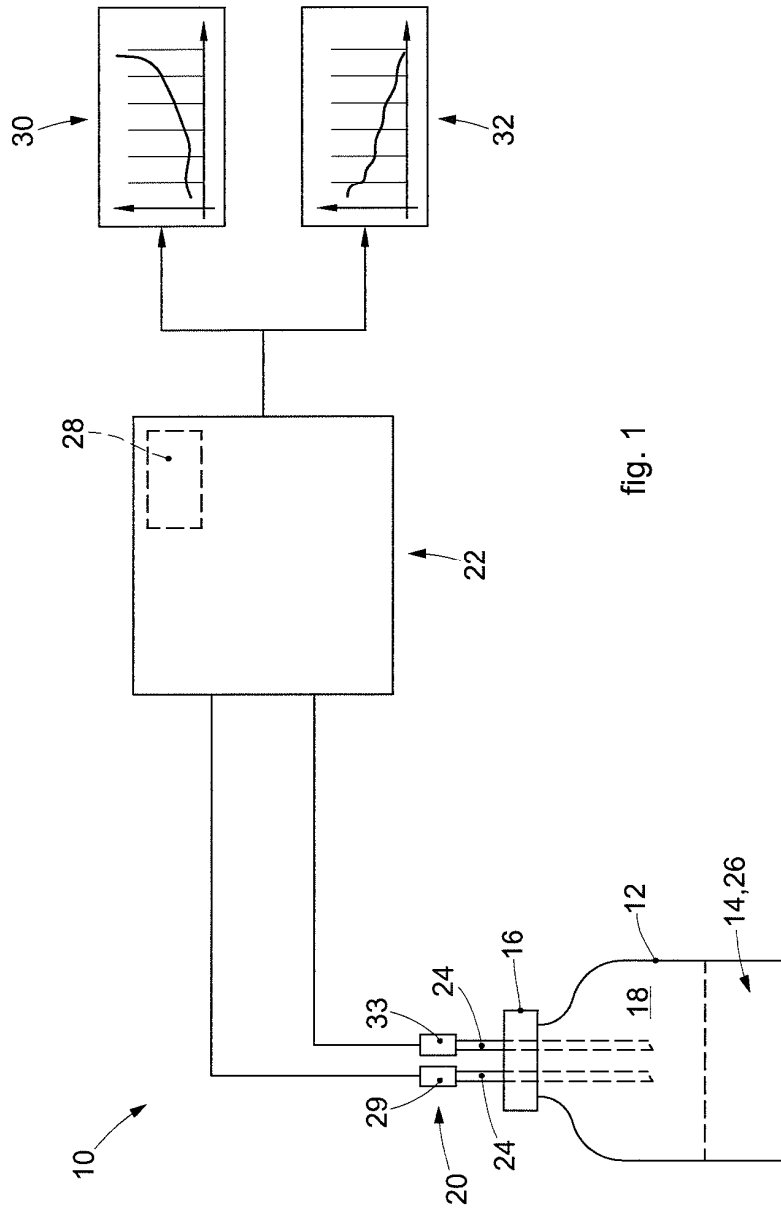


fig. 1