

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 968 874**

51 Int. Cl.:

G01N 15/12 (2006.01)

C12Q 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2019** **PCT/GB2019/052593**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2020** **WO20058682**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2019** **E 19772813 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2023** **EP 3853585**

54 Título: **Métodos de citometría de flujo de impedancia**

30 Prioridad:

17.09.2018 GB 201815122

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
14.05.2024

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF SOUTHAMPTON (50.0%)
Highfield
Southampton, Hampshire SO17 1BJ, GB y
THE UNIVERSITY OF WESTERN AUSTRALIA
(50.0%)

72 Inventor/es:

MORGAN, HYWEL;
SPENCER, DANIEL;
INGLIS, TIMOTHY JOHN JAY;
PATON, TEAGAN y
MULRONEY, KIERAN

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 968 874 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

Métodos de citometría de flujo de impedancia

5 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a métodos de citometría de flujo de impedancia, por ejemplo, el uso de citometría de flujo de impedancia para determinar la sensibilidad antimicrobiana.

10 La resistencia antimicrobiana (AMR) es la capacidad de un microorganismo para evitar, modificar o adaptarse a los efectos adversos de un agente antimicrobiano utilizado contra él. De particular preocupación es el aumento y la propagación global de bacterias resistentes, que ahora se reconoce como una amenaza principal para la salud y la riqueza de la población mundial. Cuando se sospecha una infección, un médico a menudo prescribe inmediatamente agentes antimicrobianos con el objetivo de proporcionar rápidamente un tratamiento eficaz. Sin embargo, en muchos casos los
15 agentes antimicrobianos no son necesarios o son inapropiados para el organismo causante de la infección en particular. Un problema notable es el tratamiento de infecciones bacterianas con agentes antimicrobianos que son ineficaces debido a la presencia de mecanismos de resistencia. Esto puede significar que la infección puede persistir, aumentar en gravedad y posiblemente propagarse a otros pacientes. Una razón principal para la prescripción rápida de agentes antimicrobianos potencialmente ineficaces es que las pruebas de laboratorio para verificar los rasgos de resistencia a los antimicrobianos son demasiado lentas para ser útiles para informar la prescripción de antimicrobianos cuando el paciente se presenta inicialmente para el tratamiento.

Típicamente, las pruebas de sensibilidad antimicrobiana miden el crecimiento microbiano en presencia de agentes antimicrobianos en cultivos líquidos o en placas de agar sólido. Una prueba común conocida como prueba de difusión en disco (o variaciones cuantitativas de este principio de prueba llamado Etests) requiere que un cultivo microbiano crezca
25 durante la noche para obtener una muestra que después se coloca en una placa de agar. Los discos o tiras que contienen concentraciones conocidas de agentes antimicrobianos se colocan en la placa de agar, y la inhibición del crecimiento microbiano cerca de los discos o tiras que contienen agentes antimicrobianos se mide después de un largo período de incubación. El método de microdilución en caldo mide el crecimiento de microorganismos en cultivos líquidos con diferentes concentraciones de agentes antimicrobianos para determinar la concentración antimicrobiana a la que se inhibe el crecimiento microbiano (conocida como concentración inhibidora mínima o MIC). El método MIC de microdilución de caldo se puede realizar utilizando equipos de laboratorio automatizados. Estos ensayos convencionales miden el crecimiento de poblaciones de microorganismos a lo largo del tiempo y tardan muchas horas en realizarse. Por lo tanto, los resultados no se pueden utilizar para informar o guiar la prescripción en las primeras etapas de la infección, cuando esa orientación es más importante.

Como alternativa a estas pruebas convencionales que miden poblaciones de microorganismos, se ha demostrado que el análisis de las propiedades ópticas de microorganismos individuales expuestos a agentes antimicrobianos se correlaciona estrechamente con la sensibilidad antimicrobiana medida con las pruebas convencionales, pero dentro de una ventana
40 de tiempo más corta de menos de una hora [1]. Comúnmente, una población de microorganismos se expone a un agente antimicrobiano durante un período de tiempo fijo, típicamente treinta minutos. Después, los microorganismos se lavan mediante centrifugación para eliminar el agente antimicrobiano y se tiñen con un tinte fluorescente específico permeable a membrana que se puede usar para indicar la sensibilidad al agente. Las propiedades ópticas de los microorganismos se miden con un citómetro de flujo óptico, que detecta la luz dispersada de los microorganismos en una dirección directa que indica el tamaño de partícula y una señal de fluorescencia correspondiente a los microorganismos. Los datos ópticos se comparan con los datos obtenidos de una población de la misma muestra de microorganismo, también teñida con tinte pero que no ha sido expuesta al agente antimicrobiano. Las diferencias en los datos de las dos muestras indican si los microorganismos son susceptibles al agente. Además, la exposición de las muestras a una serie de diferentes concentraciones antimicrobianas se utiliza para determinar una dosis mínima necesaria de agente antimicrobiano para inhibir eficazmente el crecimiento microbiano. La citometría óptica tiene una serie de inconvenientes. El uso de tintes generalmente requiere uno o más pasos de lavado en el procedimiento, lo que limita el alcance para miniaturizar y automatizar el procedimiento de prueba. La eliminación del agente antimicrobiano mediante lavado antes de la adición del tinte suspende el tratamiento antimicrobiano en ese momento, evitando así las mediciones continuas de los efectos antimicrobianos en una sola muestra a lo largo del tiempo. Los citómetros ópticos son voluminosos y muy costosos, y requieren técnicas de manipulación como el enfoque hidrodinámico y/o acústico para posicionar correctamente los microorganismos dentro de una zona de análisis óptico. Los tintes fluorescentes también son costosos. Por lo tanto, la citometría óptica no es adecuada para el análisis de la sensibilidad antimicrobiana en el punto de necesidad. El documento EP 3266878 describe una técnica de citometría óptica de fluorescencia.

60 El documento WO 2014/170626 describe un método para medir eléctricamente las propiedades eléctricas de partículas individuales que fluyen en un líquido.

Por lo tanto, se requieren nuevos enfoques capaces de aumentar la velocidad y reducir el costo del análisis de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana y, por lo tanto, guiar la prescripción antimicrobiana apropiada.

65

Breve descripción de la invención

Los aspectos y realizaciones se establecen en las reivindicaciones adjuntas.

De acuerdo con un primer aspecto de determinadas realizaciones descritas en la presente, se proporciona un método de prueba de sensibilidad de agentes antimicrobianos que comprende: preparar muestras de microorganismos suspendidos en un electrolito, que comprende una primera muestra de los microorganismos no expuestos a agentes antimicrobianos y una segunda muestra de los microorganismos expuestos a un agente antimicrobiano; pasar la primera muestra a través de un citómetro de flujo de impedancia para obtener una primera señal de impedancia que representa uno o más componentes de los valores de impedancia de los microorganismos no expuestos; pasar la segunda muestra a través del citómetro de flujo de impedancia para obtener una segunda señal de impedancia que representa uno o más componentes de los valores de impedancia de los microorganismos expuestos; comparar la primera señal de impedancia y la segunda señal de impedancia; y determinar una sensibilidad de los microorganismos al agente antimicrobiano con base en cualquier diferencia entre la primera señal de impedancia y la segunda señal de impedancia.

Estos y otros aspectos de determinadas realizaciones se establecen en las reivindicaciones independientes y dependientes adjuntas. Se apreciará que las características de las reivindicaciones dependientes pueden combinarse entre sí y las características de las reivindicaciones independientes en combinaciones distintas a las establecidas explícitamente en las reivindicaciones. Además, el enfoque descrito en la presente no se limita a realizaciones específicas tales como las establecidas a continuación, sino que incluye y contempla cualquier combinación apropiada de características presentadas en este documento. Por ejemplo, se pueden proporcionar métodos de acuerdo con los enfoques descritos en la presente que incluyen una o más de las diversas características descritas a continuación según corresponda.

Breve descripción de las figuras

Para una mejor comprensión de la invención y para mostrar cómo se puede llevar a cabo, ahora se hace referencia a modo de ejemplo a los dibujos adjuntos en los que:

La Figura 1 muestra una vista lateral esquemática en sección transversal de un ejemplo de aparato de citometría de flujo de impedancia;

la Figura 2 muestra una vista lateral esquemática en sección transversal de parte del aparato de la Figura 1;

las Figuras 3 (a) a (c) muestran gráficas de corriente frente al tiempo y corriente diferencial frente al tiempo medidas con el aparato de las Figuras 1 y 2;

la Figura 4 muestra una vista lateral esquemática en sección transversal de una configuración de electrodos y circuitos para un citómetro de flujo de impedancia de acuerdo con un primer ejemplo de una disposición de electrodos alternativa; la Figura 5 (a) a (c) muestra gráficas de la corriente sumada frente al tiempo y la corriente sumada diferencial frente al tiempo medidas mediante un método que utiliza el aparato de la Figura 4;

la Figura 6 muestra una vista lateral esquemática en sección transversal de un electrodo y una configuración de circuitos para un citómetro de flujo de impedancia de acuerdo con un segundo ejemplo;

la Figura 7 muestra una vista lateral esquemática en sección transversal de un electrodo y una configuración de circuitos para un citómetro de flujo de impedancia de acuerdo con un tercer ejemplo;

la Figura 8 muestra una vista lateral esquemática en sección transversal de un electrodo y una configuración de circuitos para un citómetro de flujo de impedancia de acuerdo con otro ejemplo;

las Figuras 9 (a) y (b) muestran representaciones esquemáticas de la interacción de una célula con un campo eléctrico a frecuencias bajas y altas;

las Figuras 10 (a), (b), (c) y (d) muestran ejemplos de gráficos de dispersión de datos de impedancia registrados a partir de muestras de células bacterianas a dos frecuencias con un método de citometría de flujo de impedancia de acuerdo con un ejemplo de la presente descripción, que muestra un efecto antimicrobiano sobre cepas de bacterias susceptibles y resistentes;

las Figuras 11(a) y (b) muestran ejemplos de gráficos de dispersión de datos de impedancia registrados a partir de muestras de células bacterianas a dos frecuencias con un método de citometría de flujo de impedancia de acuerdo con un ejemplo de la descripción, que muestra un efecto adicional del agente antimicrobiano sobre las bacterias susceptibles.

las Figuras 12 (a) y (b) muestran ejemplos de gráficos de dispersión de datos de magnitud y fase de impedancia registrados a partir de muestras de células bacterianas a una frecuencia con un método de citometría de flujo de impedancia de acuerdo con un ejemplo de la presente descripción;

las Figuras 13 (a) y (b) muestran ejemplos de gráficos de dispersión de datos de magnitud y fase de impedancia registrados a partir de muestras de células bacterianas a dos frecuencias con un método de citometría de flujo de impedancia de acuerdo con un ejemplo de la presente descripción;

las Figuras 14 (a) a (f) muestran ejemplos de gráficos de dispersión de datos de impedancia registrados a partir de muestras de células bacterianas a dos frecuencias con un método de citometría de flujo de impedancia de acuerdo con un ejemplo de la presente descripción, que muestra un efecto de diferentes concentraciones de concentraciones antimicrobianas en una cepa bacteriana susceptible;

las Figuras 15(a) a (d) muestran gráficas de la variación de varias características de células bacterianas con concentración de exposición antimicrobiana, obtenidas con un método de citometría de flujo de impedancia de acuerdo con un ejemplo de la presente descripción;

la Figura 16 muestra una secuencia de gráficos de dispersión de datos de impedancia registrados continuamente a lo largo del tiempo a partir de una sola muestra de bacterias expuestas a un agente antimicrobiano utilizando un método de

citometría de flujo de impedancia de acuerdo con un ejemplo de la presente descripción;

la Figura 17 muestra una vista lateral esquemática en sección transversal de una configuración de electrodos y circuitos para un citómetro de flujo de impedancia de acuerdo con un ejemplo con trayectorias de corriente orientadas de manera diferente;

5 la Figura 18 muestra un ejemplo de gráfico de dispersión de datos de magnitud de impedancia obtenidos usando un método de citometría de flujo de impedancia en un aparato tal como el ejemplo de la Figura 17;

la Figura 19 muestra gráficos de barras de poblaciones de células bacterianas tratadas con antibióticos a concentraciones predefinidas para el análisis del punto de corte de la sensibilidad y la resistencia, medidas mediante citometría de flujo de impedancia; y

10 la Figura 20 muestra gráficos de dispersión de datos de impedancia registrados de una variedad de muestras de células bacterianas expuestas a diversos antibióticos a concentraciones de análisis de punto de corte predefinidas junto con un gráfico de barras de las poblaciones celulares correspondientes de cada muestra.

Descripción detallada

15 Los aspectos y características de determinados ejemplos y realizaciones se analizan / describen en la presente. Algunos aspectos y características de ciertos ejemplos y realizaciones pueden implementarse convencionalmente y estos no se exponen / describen en detalle en aras de la brevedad. Por lo tanto, se apreciará que los aspectos y características de los aparatos y métodos descritos en la presente que no se describen en detalle pueden implementarse de acuerdo con cualquier técnica convencional para implementar tales aspectos y características.

20 La difusión en disco, la microdilución en caldo y la citometría de flujo óptica son ejemplos de procedimientos de prueba para determinar la sensibilidad de los microorganismos a los agentes antimicrobianos. Tales pruebas o ensayos pueden denominarse pruebas o comprobación de sensibilidad antimicrobiana (AST). La presente descripción propone el uso de un procedimiento alternativo para este y otros fines utilizando citometría de flujo de impedancia. Esta técnica utiliza un aparato para medir las propiedades eléctricas, específicamente una impedancia dependiente de la frecuencia, de partículas individuales que fluyen en un canal microfluídico. Se ha encontrado que la exposición a agentes antimicrobianos (antimicrobianos, antibióticos) puede alterar las características de impedancia de una suspensión de microorganismos (tales como las bacterias). Se propone el uso de citometría de flujo de impedancia para detectar un cambio en la impedancia de microorganismos individuales que fluyen a través de un canal microfluídico para la determinación de la sensibilidad de los microorganismos a un agente antimicrobiano bajo prueba.

35 Para los fines de la presente descripción, se considera que un agente antimicrobiano o antimicrobiano es cualquier agente que destruye o inhibe el crecimiento de una o más cepas de microorganismos. Ejemplos de antimicrobianos son los antibióticos, antifúngicos y antivirales. Los antibióticos son agentes que matan (bactericidas) o inhiben el crecimiento de bacterias (bacteriostáticas). Un antibiótico puede actuar mediante uno de varios mecanismos diferentes que incluyen, de forma no limitante, interrumpir la síntesis o integridad de la pared celular microbiana, bloquear la traducción de proteínas, prevenir la replicación, reparación o mantenimiento de ácidos nucleicos dentro de la célula, prevenir la síntesis de moléculas esenciales (por ejemplo, ácido fólico, colesterol) y perturbar la estructura de la membrana. Ejemplos de clases de antibióticos son aminoglucósidos, ansamicinas, azoles, carbacefemas, carbapenemas, cefalosporinas, equinocandinas, glucopéptidos, lincosamidas, lipopéptidos, macrólidos, monobactamas, nitrofuranos, oxazolidinonas, penicilinas, pleuromutilina, quinolonas, fluoroquinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprima, aunque no se excluyen otros antibióticos y antimicrobianos. Las cefalosporinas, penicilinas y carbapenémicos pueden coformularse con inhibidores de betalactamasa para mejorar la eficiencia.

45 Para los fines de la presente descripción, se considera que un microorganismo es un organismo microscópico, que puede existir en su forma unicelular o en una colonia de células. Los ejemplos de microorganismos incluyen bacterias, virus y hongos (incluidas levaduras y mohos).

50 La Figura 1 muestra una vista lateral en sección transversal esquemática simplificada de un primer ejemplo de un aparato para citometría de flujo de impedancia, que tiene un formato relativamente simple. El aparato se construye típicamente como un dispositivo microfluídico formado a partir de varias capas depositadas sobre un sustrato y modeladas usando técnicas tales como fotolitografía para formar las estructuras requeridas. El campo de la microfluídica se refiere al comportamiento, control y manipulación de fluidos confinados o restringidos a pequeña escala, típicamente submilimétrica, en otras palabras, a escala micromilimétrica o menor. Los dispositivos microfluídicos contruidos a partir de capas sobre un sustrato con el fin de analizar muestras, en los campos biológico y médico, así como en otras áreas de actividad, a veces se denominan dispositivos "laboratorio en un chip". En el ejemplo de la Figura 1, el dispositivo 10 comprende un canal de flujo microfluídico 12 formado dentro de una capa 14 de material fotorresistente, tal como SU8, un fotorresistente negativo a base de epoxi, que está intercalado entre una capa inferior 16a y una capa superior 16b de un material de vidrio. Las aberturas en la capa de vidrio superior 16a definen una entrada 18 al canal 12 y una salida 20 del canal 12. Se puede suministrar una muestra de fluido 22 en el canal 12 en la entrada 18 para el flujo a lo largo del canal 12 (indicado por flechas punteadas en la Figura 1) a la salida 20 donde se retira o expulsa como un producto de desecho 24 o se recoge para su posterior análisis. La muestra 22 se puede proporcionar en el canal 12 mediante cualquier método conveniente, tal como inyección en la entrada 18 desde una jeringa 26. Se puede usar o no un flujo de vaina para centrar las partículas dentro del orificio u orificio del canal. Se pueden utilizar otros mecanismos para enfocar las partículas en el flujo, como técnicas de dielectroforesis, acústicas, inerciales o viscoelásticas.

- La muestra 22 comprende partículas, que pueden ser células, bacterias, microorganismos u otras partículas biológicas (tales como algas, exosomas, virus o vesículas) o partículas no biológicas (tales como gotitas, perlas, coloides, polvo o fragmentos metálicos), dependiendo de la naturaleza de la prueba que se está llevando a cabo, suspendidas en un electrolito (fluido electrolítico). Para las AST, las partículas son microorganismos que han estado expuestos o no a un agente antimicrobiano. Para acomodar el paso de las células, el canal puede tener una sección transversal en la dirección transversal a la dirección del flujo (de entrada a salida) que mide alrededor de 40 μm de alto y alrededor de 40 μm de ancho. De manera más general, las dimensiones del canal pueden estar en el rango de 1 a 100 μm . La sección transversal puede o no ser cuadrada.
- El dispositivo 10 además comprende un primer y un segundo par de electrodos fabricados en las paredes inferior y superior del canal 12. Cada par de electrodos comprende un electrodo de voltaje 30 y un electrodo de medición 32. En el ejemplo ilustrado de la Figura 1, el electrodo de voltaje 30 está en la pared superior del canal 12 y el electrodo de medición 32 está en la pared inferior del canal 12, pero estas posiciones pueden invertirse. El primer par de electrodos está ubicado en una posición aguas arriba en el canal 12, y el segundo par de electrodos está ubicado en una posición aguas abajo, de modo que las partículas en la muestra fluyen más allá del primer par de electrodos antes del segundo par de electrodos. Los electrodos pueden tener dimensiones del orden de 1 a 100 μm , como de 10 a 40 μm para analizar microorganismos y bacterias, aunque también son posibles tamaños más grandes o más pequeños dependiendo del tamaño del canal.
- Los electrodos de voltaje 30 se accionan con una única fuente de voltaje 34 que puede generar uno o más componentes de frecuencia f_1 , f_2 , f_3 ... Por lo tanto, ambos electrodos de voltaje 30 proporcionan el mismo voltaje, aproximadamente igual en magnitud, frecuencia y fase. Los dos electrodos 30, 32 en cada par proporcionan o definen una trayectoria de corriente a través del canal de flujo 12 desde el electrodo de voltaje 30 al electrodo de medición 32, en presencia del fluido electrolítico de una muestra 22 que fluye en el canal de flujo 12. La corriente que fluye en estas trayectorias de corriente se detecta en los electrodos de medición 32. La corriente I1 detectada en el primer electrodo de medición y la corriente I2 detectada en el segundo electrodo de medición se pasan cada una a un convertidor de corriente a voltaje separado 34. Las salidas de los convertidores se pasan a un amplificador diferencial 36 para obtener una señal diferencial que representa la diferencia entre las corrientes en los dos caminos de corriente, a saber, $I_2 - I_1$ (o $I_1 - I_2$ si se prefiere). Otros componentes electrónicos (circuitos, un amplificador de bloqueo 38, un procesador 40, por ejemplo), reciben la señal diferencial y determinan a partir de ella una medición de impedancia. Esta salida o señal de impedancia puede separar las mediciones de impedancia de acuerdo con los componentes real (Re) e imaginario (Im), o los componentes de magnitud $|Z|$ y fase θ , según se prefiera. Las partículas que pasan entre los electrodos de un par de electrodos alterarán la corriente detectada en el electrodo de medición, que se refleja en la señal de impedancia final. Por lo tanto, la presencia de una partícula y las características de la partícula se pueden deducir de la señal de impedancia.
- La inclusión de dos pares de electrodos proporciona dos corrientes medibles y permite el modo de funcionamiento diferencial mencionado anteriormente, para reducir el ruido y los artefactos. El propósito de la señal diferencial se puede entender con referencia a las Figuras 2 y 3.
- La Figura 2 muestra una vista esquemática ampliada de parte del dispositivo de la Figura 1, que incluye los dos pares de electrodos, dispuestos a través del canal de flujo 12. Una partícula 42, que será un microorganismo en un procedimiento de las AST, se suspende en fluido que fluye a lo largo del canal 12. La Figura 3 muestra gráficos de la corriente detectada a lo largo del tiempo durante una medición de impedancia. La Figura 3(a) muestra la corriente I1 detectada por el primer electrodo de medición 32a. La Figura 3(b) muestra la corriente I2 detectada por el segundo electrodo de medición 32b. La Figura 3(c) muestra la señal diferencial obtenida del amplificador diferencial (u otro circuito capaz de determinar una señal de diferencia), que representa la diferencia entre las dos corrientes, $I_2 - I_1$.
- En un momento t_0 , la partícula 42 está en el canal pero aún no se ha encontrado con los electrodos. Por lo tanto, ambos electrodos de medición 32a, 32b detectan sustancialmente la misma corriente, distinta de cero, ya que se suministra la misma tensión (nominalmente) a ambas trayectorias de corriente. Por lo tanto, la señal diferencial es sustancialmente cero. En un momento posterior t_1 , la partícula 42 pasa entre los electrodos 30a, 32a del primer par de electrodos. Impide el flujo de corriente en la primera ruta de corriente, y la I1 detectada se reduce, como se muestra en la Figura 3(a). La segunda corriente I2 no se ve afectada en gran medida por la partícula 42. Por lo tanto, la señal diferencial $I_2 - I_1$ se vuelve positiva a medida que la partícula 42 pasa por el primer par de electrodos 30a, 32a, como se muestra en la Figura 3(c). Después, en el tiempo t_2 , la partícula se encuentra en un punto intermedio después del primer par de electrodos 30a, 32a y antes del segundo par de electrodos 30b, 32b, por lo que ambas corrientes son de nuevo aproximadamente iguales y la señal diferencial vuelve a cero. En el tiempo t_3 , la partícula 42 alcanza el segundo par de electrodos 30b, 32b e impide el flujo de corriente en la segunda ruta de corriente. Por lo tanto, en t_3 , la primera corriente I1 tiene su valor completo (ver Figura 3(a)), la segunda corriente I2 tiene un valor reducido (ver Figura 3(b)), y la señal diferencial se vuelve negativa (ver Figura 3(c)). En el tiempo t_4 , la partícula 42 ha fluido fuera de la región o zona de medición definida por los electrodos, ninguna trayectoria de corriente se ve afectada por la partícula 42, y la señal diferencial es nuevamente cero. Se puede llevar a cabo un procesamiento adecuado de la señal diferencial para deducir la impedancia de la partícula. El tamaño, la estructura, la forma y la composición de la partícula determinan sus propiedades de impedancia y, por lo tanto, el efecto que tiene sobre la corriente en las trayectorias de corriente definidas por los pares de electrodos y sobre la señal diferencial. La exposición de un microorganismo a un agente antimicrobiano al que el microorganismo es susceptible modificará el tamaño, la estructura, la forma y/o la composición del microorganismo, de modo que se alteren sus propiedades de impedancia. Esto se refleja en la señal diferencial. Por consiguiente, la comparación de la señal diferencial,

o la señal de impedancia derivada de la señal diferencial, de una muestra de microorganismos que ha sido expuesta a un agente antimicrobiano con la de una muestra de microorganismos que no ha sido expuesta al agente antimicrobiano puede indicar si los microorganismos tienen alguna sensibilidad a ese agente. Por lo tanto, las AST se pueden lograr utilizando citometría de flujo de impedancia. Ciertas propiedades celulares que son modificadas por el tratamiento antimicrobiano muestran una respuesta dependiente de la frecuencia, por lo que la utilización de un voltaje con componentes de frecuencia única o múltiple adecuados y el procesamiento de la señal diferencial para extraer la respuesta de impedancia a diferentes frecuencias pueden revelar información adicional sobre la sensibilidad. La citometría de flujo de impedancia ofrece ventajas sobre otras técnicas las AST. Por ejemplo, es mucho más rápido que la difusión en disco y la microdilución en caldo AST y no requiere un conocimiento *a priori* del microorganismo. Además, el método no requiere la adición de tintes costosos que se usan con frecuencia para la citometría óptica, ni se necesitan pasos de lavado después de exponer los microorganismos a antimicrobianos, por lo que la citometría de flujo de impedancia puede ser más barata y rápida que otras técnicas las AST. También se puede realizar en presencia del agente antimicrobiano para que se puedan determinar los cambios dependientes del tiempo.

Las corrientes en las dos trayectorias de corriente están típicamente en el rango de 1 a 10 mA, dependiendo de la conductividad del electrolito en suspensión, las dimensiones del canal y los electrodos, y la señal de voltaje aplicada. Sin embargo, el cambio en la corriente producida por una partícula que pasa del tamaño de una célula de microorganismo o bacteria (que es más pequeña que una célula de mamífero) está en el intervalo de aproximadamente 1 μ A a 1 nA, es decir, entre aproximadamente mil y un millón de veces más pequeña (tenga en cuenta que las gráficas actuales en las Figuras 3(a) a (c) no están a escala). Por lo tanto, la señal diferencial tiene una magnitud pequeña y es relativamente susceptible al ruido. Para maximizar la relación señal-ruido de la señal diferencial, la tensión aplicada a los electrodos de tensión puede ser lo más alta posible y se puede maximizar la ganancia en los convertidores de corriente a tensión. Sin embargo, a medida que aumenta el voltaje aplicado, cada uno de I1 y I2 aumenta proporcionalmente, y esto conduce a un recorte en los convertidores de corriente a voltaje y el amplificador diferencial. En general, las corrientes distintas de cero limitan el voltaje máximo y la ganancia que se puede utilizar, lo que a su vez limita la sensibilidad del dispositivo. Otro enfoque para medir microorganismos con citometría de flujo de impedancia es reducir el tamaño del canal para acortar las trayectorias de corriente entre los electrodos, de modo que los microorganismos de pequeño tamaño tengan un impacto proporcionalmente mayor en la corriente detectada (ya que el tamaño de los microorganismos en relación con el tamaño del canal es mayor). Sin embargo, los canales más estrechos son propensos a bloqueos y también aumentan la contrapresión en el canal, ya que esto se escala con la cuarta potencia del tamaño del canal.

Por consiguiente, un citómetro de flujo de impedancia como el ejemplo de la Figura 1 tiene algunas limitaciones al medir partículas de un tamaño pequeño, como microorganismos y muestras bacterianas con el propósito de las AST. Sin embargo, se pueden obtener datos útiles de las AST. El flujo microfluídico a través de los electrodos permite la detección y medición de microorganismos individuales, de modo que se puede lograr el recuento de microorganismos, y se pueden obtener y analizar datos para partículas individuales dentro de una población de microorganismos en una muestra para la población total. Varias técnicas de medición las AST se describen con más detalle a continuación con respecto a otros ejemplos de citómetros de flujo de impedancia; estos también se pueden llevar a cabo con un aparato como el de la Figura 1 u otro aparato de citometría de flujo de impedancia.

La presente descripción describe ejemplos de un diseño alternativo para un citómetro de flujo de impedancia que puede ofrecer una sensibilidad y un rendimiento mejorados. Se puede utilizar en métodos para medir con precisión muestras que comprenden partículas pequeñas tales como bacterias y/o células, (o de hecho, cualquier partícula biológica o no biológica) en canales de gran diámetro (aunque no se excluyen los tamaños de canal más pequeños). El dispositivo comprende electrodos dispuestos para crear trayectorias de corriente a través de un canal microfluídico, donde los electrodos están configurados y accionados para proporcionar una sensibilidad de medición mejorada. Por lo tanto, la citometría de flujo de impedancia se puede utilizar las AST y otras mediciones, pruebas y ensayos en partículas bacterianas y otras partículas biológicas y no biológicas. Sin embargo, el aparato tiene una aplicación mucho más amplia y puede usarse para obtener información de impedancia sobre cualquier tipo de partícula que pueda suspenderse en un fluido electrolítico para fluir en un canal más allá de los electrodos configurados adecuadamente.

La Figura 4 muestra una vista lateral esquemática en sección transversal de un canal de flujo con electrodos de acuerdo con una disposición de ejemplo. El canal y los electrodos se pueden incorporar en una estructura de chip microfluídico tal como la que se muestra en la Figura 1, aunque se pueden usar otras estructuras y configuraciones en su lugar. El canal 12 tiene, en este ejemplo, un total de ocho electrodos asociados. Cada electrodo está en una superficie interna de un canal de flujo 12 de modo que esté en contacto con el fluido de muestra que fluye en el canal de flujo 12. Alternativamente, los electrodos podrían separarse finamente del fluido de muestra electrolítico.

Los electrodos están configurados como un primer grupo de electrodos 50 y un segundo grupo de electrodos 52. Los electrodos están configurados como electrodos de señal para aplicar una señal eléctrica (corriente o voltaje) o electrodos de medición, dispuestos en pares para proporcionar trayectorias de corriente a través del fluido que fluye en el canal 12. Cada uno del primer grupo de electrodos 50 y el segundo grupo de electrodos 52 proporciona una primera trayectoria de corriente desde un electrodo de señal a un electrodo de medición, y una segunda trayectoria de corriente desde un electrodo de señal diferente a un electrodo de medición. En el presente ejemplo, cada uno de estos electrodos es un elemento separado. Por lo tanto, cada grupo de electrodos comprende cuatro electrodos y el dispositivo comprende un total de ocho electrodos. El primer grupo de electrodos 50 comprende un primer electrodo de señal 60a por encima del

canal 12 que forma una primera trayectoria de corriente I3 con un primer electrodo de medición 62a por debajo del canal 12, y un segundo electrodo de señal 64a por encima del canal 12 que forma una segunda trayectoria de corriente I4 con un segundo electrodo de medición 66a por debajo del canal 12. El segundo grupo de electrodos 52 comprende un primer electrodo de señal adicional 60b por encima del canal 12 que forma una primera trayectoria de corriente adicional I6 con un primer electrodo de medición adicional 62b por debajo del canal 12, y un segundo electrodo de señal adicional 64b por encima del canal 12 que forma una segunda trayectoria de corriente adicional I7 con un segundo electrodo de medición adicional 66b por debajo del canal 12. En este ejemplo, los electrodos están dispuestos en pares a lo largo de la longitud del canal de flujo, de modo que la segunda trayectoria de corriente adicional está aguas abajo de la primera trayectoria de corriente adicional que está aguas abajo de la segunda trayectoria de corriente que está aguas abajo de la primera trayectoria de corriente.

Dentro del primer grupo de electrodos 50, el primer electrodo de señal 60a se acciona con un primer voltaje +V, que tiene una composición de magnitud, fase y frecuencia especificada (una o más frecuencias). Por el contrario, el segundo electrodo de señal 64a se acciona con un segundo voltaje -V que tiene la misma composición de magnitud y frecuencia que el primer voltaje +V, pero que está desfasado 180° (π radianes) con respecto al primer voltaje.

Los electrodos de señal del segundo grupo de electrodos 52 se accionan con los mismos voltajes que los electrodos de señal correspondientes del primer grupo de electrodos 50. Por lo tanto, el primer electrodo de señal adicional 60b se acciona con +V y el segundo electrodo de señal adicional se acciona con -V, donde las magnitudes y frecuencias son idénticas a los voltajes primero y segundo del primer grupo de electrodos 50. En el ejemplo de la Figura 4, esto se logra suministrando el primer electrodo de señal 60a y el primer electrodo de señal adicional 60b desde una primera fuente de voltaje 70 que produce +V, y suministrando el segundo electrodo de señal 64a y el segundo electrodo de señal adicional 64b desde una segunda fuente de voltaje separada 72 que produce -V.

Tenga en cuenta que no es esencial que la magnitud y las frecuencias sean absolutamente idénticas, y en condiciones del mundo real es probable que ocurran algunas pequeñas diferencias. Por lo tanto, los términos tales como "igual" e "idéntico" en este contexto no son limitantes, y pretenden incluir disposiciones en las que las características de voltaje son similares o aproximadamente, sustancial o nominalmente iguales, por ejemplo, dentro de límites que el experto entenderá que son aceptables para lograr una señal de salida significativa como se describe en la presente.

Del mismo modo, una diferencia de fase de precisamente 180° no es esencial, y las fases pueden diferir en otras cantidades en la región de 180° . Por consiguiente, se puede considerar que las fases de los dos voltajes son "opuestas", donde esto pretende incluir disposiciones en las que la diferencia de fase es cercana o aproximada, sustancial o nominalmente de 180° (π radianes), dentro de los límites que el experto entenderá que son aceptables para lograr una señal de salida significativa como se describe en la presente.

En este ejemplo, los electrodos de señal se accionan a voltajes especificados desde fuentes de voltaje, por lo que podrían considerarse electrodos de voltaje. En otros ejemplos, los electrodos de señal pueden accionarse a corrientes específicas desde fuentes de corriente. Por consiguiente, el término "electrodo de señal" pretende incluir ambas alternativas, de modo que estos electrodos proporcionen señales eléctricas con una diferencia de frecuencia, magnitud y fase como se describe y que puede ser una señal de voltaje o una señal de corriente. En cualquiera de los diversos ejemplos, las fuentes de voltaje y los electrodos de voltaje pueden sustituirse por fuentes de corriente y electrodos de corriente, o viceversa. De manera similar, la aplicación de un voltaje puede entenderse más generalmente como la aplicación de una "señal eléctrica", que puede ser un voltaje o una corriente dependiendo de la elección de la fuente eléctrica.

Los electrodos de medición están configurados con circuitos que producen una señal diferencial que indica la diferencia entre las mediciones del primer grupo de electrodos 50 y el segundo grupo de electrodos 52. Como se muestra en la Figura 4, esto se implementa en el presente ejemplo sumando o combinando la corriente I3 detectada en la primera trayectoria de corriente (por el primer electrodo de medición 62a) con la corriente I4 detectada en la segunda trayectoria de corriente (por el segundo electrodo de medición 66a), para producir una señal sumada I5. Esta primera señal sumada I5, del primer grupo de electrodos, se pasa a un convertidor de corriente a voltaje 34a. De manera similar, la corriente I6 detectada en la primera trayectoria de corriente adicional (por el primer electrodo de medición adicional 62b) se suma o combina con la corriente I7 detectada en la segunda trayectoria de corriente adicional (por el segundo electrodo de medición adicional 66b) para producir una señal sumada I8. Esta segunda señal sumada I8, del segundo grupo de electrodos, se pasa a un convertidor de corriente a voltaje 34b. Tenga en cuenta que, en una disposición alternativa, la circuitería podría configurarse para implementar las conversiones de corriente a voltaje antes de la suma o combinación. En cualquier caso, la primera señal sumada I5, que representa la suma del flujo de corriente en la primera y segunda trayectorias de corriente del primer grupo de electrodos 50, y la segunda señal sumada I8, que representa la suma del flujo de corriente en la primera y segunda trayectorias de corriente del segundo grupo de electrodos 52, se pasan a circuitos adicionales configurados para determinar una señal diferencial que representa la diferencia entre la primera señal sumada y la segunda señal sumada. En el ejemplo de la Figura 4, esto comprende un amplificador diferencial 36. Después, la señal diferencial se puede procesar utilizando circuitos o electrónica de procesamiento adecuados, para calcular a partir de la señal diferencial una señal de impedancia que indica las propiedades o características de impedancia del fluido de muestra, que necesariamente incluye las propiedades o características de impedancia de cualquier partícula en el fluido de muestra. A partir de esto, los efectos de un agente antimicrobiano sobre los microorganismos en el fluido de muestra se pueden identificar por comparación con las mediciones de impedancia de muestras de los mismos microorganismos.

no tratados con agentes antimicrobianos, o tratados con diferentes tipos o cantidades de agente antimicrobiano. Por ejemplo, la señal diferencial puede introducirse en un procesador configurado para procesar la señal diferencial con el fin de determinar señales de impedancia, valores de impedancia, propiedades de impedancia y características de fluido y/o células, y/o recuentos de células, como se describe en la presente y más adelante. La circuitería y el procesamiento se pueden implementar con cualquier configuración o combinación adecuada de *hardware*, *firmware* y *software*, incluidas conexiones eléctricas simples, puertas lógicas, amplificadores y unidades centrales de procesamiento. Se puede usar un solo procesador o electrónica o circuitos de procesamiento similares para manejar múltiples señales diferenciales, por ejemplo, obtenidas de múltiples canales de flujo con electrodos asociados que se pueden implementar en un solo sustrato o chip. Un aparato configurado de esta manera permite obtener mediciones simultáneas simplemente para múltiples muestras. En el contexto de las pruebas de microorganismos, esto puede permitir que una muestra de referencia de microorganismos no tratados se mida al mismo tiempo que una muestra tratada, o que múltiples muestras de un microorganismo particular se prueben con diferentes agentes antimicrobianos, o que múltiples muestras de un microorganismo particular se prueben con diferentes concentraciones del mismo agente antimicrobiano para determinar la llamada concentración inhibitoria mínima. La derivación de la señal diferencial se puede entender a partir de la Figura 5, que muestra gráficos de corriente frente al tiempo para las dos señales sumadas (a) y (b), y la señal diferencial correspondiente (c).

La Figura 4 muestra una partícula 42, tal como una célula bacteriana, en el canal de flujo 12 en una posición en la que está aguas arriba del primer grupo de electrodos 50, y a punto de entrar en una región de medición definida por los electrodos. En el tiempo t_5 , la partícula 42 ha pasado todos los electrodos y ha salido de la región de medición. Los gráficos de la Figura 5 muestran las diversas señales en t_0 y los tiempos posteriores t_1 a t_4 antes de t_5 . Por conveniencia y simplicidad, la muestra de fluido puede tener una concentración celular y una velocidad de flujo a lo largo del canal de fluido que está destinada a proporcionar solo una partícula a la vez en la región de medición, siendo la zona dentro de la cual están presentes los campos eléctricos de los electrodos.

En t_0 , la partícula 42 está fuera de la región de medición y no interactúa con ninguna de las trayectorias de corriente. Por lo tanto, en el primer grupo de electrodos 50, el primer electrodo de medición 62a detecta una corriente I_3 en la primera trayectoria de corriente que es de la misma magnitud pero de fase opuesta a la corriente I_4 en la segunda trayectoria de corriente detectada por el segundo electrodo de medición 66a. Por lo tanto, I_3 y I_4 se cancelan entre sí, y su suma es cero (o aproximadamente cero, dadas las diferencias menores en las señales eléctricas entregadas por los electrodos de señal), dando una primera señal sumada I_5 de cero en t_0 , como en la Figura 5(a). De manera similar, en el segundo grupo de electrodos 52, la corriente I_6 en el primer electrodo de medición adicional 62b es igual pero opuesta a la corriente I_7 en el segundo electrodo de medición adicional 66b, de modo que su suma también es aproximadamente cero, dando una segunda señal sumada I_8 de cero, que se muestra en la Figura 5(b). Por lo tanto, en t_0 , la señal diferencial I_8-I_5 también es cero, como se muestra en la Figura 5(c). Por lo tanto, la señal de "fondo" medida por el aparato, cuando no hay partículas presentes, es sustancialmente de valor cero y se obtiene a partir de la diferencia de dos mediciones de valor cero. Por consiguiente, los voltajes aplicados en los electrodos de voltaje se pueden elevar a un valor alto sin que las señales detectadas experimenten ninguna limitación en los convertidores 34 o el amplificador diferencial 36, por lo que la sensibilidad de medición se puede maximizar dentro de la capacidad de las fuentes de voltaje.

En el tiempo t_1 , la partícula se encuentra entre el primer electrodo de señal 60a y el primer electrodo de medición 62a, por lo que impide el flujo de corriente en la primera ruta de corriente. Por lo tanto, I_3 se reduce. El flujo de corriente I_4 en la segunda ruta de corriente, entre el segundo electrodo de señal 64a y el segundo electrodo de medición 66a, permanece como antes. Por lo tanto, la primera señal sumada I_5 , que es $I_3 + I_4$, también se reduce. La segunda señal sumada I_8 , que es $I_6 + I_7$ del segundo grupo de electrodos, permanece aproximadamente a cero, ya que no hay partículas en ninguno de estos caminos de corriente. Por lo tanto, la señal diferencial I_8-I_5 se vuelve positiva, debido al valor reducido de I_5 . En t_2 , la partícula 42 se ha movido para estar entre el segundo electrodo de señal 64a y el segundo electrodo de medición 66a. La corriente I_3 en la primera ruta de corriente reanuda su valor anterior, y la corriente I_4 en la segunda ruta de corriente se reduce, por la presencia de la partícula 42. Sin embargo, recuerde que el segundo electrodo de señal tiene un voltaje de accionamiento negativo, de modo que la primera señal sumada $I_5 = I_3 + I_4$ se vuelve positiva, como se muestra en la Figura 5(a). La segunda señal sumada I_8 permanece en aproximadamente cero. En consecuencia, la señal diferencial I_8-I_5 se vuelve negativa en t_2 .

En el tiempo t_3 y después más tarde en el tiempo t_4 , la partícula entra en el segundo grupo de electrodos 52, e interactúa con la primera trayectoria de corriente adicional I_6 en t_3 , y después la segunda trayectoria de corriente adicional I_7 en t_4 . Dado que la primera ruta de corriente adicional I_6 tiene el mismo suministro de voltaje que la primera ruta de corriente I_2 , y la segunda ruta de corriente adicional I_7 tiene el mismo suministro de voltaje que la segunda ruta de corriente I_4 , la segunda señal sumada sigue la misma forma en los tiempos t_3 y t_4 que la primera señal sumada mostrada en los tiempos t_1 y t_2 , volviéndose negativa en t_3 y positiva en t_4 . Mientras tanto, la primera señal sumada I_5 permanece cero durante estos tiempos ya que no hay partículas presentes en la parte de la región de medición correspondiente al primer grupo de electrodos. Por lo tanto, en t_3 , la señal diferencial I_8-I_5 se vuelve negativa y después se vuelve positiva en t_4 , como se muestra en la Figura 5(c).

En t_5 , la partícula ha abandonado la región de medición, por lo que las cuatro trayectorias de corriente no se ven perturbadas. Ambas señales sumadas serán sustancialmente cero, dando una señal diferencial de valor cero, como en el tiempo t_0 .

- Observe la forma particular de la curva seguida de la señal diferencial, que se muestra en la Figura 5(c). La disposición secuencial a lo largo de la longitud del canal de los dos grupos de electrodos 50, 52 y los cuatro pares de electrodos con los grupos, junto con la disposición alterna de voltajes positivos y negativos para los electrodos de señal a lo largo de la longitud del canal, proporciona una señal diferencial correspondiente que muestra características positivas, después negativas y después negativas que positivas a lo largo del tiempo, a medida que una partícula pasa a lo largo de la región de medición. Esta forma es más distinta en comparación con el ruido que la señal diferencial del aparato de la Figura 1, por lo que se puede distinguir más fácilmente (utilizando técnicas de procesamiento de señales). Esto mejora la relación señal/ruido, mejorando aún más la sensibilidad.
- La señal diferencial puede calcularse alternativamente como I5-I8, si se prefiere, es decir, la primera señal sumada menos la segunda señal sumada. En cualquier caso, la señal diferencial representa la diferencia entre las señales sumadas, y las propiedades de impedancia de la partícula se pueden determinar a partir de ella. Esto también es aplicable a los ejemplos que se describen más adelante.
- Esta configuración de electrodos (y configuraciones similares que permiten el mismo resultado) y su rendimiento mejorado permiten obtener mediciones de impedancia significativas para partículas pequeñas como las bacterias que fluyen en un canal grande. Esto reduce el riesgo de bloqueos del canal y hace que tal aparato sea más utilizable en entornos y situaciones del mundo real. Las células bacterianas típicamente varían en tamaño de 0,2 a 2 μm . Por "un canal grande", se entiende que las dimensiones del canal en el plano transversal a la dirección del flujo de fluido están en el intervalo de aproximadamente 10 a 50 μm , tal como 20 μm . Como ejemplo, el canal puede tener una sección transversal cuadrada (que surge, por ejemplo, de la construcción y formación en capas con fotolitografía) con un ancho y altura sustancialmente iguales de aproximadamente 40 μm . Alternativamente, el canal puede tener una altura, que es una dimensión ortogonal a un plano del sustrato en el que se forma el aparato y a la dirección del flujo, y paralela a la trayectoria del flujo de corriente desde un electrodo de voltaje a un electrodo de medición, de aproximadamente 10 a 50 μm , tal como aproximadamente 20 μm , siendo la dimensión transversal (anchura) mayor. También se pueden usar otras dimensiones, tales como un canal con una dimensión más pequeña en el intervalo de 100 a 1000 μm adecuado para medir células de aproximadamente 10 μm de ancho, o canales aún más grandes capaces de acomodar partículas en la escala milimétrica.
- Se pueden utilizar otras configuraciones de electrodos para obtener señales iguales o similares a partir de las cuales se pueden deducir las características de impedancia de las partículas en el fluido de muestra. Es posible una variedad de disposiciones que comprenden un primer grupo de electrodos y un segundo grupo de electrodos, cada uno de los cuales proporciona una primera trayectoria de corriente y una segunda trayectoria de corriente accionada a voltajes aproximadamente iguales pero aproximadamente opuestos. Dentro de un grupo, la primera ruta de corriente y la segunda ruta de corriente pueden estar en diferentes ubicaciones a lo largo de la dirección de flujo del canal, como en la Figura 4. El primer grupo de electrodos y el segundo grupo de electrodos también pueden estar en diferentes ubicaciones a lo largo de la dirección de flujo del canal, también como en la Figura 4. Sin embargo, los electrodos de cada grupo no necesitan estar físicamente agrupados y pueden estar dispersos entre los electrodos del otro grupo.
- La Figura 6 muestra un segundo ejemplo, en una vista lateral esquemática en sección transversal que incluye los mismos elementos que la Figura 4. Por lo tanto, se incluyen ocho electrodos, que comprenden cuatro electrodos de señal y cuatro electrodos de medición dispuestos como cuatro pares a través del canal de flujo 12. Sin embargo, en este ejemplo, los electrodos de señal de cada grupo de electrodos se alternan a lo largo del canal de flujo. Por lo tanto, en orden a lo largo del canal de flujo 12, la región de medición comprende en primer lugar el primer electrodo de señal 60a y su primer electrodo de medición 62a para proporcionar la primera trayectoria de corriente I3, en segundo lugar el primer electrodo de señal adicional 60b y su primer electrodo de medición adicional 62b para proporcionar la primera trayectoria de corriente adicional I6, en tercer lugar el segundo electrodo de señal adicional 64b y su segundo electrodo de medición adicional 66b para proporcionar la segunda trayectoria de corriente adicional I7, y por último el segundo electrodo de señal 64a y su segundo electrodo de medición 66a para proporcionar la segunda trayectoria de corriente I4. La primera ruta de corriente I3 y la segunda ruta de corriente I4 se combinan para la primera señal sumada I5, y la primera ruta de corriente adicional I6 y la segunda ruta de corriente adicional I7 se combinan para la segunda señal sumada I8, como antes. La evolución en el tiempo de la señal diferencial para una partícula que atraviesa la región de medición tendrá una forma diferente a la que se muestra en la Figura 5(c): comprenderá características positivas, negativas y positivas en lugar de negativas, pero se puede distinguir del ruido mediante un filtrado y/o procesamiento de señal adecuados.
- Los ejemplos de las Figuras 4 y 6 comprenden fuentes de voltaje separadas (o fuentes de corriente) para suministrar la primera señal eléctrica a los primeros electrodos de señal en cada grupo y la segunda señal eléctrica opuesta a los segundos electrodos de señal en cada grupo. Los electrodos de señal están conectados a un lado de la fuente de voltaje y el otro lado está conectado a tierra.
- La Figura 7 muestra una vista lateral esquemática en sección transversal de un ejemplo alternativo que se simplifica mediante el uso de una única fuente de voltaje para accionar todos los electrodos de señal. Este ejemplo comprende ocho electrodos, colocados igual que en el ejemplo de la Figura 6. Una única fuente de voltaje 71 acciona todos los electrodos de señal. Los primeros electrodos de señal 60a, 60b de cada grupo de electrodos están conectados al lado positivo de la fuente de voltaje 71 para recibir +V, y los segundos electrodos de señal 64a, 64b de cada grupo de electrodos están conectados al lado negativo de la fuente de voltaje 71 para recibir -V.

Como se ha señalado, el aparato puede accionarse utilizando voltajes o corrientes aplicadas a los electrodos de señal. La Figura 8 muestra un aparato de ejemplo configurado como el ejemplo de la Figura 4, pero utilizando fuentes de corriente en lugar de fuentes de voltaje. Por lo demás, los componentes son los mismos, por lo que no se describen en detalle aquí. Una primera fuente de corriente 80 proporciona una corriente con una composición de magnitud, fase y frecuencia a los primeros electrodos de señal 60a, 60b de cada uno del primer y segundo grupos de electrodos 50, 52. Una segunda fuente de corriente 82 proporciona una corriente con sustancialmente la misma magnitud y fase a los segundos electrodos de señal 64a, 64b de cada grupo de electrodos 50, 52, pero que es negativa en comparación con la corriente de la primera fuente de corriente 80 porque tiene una fase opuesta o aproximadamente opuesta (la diferencia de fase entre las dos corrientes es de aproximadamente 180° o π radianes). Los voltajes V1 y V2 que representan las señales sumadas de los electrodos de medición 62a, 66a, 62b, 66b de cada grupo de electrodos 50, 52 se introducen en un amplificador diferencial 36 para permitir que se determine la señal diferencial.

También son posibles otras configuraciones para los electrodos y las trayectorias de corriente resultantes. Típicamente, los electrodos estarán por encima y por debajo del canal de flujo debido a las limitaciones de la fabricación convencional de una estructura microfluidica en capas, pero esto no es esencial para el funcionamiento, y el aparato puede configurarse con electrodos dispuestos alrededor del canal en otras orientaciones. En un ejemplo, los electrodos de señal positiva y negativa se pueden colocar de forma adyacente como en el ejemplo de la Figura 6, pero con los electrodos de medición del primer grupo colocados como los dos electrodos de medición centrales y los electrodos de medición del segundo grupo colocados como los dos electrodos de medición externos, opuestos a la disposición de la Figura 6. Todos los ejemplos hasta ahora han comprendido electrodos de señal en la parte superior del canal de flujo y electrodos de medición en la parte inferior del canal. Sin embargo, esto no es una limitación, y cualquiera de los electrodos puede colocarse en cualquier posición, tal vez de acuerdo con la conveniencia de conectarlos con la(s) fuente(s) de voltaje o corriente (fuentes de señal eléctrica) y la circuitería de medición. Por ejemplo, los electrodos de uno o más pares de electrodo de señal y electrodo de medición pueden estar dispuestos de manera opuesta de modo que el electrodo de medición esté por encima del canal y el electrodo de señal esté por debajo del canal. Además, los electrodos individuales pueden combinarse en electrodos más grandes que realizan la función de dos electrodos individuales, por ejemplo, cuando esos electrodos son físicamente adyacentes. Considerando el ejemplo de la Figura 4, el primer electrodo de medición y el segundo electrodo de medición, en el primer grupo de electrodos, son adyacentes, y el primer electrodo de medición adicional y el segundo electrodo de medición adicional, en el segundo grupo de electrodos, son adyacentes, y aguas abajo del primer y segundo electrodos de medición. Esto permite reemplazar el primer y el segundo electrodo de medición con un solo electrodo combinado que recoge la corriente tanto de la primera trayectoria de corriente como de la segunda trayectoria de corriente, de modo que su salida ya es una señal combinada o sumada del primer grupo de electrodos. De manera similar, el primer electrodo de medición adicional y el segundo electrodo de medición adicional pueden reemplazarse por un solo electrodo combinado que emite la señal sumada que representa la primera y segunda trayectorias de corriente del segundo grupo de electrodos. Los electrodos de señal también se pueden combinar en un solo electrodo más grande. Dentro de un grupo de electrodos como se ha descrito hasta ahora, los electrodos de señal comprenden dos electrodos que aplican señales eléctricas opuestas diferentes (voltaje o corriente) a las dos vías de corriente de ese grupo. Por lo tanto, los electrodos de señal dentro de un grupo no se pueden combinar. Sin embargo, se aplican los mismos voltajes o corrientes (nominalmente) a los electrodos de señal positivos y negativos correspondientes en los dos grupos de electrodos diferentes, lo que da margen para que los electrodos de señal se combinen o compartan entre los grupos de electrodos. Hasta ahora, los ejemplos han comprendido electrodos emparejados para proporcionar trayectorias de corriente que pasan a través del canal de fluido en una dirección aproximadamente transversal a la dirección del flujo de fluido; esto se logra disponiendo los electrodos emparejados en lados opuestos del canal. Sin embargo, esto no es esencial, y las trayectorias de corriente pueden estar situadas de otra manera, en cualquier disposición que permita que las partículas suspendidas interactúen con los campos eléctricos que emanan de los electrodos de voltaje y, por lo tanto, modifiquen el flujo de corriente en las trayectorias de corriente. Por ejemplo, los electrodos pueden estar dispuestos de modo que los electrodos de señal y los electrodos de medición se alternen a lo largo de los lados superior e inferior del canal, pero estén dispuestos opuestos a un mismo tipo de electrodo. Por lo tanto, los electrodos de señal que producen la misma señal eléctrica son opuestos entre sí, y los campos eléctricos se dirigen a lo largo de la dirección de la longitud del canal a los electrodos de medición adyacentes. Tal disposición proporciona trayectorias de corriente que están sustancialmente a lo largo de, o paralelas a, la dirección del flujo de fluido a través del canal. Los electrodos pueden ser planos, lo cual es conveniente en un dispositivo basado en chips fabricado en capas, pero esto no es esencial. Por ejemplo, los electrodos pueden formarse como anillos o collares que rodean secuencialmente el canal, que podría ser de sección transversal circular u ovalada, formado a partir de una tubería o tubo, por ejemplo.

En ejemplos adicionales, se puede aumentar la cantidad de electrodos, para proporcionar trayectorias de corriente adicionales. Esto aumentará la naturaleza distintiva del patrón de la señal diferencial, lo que facilitará el aislamiento del ruido y, por lo tanto, mejorará la sensibilidad. El número de grupos de electrodos se mantiene como dos, y dentro de cada grupo, los electrodos adicionales proporcionan una primera y segunda rutas de corriente adicionales. La señal de impedancia de partículas se puede extraer de las características relacionadas con la altura de los picos y valles en la señal sumada y/o la señal diferencial. Esto se puede lograr midiendo la amplitud de los picos y/o valles, o haciendo coincidir la forma de la señal con las plantillas obtenidas para partículas con características conocidas, por ejemplo. La secuencia de los picos y valles en las señales sumadas y/o la señal diferencial final se puede diseñar eligiendo la secuencia relativa de los electrodos de señal. Se sabe a partir de las matemáticas de procesamiento de señales que algunas formas de señal son más únicas que otras, de modo que se puede obtener una relación señal/ruido mejorada mediante una secuencia apropiada de los electrodos a lo largo del canal de flujo.

Como se expuso, los diversos ejemplos descritos de aparatos de citometría de flujo de impedancia son aplicables a mediciones de muestras de bacterias y microorganismos, como las AST, donde los ejemplos de las Figuras 4 a 8 son particularmente beneficiosos para este propósito en comparación con el ejemplo de la Figura 1 a 3 porque pueden procesar partículas de tamaño pequeño con sensibilidad de medición suficiente para obtener datos significativos. Por lo tanto, los citómetros de flujo de impedancia descritos en la presente y su uso tienen aplicación para mejorar el diagnóstico de infección microbiana y la prescripción de agentes antimicrobianos. Además, en los ejemplos de las Figuras 4 a 8, el canal de flujo del aparato puede tener dimensiones significativamente mayores que los tamaños típicos de células bacterianas, por lo que el aparato de este tipo también es útil para mediciones de muestras de células no bacterianas, que típicamente tienen un tamaño mayor que las células bacterianas, o para muestras mixtas que contienen un rango de tamaños de partícula, y de hecho, para partículas de origen no biológico.

Ahora se describirán varias técnicas y procedimientos de medición de ejemplo que se pueden implementar usando citometría de flujo de impedancia. Las descripciones se hacen con referencia a aparatos tales como los ejemplos de las Figuras 4 a 8, pero en general, estos y métodos similares también se pueden implementar usando un aparato tal como el ejemplo de las Figuras 1 a 3.

La señal diferencial generada por el aparato de citometría de flujo de impedancia tiene una forma particular (cuyos detalles exactos dependen del orden de los diversos electrodos, que se pueden seleccionar para aumentar el carácter distintivo de la forma o patrón de la señal), por lo que a un nivel simple, el aparato se puede utilizar para el recuento de partículas o células. El procesamiento de la señal diferencial puede comprender una simple identificación y recuento de todas las apariciones de la forma particular de la señal que surge del paso de una partícula a través de la región de medición. Esto se puede utilizar para el recuento de células regulares, pero también es aplicable a la identificación de la sensibilidad biológica a los agentes antimicrobianos. Algunos agentes antimicrobianos actúan alterando la integridad estructural de los microorganismos, de modo que si una cepa de microorganismo es susceptible a un agente antimicrobiano de este tipo, la exposición de la muestra al agente antimicrobiano reducirá con el tiempo la población de microorganismos en la muestra. Esto se puede identificar contando el número de microorganismos tratados en una muestra medida con precisión en volumen y comparándolo con el recuento de una muestra de microorganismos no tratados en un punto de tiempo específico o serie de puntos de tiempo. El análisis simple de este tipo puede no requerir ningún cálculo o análisis detallado de los valores reales de impedancia de las partículas en la muestra de fluido; puede que no sea necesario derivar una señal de impedancia de la señal diferencial, o identificar valores de impedancia, propiedades o características de las partículas a partir de la señal de impedancia.

Sin embargo, el análisis de la señal de impedancia puede revelar información valiosa adicional sobre las células y la sensibilidad microbiana a los agentes antimicrobianos en particular. Los métodos de acuerdo con la presente descripción permiten realizar un rango de mediciones basadas en impedancia que pueden revelar información sobre partículas biológicas y no biológicas, que incluyen células y bacterias, de una manera simple y rápida con un número mínimo de etapas.

Las diferentes clases de agentes antimicrobianos tienen diferentes modos de operación y producen diferentes cambios biofísicos en los microorganismos. Como se señaló anteriormente, algunos agentes antimicrobianos alteran la integridad estructural de los microorganismos, reduciendo así el tamaño de la población, que se puede detectar a través de un recuento de partículas en un volumen de muestra preciso. Otros agentes antimicrobianos funcionan inhibiendo la síntesis de la pared celular, lo que puede producir un aumento general en el volumen (tamaño) celular. Las propiedades de la pared celular o de la membrana celular en sí mismas pueden alterarse, tal como un cambio en el espesor, las propiedades eléctricas o del material, o la porosidad, y la estructura o composición celular interna puede cambiar. Estas diversas características (tamaño de la célula, propiedades de la pared/membrana celular, propiedades internas) contribuyen a las propiedades de impedancia o al valor de la célula. Por consiguiente, la medición de la impedancia de las partículas en una muestra puede revelar características de las células. La comparación entre las mediciones de muestras de microorganismos tratados y no tratados con agentes antimicrobianos para identificar cualquier diferencia puede revelar si las características han sido cambiadas por la exposición antimicrobiana, lo que indica una sensibilidad medible al agente antimicrobiano. El agente antimicrobiano puede permanecer en la muestra para la medición por citometría, o puede eliminarse mediante lavado antes de la medición si se prefiere. Sin embargo, no hay necesidad de eliminación, lo cual es un aspecto beneficioso del método de la presente en comparación con las técnicas de citometría óptica, en las que normalmente es necesario eliminar un agente antimicrobiano de una muestra antes de agregar un tinte necesario. Para determinar la sensibilidad, se puede establecer un nivel umbral para un cambio en una o más características reflejadas en la medición de impedancia. Si la comparación entre las señales de impedancia del agente antimicrobiano no expuesto y las muestras de microorganismos expuestos muestra que la cantidad de cambio está en o por encima del umbral, se puede reconocer la sensibilidad. El umbral podría ser, por ejemplo, un umbral para un cambio medido en el tamaño de una característica, o un umbral para la cantidad de microorganismos en la muestra que exhiben ese cambio, por ejemplo.

En un nivel simple, la magnitud de la señal diferencial obtenida usando un aparato como se describe en la presente, un ejemplo del cual se muestra en la Figura 5(c), depende del tamaño de partícula. Una partícula más grande tiene un mayor efecto o interacción con el campo eléctrico en el canal de flujo, por lo que el flujo de corriente se reduce más y se detecta una corriente más baja en el electrodo de medición. Por lo tanto, la señal diferencial contendrá picos y valles de una amplitud mayor que para una partícula más pequeña. Por lo tanto, la comparación de una medición de microorganismos expuestos con la de microorganismos no expuestos puede revelar sensibilidad antimicrobiana si la señal diferencial de la

primera medición muestra características de amplitud más grandes que la última muestra. Se puede considerar la señal diferencial directamente para este análisis, o calcular los valores de impedancia correspondientes a partir de la señal diferencial.

5 Al considerar los valores de impedancia, recuerde que la impedancia comprende dos partes o componentes, la parte real y la parte imaginaria, o más útilmente, la magnitud $|Z|$ y la fase θ . Cualquier valor o combinación de estos componentes se puede analizar para investigar las propiedades de las partículas en un fluido de muestra. Además, la naturaleza de la interacción de una partícula con el campo eléctrico depende de la frecuencia del campo eléctrico. Por lo tanto, se pueden obtener diferentes resultados de impedancia midiendo a diferentes frecuencias o más de una frecuencia, y estos pueden revelar diferentes características de la partícula. La medición podría realizarse estudiando una muestra de microorganismo a una frecuencia y estudiando otra muestra del mismo microorganismo a una segunda frecuencia, conectando una fuente de voltaje o corriente diferente a los electrodos de señal o configurando la fuente de señal para que emita una frecuencia diferente a los electrodos de señal. Más convenientemente, sin embargo, la fuente o fuentes de señal utilizadas para accionar los electrodos de señal pueden configurarse para emitir más de una frecuencia al mismo tiempo. El filtrado y/o procesamiento adecuado de la señal diferencial o la señal de impedancia derivada de ella se puede llevar a cabo para aislar los diferentes componentes de frecuencia en las mediciones registradas, de modo que se puedan obtener uno o más componentes de impedancia (por ejemplo, magnitud y/o fase) para cada componente de frecuencia.

20 La Figura 9 muestra representaciones de la interacción de una partícula (célula) con campos eléctricos de diferentes frecuencias. Una célula 42 suspendida en un fluido electrolítico se encuentra en un campo eléctrico (indicado por las líneas), tal como estaría presente en el canal de flujo entre un electrodo de señal y un electrodo de medición. En la Figura 9(a), la frecuencia es baja, lo que significa una frecuencia en el intervalo de aproximadamente 10 MHz o menos, tal como aproximadamente 1 MHz o aproximadamente 5 MHz. En este régimen, el campo eléctrico pasa alrededor de la célula 42 (tenga en cuenta que las líneas de campo eléctrico no penetran en la célula y se desvían alrededor de ella), y la señal de impedancia medida refleja el volumen eléctrico de la célula (representativo del tamaño físico de la célula). En consecuencia, la raíz cúbica de la magnitud de impedancia medida, $|Z|^{1/3}$, refleja aproximadamente el radio eléctrico. En la Figura 9(b), la frecuencia es alta, lo que significa una frecuencia mayor que la baja frecuencia, por ejemplo, una frecuencia que es mayor que aproximadamente 10 MHz, tal como aproximadamente 40 MHz. En este régimen, el campo eléctrico se acopla capacitivamente a través de la pared (membrana) de la célula 42 (nótese que las líneas de campo eléctrico pasan a través de la célula relativamente sin perturbaciones). El efecto de esto es que la señal de impedancia medida refleja las propiedades eléctricas de la pared y/o membrana celular y/o las propiedades citoplasmáticas del interior de la célula. Esto se puede denominar "opacidad eléctrica". Por consiguiente, las diferencias en estas características entre dos células serán evidentes como diferencias entre las impedancias medidas a una alta frecuencia. Tenga en cuenta que los valores útiles para frecuencias altas y bajas serán diferentes, o significativamente diferentes, de estos valores de ejemplo para otros tipos de células, otros tipos de partículas y/o diferentes conductividades del electrolito en suspensión. Por ejemplo, podrían ser adecuados valores para una alta frecuencia de aproximadamente 1 MHz para células no bacterianas y aproximadamente 10 MHz para células bacterianas en un medio de suspensión con una conductividad similar a los medios fisiológicos. Una baja frecuencia es aquella en la que el campo eléctrico generalmente no penetra en la partícula y a partir de la cual se puede deducir información sobre el tamaño de la partícula. Una alta frecuencia es aquella que es más alta que una baja frecuencia elegida, y en la que el campo eléctrico se acopla a través de la pared celular, lo que permite investigar las propiedades que dependen de la membrana y la pared de la célula. A frecuencias mucho más altas (alrededor de 5 MHz o más para células no bacterianas y alrededor de 50 MHz o más para bacterias, consideradas dentro de un régimen de alta frecuencia para la presente descripción), se pueden medir la estructura interna y las partes componentes.

45 Por lo tanto, existe una distinción entre las mediciones a diferentes frecuencias (particularmente entre bajas frecuencias y altas frecuencias como se definió anteriormente) de la misma partícula que dependen de las propiedades de esa partícula, a partir de las cuales se puede deducir información sobre esas propiedades. Otros parámetros también afectan la distinción, incluida la conductividad y la permitividad del fluido electrolítico en suspensión, pero este y otros parámetros que son características del aparato y el régimen o protocolo de prueba se pueden mantener constantes en múltiples mediciones, por lo que no afectan los análisis comparativos.

Las mediciones se pueden obtener a una sola frecuencia, que puede ser alta o baja, o a más de una frecuencia, típicamente dos, ya sea secuencial o simultáneamente.

55 Un enfoque para dos frecuencias es, para una partícula individual, calcular la impedancia (magnitud, fase, componentes reales o imaginarios) a la baja frecuencia y la impedancia a la alta frecuencia. Estos valores se trazan en un gráfico, junto con los valores de otras partículas en la misma muestra, para producir un gráfico de dispersión. La magnitud de impedancia de baja frecuencia, que indica el radio eléctrico o el volumen eléctrico, se puede trazar en el eje x de la gráfica, y la magnitud de impedancia de alta frecuencia se puede trazar en el eje y de la gráfica. Alternativamente, el eje y puede trazar la relación del valor de alta frecuencia al valor de baja frecuencia, normalizando así la opacidad al tamaño de la célula; esto se denomina "opacidad eléctrica".

65 La Figura 10 muestra cuatro diagramas de dispersión de ejemplo. La Figura 10(a) muestra las mediciones para una cepa bacteriana que no ha sido tratada con ningún antimicrobiano. Las mediciones se obtuvieron a dos frecuencias, una baja frecuencia de 5 MHz y una alta frecuencia de 40 MHz. El valor de impedancia para cada célula a la baja frecuencia,

5 $|Z|_{5\text{MHz}}$, se traza en el eje x, y el valor de impedancia normalizado para cada célula a la alta frecuencia, $|Z|_{40\text{MHz}}/|Z|_{5\text{MHz}}$, se traza en el eje y. Cada punto de datos corresponde a una partícula individual en la muestra. Para fines de calibración/referencia, la muestra incluyó una cantidad de microperlas de plástico, de un tamaño conocido que puede ser ampliamente comparable al tamaño de las bacterias, y propiedades dieléctricas conocidas (características de impedancia conocidas). Las perlas aparecen en el gráfico centradas alrededor de un valor de alta frecuencia de 1, y un valor de baja frecuencia de 1,5, para perlas individuales. Las perlas que se pegan en grupos de dobletes y tripletes aparecen como poblaciones más pequeñas a valores más altos de baja frecuencia, a la derecha de la población principal de perlas. Sin embargo, todas las perlas están bien separadas de los puntos de datos que representan las células bacterianas en la muestra. Estos se centran en un valor de alta frecuencia de aproximadamente 0,75, que se extiende en un rango de baja frecuencia de aproximadamente 1,6 a 2,4. Se superpone una línea continua cerrada sobre los puntos de datos de bacterias para indicar la ubicación de la mayor parte de la población bacteriana. Esta línea se puede considerar como una línea de contorno o límite, o una marcación-análisis, y es útil para comparar mediciones de diferentes muestras. Se puede dibujar para abarcar todos los puntos de datos de las bacterias, o una proporción central de los puntos de datos, como 99 %, 95 % o 90 %, de modo que se excluyan las mediciones periféricas. Se pueden utilizar técnicas estadísticas conocidas para colocar y dimensionar el contorno.

La Figura 10(b) muestra mediciones para una muestra de la misma cepa bacteriana que se ha incubado con un agente antimicrobiano, en este ejemplo, de una clase antimicrobiana llamada β -lactamas, durante 30 minutos. Los puntos de datos para las perlas no cambian con respecto a la Figura 10(a), ya que el antimicrobiano no tiene efecto sobre el material plástico. Sin embargo, los datos para las bacterias han cambiado significativamente a valores de impedancia más altos a la baja frecuencia, que ahora ocupan un rango de aproximadamente 2,1 a 3, y han cambiado algo a valores de impedancia más bajos a la alta frecuencia, ahora centrados en aproximadamente 0,7. La línea de contorno sólida de la Figura 10(a) se reproduce en la Figura 10(b). Casi ningún punto de datos se encuentra dentro de la línea continua, lo que indica que prácticamente toda la población de bacterias ha sido modificada sustancialmente por el agente antimicrobiano. El cambio a valores de baja frecuencia más grandes indica un radio eléctrico aumentado, y el cambio a valores de alta frecuencia más pequeños indica un cambio en la estructura interna de la célula y/o la pared celular. En consecuencia, se deduce que el agente antimicrobiano ha tenido un efecto medible sobre las bacterias, por lo que las bacterias son susceptibles a ese agente antimicrobiano en particular. Los agentes antimicrobianos β -lactámicos inhiben la síntesis de la pared celular y, por lo tanto, tienen un efecto general de aumento del volumen (tamaño, diámetro) de las bacterias, como se observa en la Figura 10(b).

Las Figuras 10(c) y 10(d) muestran dos gráficos de dispersión más para muestras de bacterias expuestas y no expuestas más perlas de plástico, donde las bacterias son una cepa diferente de la de las Figuras 10(a) y 10(b). La Figura 10(c) muestra datos para una muestra de la bacteria que no ha sido expuesta a un agente antimicrobiano. Se dibuja una línea de contorno alrededor de la población de bacterias como antes. La Figura 10(d) muestra datos para una muestra de las bacterias después de la exposición al agente antimicrobiano β -lactámico. Se puede observar muy poca diferencia con respecto a la Figura 10(c); casi toda la población de bacterias permanece dentro de la línea de contorno. En consecuencia, podemos deducir que el agente antimicrobiano ha tenido poco o ningún efecto medible sobre las bacterias. Se concluye que la cepa que se está probando es resistente al agente antimicrobiano a esta concentración específica.

Como se señaló anteriormente, otras clases de antimicrobianos tienen diferentes efectos sobre los microorganismos. Para determinar si una población de microorganismos es susceptible a un agente antimicrobiano particular, cualquiera o todos los tres parámetros diferentes se pueden evaluar a partir de la medición de impedancia. Un cambio en el tamaño de la célula se indica mediante un cambio en la respuesta a frecuencias más bajas (el eje x en las Figuras 10(a)-(d)), y un cambio en las propiedades de la pared celular/interior de la célula se indica mediante un cambio en la respuesta a frecuencias más altas (el eje y en las Figuras 10(a)-(d)). Una reducción en la población total de partículas que surge de la estructura celular comprometida debido al agente antimicrobiano hasta tal punto que ya no se registra como una partícula se indica por un recuento de partículas reducido en un volumen medido con precisión. Cada uno de estos cambios produce un número menor de puntos de datos dentro de un contorno como el que se muestra en las Figuras 10(a)-(d), ya sea porque los puntos de datos migran fuera del contorno si el tamaño de la célula o la estructura de la pared/interior cambia, o porque los puntos de datos se eliminan si la integridad de la célula se ve comprometida. Por consiguiente, se puede utilizar una comparación de la cantidad de puntos de datos dentro de la misma línea de contorno para las poblaciones de microorganismos expuestos y no expuestos para identificar la sensibilidad. Una métrica que representa la sensibilidad a una concentración antimicrobiana específica se puede definir como el número o la proporción de microorganismos en una muestra expuesta que se encuentran dentro del contorno dibujado para la muestra no expuesta. Por ejemplo, en la Figura 10(b) quedan muy pocas células dentro del contorno, y la métrica es cercana al 0 %; por lo tanto, las bacterias son susceptibles al agente antimicrobiano a esa concentración. En la Figura 10(d) la mayoría de las células se encuentran dentro del contorno, y la métrica es cercana al 100 %; por lo tanto, las bacterias son resistentes al antimicrobiano.

Las Figuras 11(a) y (b) muestran algunos ejemplos de gráficos de dispersión que indican sensibilidad a un agente antimicrobiano que reduce el recuento celular total al destruir las bacterias. Para cada gráfico, el radio eléctrico para cada célula a la baja frecuencia, $|Z|_{5\text{MHz}}^{1/3}$, se traza en el eje x, y el valor de impedancia normalizado para cada célula a la alta frecuencia, $|Z|_{40\text{MHz}}/|Z|_{5\text{MHz}}$, se traza en el eje y, como con los gráficos de la Figura 10. La Figura 11(a) muestra mediciones de impedancia de una muestra no expuesta, que incluye una población de bacterias, con una línea de contorno o de marcación-análisis dibujada para abarcar la mayor parte de la población, y una población de perlas de referencia a una respuesta de alta frecuencia más grande. La Figura 11(b) muestra las mediciones de impedancia de una población

expuesta. La posición x-y de los datos no se ha movido significativamente para las bacterias expuestas, ya que hay pocos puntos de datos fuera del contorno, pero el recuento total de células se reduce sustancialmente, indicado por el menor número de puntos de datos dentro del contorno en comparación con la muestra no expuesta. Por lo tanto, las bacterias se clasifican como susceptibles al agente antimicrobiano particular.

Los datos de ejemplo descritos hasta ahora se han obtenido utilizando una alta frecuencia y una baja frecuencia para la señal aplicada a los electrodos de señal en el aparato. Sin embargo, también se pueden obtener resultados midiendo solo una frecuencia. Después se puede producir un gráfico de dispersión para una población de microorganismos trazando la magnitud de la impedancia frente a la fase de impedancia.

La Figura 12 muestra dos gráficos de dispersión de ejemplo adicionales, de datos obtenidos a una alta frecuencia de 40 MHz solamente. El eje x de cada gráfico traza el radio eléctrico (raíz cúbica de la magnitud de la impedancia) medido a 40 MHz. El eje y de cada gráfico traza la fase de la señal de impedancia medida a 40 MHz. Como antes, se incluyeron microperlas de plástico en las muestras; estas aparecen en un valor de fase de aproximadamente 1. Los puntos de datos en valores de fase más bajos, alrededor de 0,7, indican bacterias; por lo tanto, las mediciones de fase pueden distinguir fácilmente entre bacterias y perlas. La Figura 12(a) muestra una gráfica para una muestra de bacterias que no ha sido tratada con antimicrobiano. Los radios eléctricos medidos para la población oscilan entre aproximadamente 1,5 y 2,1. La Figura 12(b) muestra una gráfica para una muestra de las mismas bacterias que han sido expuestas a un agente antimicrobiano. La población de bacterias ha cambiado a valores más altos del eje x, cubriendo un rango de aproximadamente 1,8 a 2,7. Dado que se sabe que la exposición a un agente antimicrobiano eficaz puede alterar el tamaño de las células bacterianas, deducimos que la cepa bacteriana es susceptible al antimicrobiano que se ha aplicado.

Tenga en cuenta que, de acuerdo con la capacidad de distinguir fácilmente poblaciones de bacterias de poblaciones de perlas observando los valores de fase, la fase también se puede usar para distinguir entre, o identificar la presencia de, poblaciones o subpoblaciones (grupos o subgrupos) de diferentes microorganismos dentro de una muestra, si los diferentes microorganismos tienen un tamaño y/o forma y/o morfología diferentes. Los diferentes microorganismos pueden estar presentes originalmente en la muestra, o pueden surgir de un efecto del agente antimicrobiano. Por ejemplo, algunos agentes cambian el tamaño de las células con el efecto de generar subpoblaciones de células persistentes más grandes, más pequeñas e intermedias.

Como alternativa adicional, se pueden combinar los valores de fase y magnitud de la impedancia a diferentes frecuencias. La Figura 13 muestra gráficos de dispersión de ejemplo adicionales para datos obtenidos a 5 MHz y 40 MHz. En cuanto a los gráficos de la Figura 12, los gráficos de la Figura 13 representan la fase a 40 MHz en el eje y. Sin embargo, el eje x muestra el radio eléctrico a la baja frecuencia, 5 MHz. La Figura 13(a) muestra mediciones de una muestra de bacterias no tratadas con un agente antimicrobiano, y la Figura 13(b) muestra mediciones de una muestra de las mismas bacterias que se han tratado con un agente antimicrobiano al que son susceptibles las bacterias. Las bacterias y el agente antimicrobiano son los mismos que para los datos de la Figura 12. Ambas muestras contenían perlas de referencia, con un valor de fase de alrededor de 1. Al igual que con los datos de la Figura 12, las bacterias se distinguen fácilmente de las perlas, teniendo un valor de fase más bajo alrededor de 0,7. Tenga en cuenta que los valores de fase son los mismos que en la Figura 12, ya que los datos de fase se obtienen para la misma frecuencia alta. De nuevo como antes, las bacterias tratadas muestran un cambio a valores más grandes de radio eléctrico, que surgen de la sensibilidad al agente antimicrobiano que causa un aumento en el tamaño celular. Tenga en cuenta que en este ejemplo, el aumento aparente en el tamaño de la célula es mayor que en la Figura 12, a valores en el intervalo de aproximadamente 2,1 a 3. Esto se debe a la mayor sensibilidad del tamaño de la célula a las mediciones de baja frecuencia que a las mediciones de alta frecuencia.

A partir de estos resultados, se puede apreciar que se puede utilizar un método de acuerdo con la presente descripción para aplicar señales eléctricas (voltajes o corrientes) al primer y segundo electrodos de señal a una frecuencia, o a más de una frecuencia. Por consiguiente, un aparato utilizado para llevar a cabo el método puede comprender una o más fuentes de señal eléctrica operables para generar una frecuencia, o dos o más frecuencias. La única frecuencia puede ser una frecuencia alta o una frecuencia baja. Las dos o más frecuencias pueden comprender dos frecuencias, una alta y una baja. Una frecuencia alta puede estar en el rango de aproximadamente 10 MHz o superior, tal como entre 10 y 1000 MHz, por ejemplo 40 MHz. En algunas aplicaciones, pueden ser útiles frecuencias incluso mayores, como frecuencias de hasta aproximadamente 10 GHz. La baja frecuencia es menor que la alta frecuencia y puede estar en el rango de 10 MHz o menos, tal como entre 1 y 10 MHz, por ejemplo 5 MHz. Sin embargo, no se excluyen otras frecuencias y/o frecuencias adicionales, y se pueden elegir con referencia a una aplicación particular. Del mismo modo, la relación entre la baja frecuencia y la alta frecuencia puede variar mucho dependiendo de la aplicación.

Como se describió anteriormente, por ejemplo con respecto a las Figuras 10, 11, 12 y 13, un método de acuerdo con la presente descripción puede comprender obtener una medición de una muestra de microorganismos que se han expuesto a un agente antimicrobiano seleccionado (donde los microorganismos son partículas suspendidas en un electrolito para proporcionar un fluido que se pasa a través de una disposición de electrodos como se describe en la presente para obtener una señal diferencial y opcionalmente una señal de impedancia derivada de la señal diferencial) y otra medición de una muestra del mismo microorganismo que no se ha expuesto a ningún agente antimicrobiano, y comparar las dos mediciones. La población de microorganismos no expuestos se utiliza como referencia con la que se compara la población expuesta. Las diferencias significativas entre las dos mediciones pueden indicar que los microorganismos son

susceptibles al agente antimicrobiano seleccionado. Las mediciones se pueden organizar en gráficos de dispersión de puntos de datos correspondientes a microorganismos individuales, y la diferencia se puede evaluar por referencia a una línea de contorno alrededor de la población de microorganismos no expuestos. Se puede establecer un valor umbral, por ejemplo, de modo que si la exposición antimicrobiana hace que el número o la proporción de microorganismos expuestos capturados dentro de la línea de contorno caiga por debajo del umbral, se deduzca la sensibilidad. Para obtener las dos muestras, se puede dividir un grupo de bacterias por la mitad, antes o después de la suspensión en el electrolito; una mitad se incuba con el agente antimicrobiano y la otra sin agente antimicrobiano, durante un período de tiempo determinado, como 30 minutos. Después, las perlas de plástico de referencia se pueden agregar si se desea, y ambas muestras se pasan a través de un aparato como se describe para obtener una señal diferencial a partir de la cual se pueden derivar los datos de impedancia.

Sin embargo, puede ser más útil cuantificar la sensibilidad antimicrobiana con más detalle. En la práctica, la sensibilidad se define más comúnmente como si una cepa de microorganismo es susceptible o resistente a una concentración dada de agente antimicrobiano. A concentraciones muy altas, la mayoría de los agentes antimicrobianos superarán a los microorganismos, pero tales concentraciones altas pueden no ser seguras o prácticamente alcanzables en el cuerpo humano. Bajo este enfoque, se puede definir una concentración inhibidora mínima, o MIC, que es la concentración más baja que se considera que tiene un efecto inhibitorio notable en la población de la cepa del microorganismo. Después, se puede decidir si la MIC se puede lograr en el cuerpo humano y, por lo tanto, si ese agente antimicrobiano en particular se puede usar para combatir la infección causada por el microorganismo en particular. Por lo tanto, es útil poder medir la respuesta de los microorganismos a un rango de diferentes concentraciones de un agente antimicrobiano para determinar la MIC. Los métodos de acuerdo con la presente descripción son adecuados para permitir esta determinación debido a su simplicidad.

Un método de acuerdo con la descripción hasta ahora se puede extender dividiendo una muestra de microorganismos en más de dos grupos, y exponiendo cada grupo a una concentración diferente de agente antimicrobiano, incluye un grupo no expuesto para actuar como una muestra de referencia, como antes. De esta manera se puede determinar una MIC, o se puede verificar o volver a probar un valor previamente establecido para la MIC. Para evaluar una MIC, se incuban grupos o poblaciones de microorganismos a concentraciones similares con un rango de concentraciones antimicrobianas, que generalmente son una concentración de control o referencia de 0, una concentración considerada como una MIC clínicamente relevante, y dos o más concentraciones (o diluciones) a cada lado de la MIC. Por lo tanto, la muestra de microorganismos se divide en seis grupos, cada uno de los cuales se somete a una medición de impedancia.

Como ejemplo, la muestra de microorganismos para realizar la evaluación de MIC puede comprender recoger una colonia de microorganismos de una placa e incubar la colonia durante la noche en medios adecuados, tales como caldo de soja tripticasa (TSB) para producir un cultivo. Una alícuota del cultivo se diluye en caldo Mueller Hinton (MHB) a una concentración de 5×10^5 células/mL y se incuba a 37 °C durante 30 minutos para obtener un cultivo que se divide activamente. Se agregan alícuotas (950 µL) del cultivo que se divide activamente a cada uno de los siete tubos de ensayo precalentados, cada uno de los cuales contiene 50 µL de MHB y una dosis de antimicrobiano, como el antibiótico meropenem, para obtener un conjunto de concentraciones antimicrobianas finales de 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 y 8 mg/L. Los tubos se incubaron durante 30 minutos (exposición a antibióticos), después se lavan una vez en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) y posteriormente se diluyen 1:10 en HBSS. Se agregaron perlas de referencia de 1,5 µm de diámetro a cada muestra (10^4 /mL). Las mediciones de citometría de flujo de impedancia se pueden llevar a cabo como se describió anteriormente, por ejemplo, mediante el uso de una jeringa para introducir la muestra en el aparato citométrico a una velocidad de 30 µL/min durante 3 minutos.

La Figura 14 muestra seis gráficos de dispersión de mediciones de impedancia de seis grupos de bacterias expuestas a una serie de seis concentraciones antimicrobianas. En este ejemplo, las concentraciones fueron 0 µg/mL (control) y 0,5, 1, 2, 4 y 8 µg/mL como se indica en las gráficas, donde 2 µg/mL es la MIC conocida y predefinida del agente antimicrobiano para las bacterias que se están analizando. La Figura 14(a) muestra la población de control o de referencia no expuesta al agente antimicrobiano, con el contorno de marcación-análisis dibujado alrededor de la población de bacterias para abarcar la mayoría de los puntos de datos. Para las concentraciones antimicrobianas más bajas (Figuras 14(b)-(d)), se puede ver que las bacterias son resistentes, ya que los puntos de datos no se mueven fuera del contorno. Solo a concentraciones de 4 y 8 µg/mL se observa un cambio significativo del contorno (Figuras 10(e) y (f)). Para estas mediciones, los datos se obtuvieron en dos frecuencias, una baja frecuencia de 5 MHz y una alta frecuencia de 40 MHz. El valor de impedancia para cada célula a la baja frecuencia, $|Z|_{5\text{MHz}}$, se traza en el eje x, y el valor de impedancia normalizado para cada célula a la alta frecuencia, $|Z|_{40\text{MHz}}/|Z|_{5\text{MHz}}$, se traza en el eje y.

Como se expuso, el "cambio" medido en las propiedades biofísicas que surgen de la exposición a un agente antimicrobiano al que una cepa de microorganismo carece de resistencia, y discernible como un cambio en el recuento celular dentro de un contorno que marca una distribución de mediciones de impedancia de una población no expuesta, se puede cuantificar de varias maneras diferentes, que incluyen un cambio en el tamaño celular, un cambio en las propiedades de la pared/membrana celular y/o una disminución en el recuento celular, o una combinación de estos.

La Figura 15 muestra gráficos que resumen las mediciones de estas propiedades para diez cepas diferentes de bacterias después de la exposición a diferentes concentraciones antimicrobianas, donde los valores de las diversas propiedades se determinan a partir de mediciones de impedancia obtenidas por métodos de acuerdo con la presente descripción. La

Figura 15(a) muestra el recuento celular total normalizado a un recuento celular de referencia (eje y) frente a la concentración antimicrobiana (eje x). La Figura 15(b) muestra el número de células dentro de una marcación-análisis de contorno normalizada a un número de referencia (eje y) frente a las concentraciones antimicrobianas (eje x) (y, por lo tanto, es similar al recuento total de células en la Figura 15(a)). La Figura 15(c) muestra el tamaño de celda normalizado a un tamaño de celda de referencia (eje y) frente a la concentración antimicrobiana (eje x). La Figura 15(d) muestra la opacidad normalizada a una opacidad de referencia (eje y) frente a la concentración de antimicrobiano (eje x). El grupo de líneas A corresponde a bacterias que se sabe que son altamente resistentes al agente antimicrobiano, por lo que las propiedades no se ven muy afectadas incluso a concentraciones más altas; las líneas permanecen en gran parte horizontales. El grupo de líneas B muestra cepas que son moderadamente resistentes, por lo que las propiedades se alteran solo a concentraciones más altas; las líneas se desvían de la horizontal a concentraciones más altas. El grupo de líneas C muestra cepas que se sabe que son altamente susceptibles al agente antimicrobiano, por lo que las propiedades se alteran incluso a concentraciones muy bajas; la línea se desvía de la horizontal inmediatamente la concentración excede cero. Estos cuatro gráficos diferentes podrían usarse por separado o juntos para tomar una decisión cuantitativa de la sensibilidad de las bacterias. Como ejemplo, el recuento total de bacterias en la Figura 15(a) para el grupo C es menor a 0,25 µg/mL (por lo que las bacterias son susceptibles a esta concentración), pero las líneas del grupo B solo muestran una disminución en el recuento celular a 4 µg/ml. Se puede identificar una tendencia similar en el tamaño de célula que se muestra en la Figura 15(c). Se podría definir un umbral para determinar una MIC adecuado. Por ejemplo, se podría requerir que el tamaño celular tenga que aumentar al 110 % o más para que el agente antimicrobiano se considere efectivo; la concentración que produce este cambio se toma como la MIC. Diferentes agentes antimicrobianos y diferentes microorganismos tendrán diferentes perfiles, lo que dará como resultado diferentes umbrales para las diversas propiedades para cuantificar la sensibilidad y hacer una determinación de susceptibles o resistentes para cada aislado/concentración de agente antimicrobiano. Los datos podrían analizarse/correlacionarse y/o calibrarse con técnicas estándar para la medición de la sensibilidad.

Un inconveniente con la técnica de citometría óptica es que el agente antimicrobiano a menudo debe eliminarse de una muestra mediante una etapa de lavado antes de agregar el tinte necesario. Esto se debe a que el tinte puede interferir con el crecimiento de microorganismos. Por lo tanto, la muestra solo captura el efecto del agente antimicrobiano en el momento del lavado, y la medición óptica solo proporciona una "instantánea". Esto evitaría el estudio del efecto evolutivo del agente antimicrobiano a lo largo del tiempo sin preparar una multiplicidad de muestras, cada una lavada después de un tiempo de incubación diferente, lo cual es inconveniente y costoso debido a la naturaleza costosa de los tintes. Este último punto haría que fuera costoso evaluar la MIC mediante citometría óptica debido a la necesidad de una pluralidad de muestras a diferentes concentraciones antimicrobianas.

Los métodos de citometría de flujo de impedancia descritos en la presente abordan este problema al permitir una medición de impedancia continua a partir de una sola muestra de microorganismo, de modo que se pueda evaluar la evolución del efecto antimicrobiano de un agente. Para lograr esto, se prepara una única población de microorganismos en una solución de electrolito tal como un medio de crecimiento como un fluido para pasar a través de un aparato de medición de impedancia como se describió anteriormente, y se aplica un agente antimicrobiano a los microorganismos, y permanece en la muestra. El fluido, incluidos los microorganismos y el agente antimicrobiano, se pasa rápidamente al canal de flujo del aparato para que se pueda registrar una primera medición de impedancia poco después de la adición del agente antimicrobiano, por ejemplo, en el primer minuto. En esta escala de tiempo, el agente antimicrobiano puede no tener un efecto medible sobre los microorganismos, por lo que los microorganismos podrían considerarse no expuestos al agente antimicrobiano y esta primera medición puede tomarse como una medición de referencia correspondiente a una medición de una muestra de microorganismos no expuestos. El paso del fluido a través del canal de flujo se mantiene a una velocidad constante, ya sea por extracción continua de una muestra grande o por recirculación de fluido de una muestra más pequeña, y se obtienen múltiples mediciones, cada una en un momento específico, por ejemplo, a intervalos de un minuto después de la primera medición de referencia. Alternativamente, las mediciones se pueden obtener de forma continua y los resultados se pueden dividir en datos recopilados dentro de períodos de tiempo sucesivos o contenedores, como intervalos de un minuto. A lo largo del tiempo total de medición, el agente antimicrobiano continúa actuando sobre los microorganismos, y su efecto a lo largo del tiempo se puede determinar comparando las diferentes mediciones. Las porciones de la muestra correspondientes a cada intervalo de tiempo se pueden considerar como submuestras, para cada una de las cuales se recopilan mediciones de impedancia. En algunos casos, puede ser deseable agregar el agente antimicrobiano a la muestra después de que haya comenzado la medición en la muestra, si, por ejemplo, el agente antimicrobiano actúa rápidamente sobre el microorganismo. Esto permite que la primera medición sea una medición de referencia de microorganismos no expuestos. Para lograr esto, se puede preparar una única población de microorganismos en una solución de electrolito tal como un medio de crecimiento para obtener un fluido que se hará pasar a través de un aparato de medición de impedancia como se describió anteriormente. Se toma una medición o múltiples mediciones, y después se agrega el agente antimicrobiano al fluido. Después, las mediciones continúan en la muestra expuesta como se describió anteriormente.

La Figura 16 muestra una secuencia de diagramas de dispersión de datos obtenidos de esta manera, utilizando una alta frecuencia de 40 MHz y una baja frecuencia de 5 MHz para obtener mediciones de impedancia. Se expuso una población de bacterias a agentes antimicrobianos y se midió continuamente durante 26 minutos, y los datos de impedancia resultantes se separaron en contenedores correspondientes a intervalos de un minuto, y se graficaron en una gráfica. El fluido de muestra incluía micropelotas de plástico que aparecen como un grupo de población en la parte superior izquierda de cada gráfico, como en los ejemplos anteriores. La gráfica superior izquierda muestra los datos recopilados en el primer

minuto (tiempo de 0 a 1 minutos) que se designan como datos de referencia o control para las bacterias no expuestas. Se dibuja una línea de contorno o marcación-análisis alrededor de la población de bacterias no expuestas en este gráfico, y después se replica en cada gráfico posterior para que se pueda identificar la alteración de las bacterias a lo largo del tiempo. Un estudio de la secuencia de gráficos revela que después de unos 15 minutos, la población de bacterias comienza a desplazarse notablemente fuera de la línea de contorno. Por lo tanto, podemos deducir que la bacteria es susceptible al agente antimicrobiano en particular. Después de 26 minutos, casi toda la población se ha alejado del contorno. El movimiento es a valores de baja frecuencia más altos, lo que indica un aumento en el tamaño celular, y en menor medida a valores de alta frecuencia más bajos, lo que indica que el agente antimicrobiano también cambia las propiedades de la pared celular bacteriana o su estructura interna.

La Figura 17 muestra un ejemplo adicional de aparato, con una disposición alternativa de electrodos. Se proporcionan ocho electrodos para definir cuatro trayectorias de corriente, en dos grupos, cada uno de los cuales comprende una primera trayectoria de corriente y una segunda trayectoria de corriente, como en algunos ejemplos anteriores. Sin embargo, si bien los ejemplos anteriores han comprendido solo una orientación de trayectoria de corriente dentro de un único sistema, el ejemplo de la Figura 17 incluye dos orientaciones de trayectoria de corriente, lo que permite determinar información adicional sobre las partículas en una muestra.

En particular, el aparato está configurado de modo que en cada uno del primer grupo de electrodos 50 y el segundo grupo de electrodos 52, hay una trayectoria de corriente que es sustancialmente transversal a la dirección de flujo de fluido y una trayectoria de corriente que es sustancialmente paralela a la dirección de flujo de fluido. En el primer grupo de electrodos 50, un primer electrodo de señal 60a alimentado con +V desde una fuente de voltaje 70 está dispuesto por encima del canal, opuesto a un primer electrodo de medición 62a por debajo del canal, para definir una primera trayectoria de corriente transversal a la dirección de flujo, a partir de la cual se mide una corriente I4. Un segundo electrodo de señal 64a alimentado con -V desde una fuente de voltaje 72 está dispuesto debajo del canal adyacente a un segundo electrodo de medición 66a también debajo del canal, para definir una segunda trayectoria de corriente que es paralela a la dirección del flujo, a partir de la cual se mide una corriente I3. Como antes, I3 y I4 se combinan para producir una primera señal sumada I5, del primer grupo de electrodos 50. De manera similar, en el segundo grupo de electrodos 52, un primer electrodo de señal adicional 60b es opuesto a un primer electrodo de medición adicional 62b para definir una primera trayectoria de corriente transversal I6, y un segundo electrodo de señal adicional 64b es adyacente a un segundo electrodo de medición adicional 66b para definir una segunda trayectoria de corriente paralela I7. Se combinan I6 y I7 para generar la segunda señal sumada I8, y como en los ejemplos anteriores, las señales sumadas son manejadas por los convertidores de corriente a voltaje 34a, 34b y un amplificador diferencial 36 para determinar una señal diferencial.

La provisión de trayectorias de corriente orientadas de manera diferente a lo largo de la misma trayectoria de flujo puede revelar información sobre la forma de las partículas. En ausencia de cualquier partícula, las magnitudes de las diversas trayectorias de corriente son aproximadamente iguales, sumando aproximadamente cero, como antes. En presencia de una partícula esférica o casi esférica, como se describe con respecto a las Figuras 1 a 9, las señales de impedancia medidas para trayectorias de corriente transversales tienen aproximadamente la misma magnitud que las señales de impedancia medidas para trayectorias de corriente paralelas. Sin embargo, si una partícula 42a no es esférica, como una bacteria en forma de varilla alargada (por ejemplo, un bacilo), interactuará en diferentes cantidades con las dos direcciones de la trayectoria de la corriente, dando señales de diferentes tamaños. Si la partícula alargada tiene su eje más largo dispuesto a lo largo de la dirección del flujo del canal, producirá un cambio mayor en la trayectoria de corriente transversal que en la trayectoria de corriente paralela. En consecuencia, la señal sumada derivada de las dos trayectorias de corriente dentro de un grupo de electrodos será diferente para una partícula alargada en comparación con una partícula esférica, la diferencia está relacionada con el grado en que la forma de la partícula difiere de una esfera (en otras palabras, su grado de excentricidad o elongación). Por lo tanto, la obtención de las señales sumadas de las trayectorias de corriente de dos orientaciones diferentes (como una trayectoria transversal y una trayectoria paralela) proporciona una señal diferencial que puede indicar información sobre la excentricidad o la forma de las partículas. Esto es útil para distinguir entre diferentes tipos de bacterias, como bacilos (bastones) y cocos (esferas), o identificar cadenas de bacterias. Además, se puede utilizar para mejorar la medición de las AST mediante la identificación de partículas que han sido detenidas durante el ciclo de división, como es el caso del tratamiento con el agente antimicrobiano β -lactámico. Se sabe, por ejemplo, que el tratamiento de células con diferentes concentraciones de agentes antimicrobianos β -lactámicos conduce a formas morfológicas diferentes y distintas. Los agentes antimicrobianos que actúan en un punto de bloqueo temprano dan formas de mancuerna, mientras que los que afectan en un momento posterior dan células en forma de limón [2].

La forma externa de una partícula puede revelar otras propiedades. Por ejemplo, si el flujo del fluido de muestra a través del canal del citómetro crea suficiente tensión de cizallamiento, una célula puede deformarse o aplastarse a medida que viaja a lo largo del canal. Las células más blandas se deformarán más que las células más rígidas, adquiriendo un mayor grado de excentricidad. Por consiguiente, una disposición como en el ejemplo de la Figura 17 que utiliza trayectorias de corriente de diferentes orientaciones para detectar la excentricidad celular, se puede utilizar adicionalmente para distinguir o determinar las propiedades mecánicas de las partículas. Una partícula más blanda producirá diferentes señales sumadas y diferenciales que una partícula más rígida, debido a la diferente forma inducida por el flujo. La acción de un agente antimicrobiano sobre una especie de microorganismo también puede producir cambios en las propiedades mecánicas.

Tenga en cuenta que los electrodos pueden colocarse para proporcionar las dos orientaciones de la trayectoria de la

corriente en un orden diferente a lo largo de la dirección del flujo que el que se muestra en la Figura 17.

La Figura 18 muestra un diagrama de dispersión de datos de impedancia obtenidos de dos tipos de células diferentes. Como antes, cada punto de datos representa una sola partícula en una muestra. El eje vertical muestra una medida de "deformabilidad", obtenida dividiendo la medición de impedancia de una o más trayectorias de corriente paralelas por la medición de impedancia de una o más trayectorias de corriente transversales. El eje horizontal indica el diámetro eléctrico de las partículas, obtenido promediando las señales de impedancia de las dos direcciones de medición, que se aproxima al tamaño de la célula. Alternativamente, el diámetro podría obtenerse en línea con la medición expuesta del radio eléctrico con respecto a la Figura 12. Se obtuvieron mediciones para dos grupos de células B3Z, que tienen una forma esférica. Un grupo se modificó mediante un tratamiento de fijación con glutaraldehído para aumentar la rigidez de la membrana. Tenga en cuenta que la medición podría realizarse en una sola muestra que contenga ambos grupos de células, o en dos muestras, cada una de las cuales contiene un grupo. Por lo tanto, las células de los dos grupos tienen diferentes propiedades mecánicas y aparecen en el diagrama de dispersión como dos poblaciones bien separadas. También se indican las mediciones de una población de referencia de perlas de 7 μm . Las células fijas más rígidas permanecen sustancialmente esféricas en el flujo de fluido a lo largo del canal, por lo que las señales de impedancia medidas para las dos trayectorias de corriente ortogonales son similares. Por lo tanto, la deformabilidad de estas células se mide como cercana a 1 unidad arbitraria. Por el contrario, las células no fijas se deforman por el flujo y se estiran a lo largo de la dirección del canal. En consecuencia, las señales de impedancia medidas a lo largo de la dirección del canal se reducen en comparación con las mediciones a través del canal, y la medida de deformabilidad se reduce por debajo de 1 UA. En este ejemplo, se mide a aproximadamente 0,5 UA. Por lo tanto, se pueden identificar las propiedades mecánicas de las células individuales y las poblaciones de células, y se pueden distinguir diferentes poblaciones de células entre sí.

La técnica de evaluación de la sensibilidad antimicrobiana mediante la determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC) se ha descrito anteriormente, junto con una indicación de cómo llevarla a cabo utilizando los métodos de citometría de flujo de impedancia descritos. Una técnica alternativa es la del análisis del punto de corte, en la que las muestras de bacterias se exponen a una o dos concentraciones de antimicrobiano (antibiótico) y se clasifican como susceptibles/no susceptibles (S/NS), resistentes/no resistentes (R/NR) o de resistencia intermedia, dependiendo de la respuesta de las muestras al antimicrobiano. La respuesta se puede medir utilizando la citometría de flujo de impedancia descrita.

En el análisis del punto de corte, las bacterias se evalúan en una o dos concentraciones predefinidas de antibióticos que son tabuladas por estándares de institutos como el Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) en los EE. UU. y el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana] (EUCAST). Para realizar el análisis, el crecimiento de bacterias se evalúa a una primera concentración X, que establece un límite para S/NS. Si las bacterias no crecen (es decir, el número de bacterias en la muestra analizada no aumenta) se clasifican como susceptibles al antibiótico. Si las bacterias crecen, se clasifican como no susceptibles al antibiótico. Además, el crecimiento de las bacterias se puede evaluar a una segunda concentración Y, que es mayor que la concentración X y establece un límite de R/NR. Si las bacterias crecen, se clasifican como resistentes al antibiótico; si no crecen, se clasifican como no resistentes. Los valores de concentración X y concentración Y dependen de la cepa de bacteria y del tipo de antibiótico. Algunas cepas de bacterias pueden crecer a la concentración X (o superior) pero no a la concentración Y; estas se clasifican como no resistentes pero tampoco susceptibles, una característica comúnmente denominada resistencia intermedia. Para algunos antibióticos y algunas especies de bacterias, no hay una región intermedia, en otras palabras, la concentración X y la concentración Y son iguales, y se requieren pruebas a una sola concentración. En cualquier caso, también se analiza una muestra de bacterias que no ha sido expuesta al antibiótico utilizando la citometría de flujo de impedancia para obtener la marcación-análisis o contorno de la población de referencia descrita anteriormente.

Como ejemplo no limitante, las muestras para el análisis de punto de corte basado en citometría de flujo de impedancia se pueden preparar de la siguiente manera. Se seleccionan tres colonias de bacterias de una placa y se agregan a 3 mL de MHB. Esta muestra se agita en vórtex para resuspender las bacterias en el caldo y después se diluye a una concentración de 5×10^5 células/mL en MHB. Después, la muestra se incuba durante treinta minutos para obtener un cultivo que se divide activamente. Se añaden alícuotas de 500 μL a los tubos de ensayo que contienen 500 μL de MHB precalentado, cada uno con una concentración final de antibiótico en el punto de corte clínico (S/NS y/o R/NR), por ejemplo, de acuerdo con las directrices actuales de EUCAST. Estos pueden ser 2 mg/L (S/NS) y 16 mg/L (R/NR) para el antibiótico meropenem, o 1 mg/L para ciprofloxacina, u 8 mg/L para gentamicina, o 4 mg/L para colistina, u 8 mg/L para ceftazidima, amoxicilina/ácido clavulánico y cefoxitina, junto con una muestra de control a 0 mg/L. Cada tubo se incuba durante treinta minutos (exposición a antibióticos) antes de que la muestra se diluya a un nivel de 1:10 en HBSS, y se agregan perlas de referencia de 1,5 μm . Las muestras se pueden pasar a través de un aparato de citometría de flujo de impedancia a una velocidad de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante un período de medición de 2 minutos.

La Figura 19 muestra gráficos de barras de datos de ejemplo medidos usando citometría de flujo de impedancia para realizar el análisis del punto de corte. Once cepas diferentes de bacterias fueron expuestas al antibiótico meropenem. Los gráficos muestran, para cada cepa, el porcentaje de la población bacteriana restante en la marcación-análisis o contorno de referencia (medido para una muestra no expuesta de la bacteria) después de la exposición al antibiótico. La Figura 19(a) muestra datos para el punto de corte susceptible/no susceptible (S/NS), para el cual la concentración de antibiótico es de 2 mg/L y la Figura 19(b) muestra datos para el punto de corte resistente/no resistente (R/NR), para el cual la

concentración de antibiótico es de 16 mg/L. Las bacterias están etiquetadas como KP (*Klebsiella pneumonia*), EC (*Escherichia coli*), ACB (*Acinetobacter baumannii*) y PAE (*Pseudomonas aeruginosa*). Las barras muestran un valor medio \pm la desviación estándar (N = 3; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 con valores de p obtenidos mediante la prueba t de Student para muestras independientes (una cola)). El sombreado de las barras representa la sensibilidad y resistencia determinadas por la técnica convencional de microdilución de caldo, donde el sombreado más denso indica cepas resistentes y el sombreado intermedio indica cepas susceptibles. Existe una buena correspondencia entre estas designaciones y el porcentaje medido de células en la marcación-análisis de control, lo que indica que la citometría de flujo de impedancia es una técnica precisa para realizar el análisis del punto de corte. La barra menos densamente sombreada en cada gráfico es para KP (CNCR), que es una cepa negativa de carbapenemasa de KP que es resistente a los carbapenémicos.

La Figura 20 muestra un conjunto de gráficos de dispersión de datos obtenidos utilizando citometría de flujo de impedancia para cepas resistentes y susceptibles de tres bacterias, *Klebsiella Pneumonia* (KP), *Escherichia Coli* (EC) y *Staphylococcus aureus* (SA) expuestas a diferentes antibióticos, indicados en el encabezado de cada gráfico de dispersión. Los diversos antibióticos tienen diferentes mecanismos de acción para alterar el tamaño, la forma, la estructura y/o el recuento de células, lo que conduce a diferentes respuestas de impedancia que pueden detectarse mediante la citometría de flujo de impedancia. Esto se puede apreciar a partir de los diversos movimientos diferentes de los puntos de datos que indican las poblaciones de células en relación con los contornos de la marcación-análisis. Las bacterias resistentes no se ven afectadas por los antibióticos, por lo que las poblaciones permanecen dentro de los contornos de la marcación-análisis. Las bacterias susceptibles se ven afectadas por los antibióticos, por lo que las poblaciones se ven alteradas con respecto al tamaño, forma y posición de los contornos de las marcaciones-análisis. Las concentraciones de antibióticos estaban en las concentraciones del punto de corte R/NR para las diversas cepas de bacterias/combinación de antibióticos.

Los gráficos de dispersión para los antibióticos colistina, gentamicina, ciprofloxacina, ceftazidima y co-amoxiclav se muestran como tamaño o radio de celda eléctrica (siendo la raíz cúbica de la impedancia de baja frecuencia medida (5MHz) como se explicó anteriormente) frente a la opacidad eléctrica (siendo la impedancia de alta frecuencia medida (40 MHz) normalizada a la impedancia de baja frecuencia como se explicó anteriormente). El gráfico de dispersión para la cefoxitina se muestra como el tamaño de la celda eléctrica frente a la impedancia de fase de alta frecuencia medida (40 MHz) porque esta medida da una diferencia más clara entre resistente y susceptible para el mecanismo antibiótico particular de la cefoxitina.

También se incluye en la Figura 20 un gráfico de barras similar a los de la Figura 19, que muestra el porcentaje de células que quedan en el contorno de la marcación-análisis para cada combinación de bacteria/antibiótico. Nuevamente, el sombreado más denso y el sombreado menos denso corresponden respectivamente a la resistencia y sensibilidad determinadas por microdilución de caldo convencional, para mostrar que se pueden obtener resultados comparables utilizando citometría de flujo de impedancia.

Los métodos de citometría de flujo de impedancia de acuerdo con los ejemplos y realizaciones de la presente ofrecen una serie de beneficios. Las pruebas y mediciones se pueden llevar a cabo rápidamente y con una sensibilidad mejorada, particularmente para partículas más pequeñas como las bacterias, por lo que los métodos son valiosos para las AST y otros ensayos de microorganismos. El aparato adecuado para realizar los métodos puede ser compacto, potencialmente portátil y económico, como un formato basado en chips que se presta a la producción en masa y la escalabilidad para múltiples pruebas simultáneas. En el contexto de la prueba de sensibilidad de los microorganismos a los agentes antimicrobianos, las pruebas pueden ser rápidas y simples, y económicas, ya que no se requiere tinte u otro medio de etiquetado. Esto también permite el monitoreo continuo de la respuesta de cualquier muestra dada a los agentes antimicrobianos durante un período de tiempo prolongado, lo que generalmente no es posible en los procedimientos de prueba basados en tintes, como la citometría óptica.

Como ejemplo de la velocidad mejorada de las pruebas que ofrece la citometría de flujo de impedancia, considere el caso de un paciente en una sala de cuidados intensivos que presenta una infección del tracto urinario y se le prescribe inmediatamente el antibiótico co-amoxiclav como el estándar convencional para tratar esta afección. La muestra del paciente se envía para su análisis dentro de la unidad de microbiología del hospital y después de un cultivo nocturno de las bacterias que dura 16 horas desde la recolección de la muestra, el aislado se identifica como *E. coli* utilizando, por ejemplo, un sistema Biotyper fabricado por Bruker, que tarda otras 2 horas más o menos. Esta identificación puede conducir a un cambio en el antibiótico a un tipo considerado más adecuado, seguido de un período adicional de un día más o menos en el que la observación del paciente indica si la bacteria es resistente al antibiótico, en el que un cambio adicional de antibiótico. Por el contrario, las AST rápida utilizando un citómetro de flujo de impedancia realizado en la marca de 16 horas con uno o más tipos de antibióticos puede identificar un antibiótico al que la bacteria es susceptible en un período de solo 30 minutos, de modo que se pueda optimizar la prescripción. Por ejemplo, se puede encontrar que la cepa de *E. coli* es resistente a co-amoxiclav, pero susceptible a meropenem.

Los métodos descritos en la presente se pueden utilizar para medir y analizar partículas de origen no biológico, por lo que los ejemplos se pueden considerar más generalmente como métodos de medición de impedancia de partículas, que se pueden realizar utilizando aparatos configurados (por ejemplo, en lo que respecta a sus dimensiones) para su uso con partículas biológicas (en particular células que pueden o no ser bacterias) o partículas no biológicas, o cualquier tipo de

partícula. Los términos "citometría de flujo de impedancia", "método de citometría de flujo de impedancia", "citómetro de flujo de impedancia" y "aparato de citometría de flujo de impedancia" pretenden cubrir cualquier método y aparato como se describe en la presente independientemente de la naturaleza de las partículas, aunque en algunos ejemplos el tipo de partícula es relevante, tal como la citometría de flujo de impedancia para la determinación de las AST y MIC. La divulgación no está limitada a este respecto.

La citometría de flujo de impedancia se puede utilizar para medir las propiedades eléctricas (impedancia) de las bacterias sin ningún tinte. La técnica puede medir directamente la respuesta fenotípica de un organismo y no requiere incubación con un tinte. Además, la tecnología se puede llevar a cabo en aparatos compactos y escalables, de modo que se pueden realizar varias mediciones en paralelo utilizando un diseño personalizado de chip con múltiples canales. Las propiedades eléctricas se pueden medir continuamente como una función del tiempo para determinar la evolución de la respuesta a los antimicrobianos. Esto generalmente no se hace usando tintes, ya que se lavan antes de las mediciones.

Las diversas realizaciones descritas en la presente se presentan solo para ayudar a comprender y enseñar las características reivindicadas. Estas realizaciones se proporcionan como una muestra representativa de realizaciones solamente, y no son exhaustivas y/o exclusivas. Debe entenderse que las ventajas, realizaciones, ejemplos, funciones, características, estructuras y/u otros aspectos descritos en la presente no deben considerarse limitaciones en el alcance de la invención según lo definido por las reivindicaciones o limitaciones en equivalentes a las reivindicaciones, y que se pueden utilizar otras realizaciones y se pueden realizar modificaciones sin apartarse del alcance de la invención reivindicada. Diversas realizaciones de la invención pueden comprender adecuadamente, consistir en, o consistir esencialmente en, combinaciones apropiadas de los elementos, componentes, características, partes, etapas, medios, etc. descritos, distintos de los descritos específicamente en la presente. Además, esta descripción puede incluir otras invenciones no reivindicadas actualmente, pero que pueden reivindicarse en el futuro.

Referencias

WO 2012/164547

MJ Pucci *et al*, "Inhibition of beta-lactam antibiotics at two different times in the cell cycle of *Streptococcus faecium* ATCC 9790", *Bacteriology* 165 682-688, 1986

REIVINDICACIONES

1. Un método de prueba de sensibilidad a agentes antimicrobianos que comprende:

5 preparar muestras de microorganismos (42) suspendidos en un electrolito, que comprende una primera muestra de los microorganismos no expuestos a agentes antimicrobianos y una segunda muestra del microorganismo expuesto a un agente antimicrobiano;
 pasar la primera muestra a través de un citómetro de flujo de impedancia (10) para obtener una primera señal de impedancia que representa uno o más componentes de los valores de impedancia de los microorganismos no expuestos;
 10 pasar la segunda muestra a través del citómetro de flujo de impedancia para obtener una segunda señal de impedancia que representa uno o más componentes de los valores de impedancia de los microorganismos expuestos;
 comparar la primera señal de impedancia y la segunda señal de impedancia; y
 determinar una sensibilidad de los microorganismos al agente antimicrobiano con base en cualquier diferencia entre la primera señal de impedancia y la segunda señal de impedancia.

15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende preparar muestras adicionales de los microorganismos, cada una expuesta a una concentración diferente del agente antimicrobiano;

20 pasar cada muestra adicional a través del citómetro de flujo de impedancia para obtener una señal de impedancia adicional correspondiente;
 comparar cada señal de impedancia adicional con la primera señal de impedancia; y
 determinar una concentración mínima del agente antimicrobiano al que son susceptibles los microorganismos con base en cualquier diferencia entre la primera señal de impedancia y la segunda señal de impedancia y las señales de impedancia adicionales.

25 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que preparar las muestras de microorganismos comprende incluir los microorganismos para la primera muestra, la segunda muestra y cualquier muestra adicional en un volumen de electrolito para producir una única muestra y agregar el agente antimicrobiano a la única muestra; y el método comprende:

30 pasar la muestra individual a través del citómetro de flujo de impedancia;
 obtener señales de impedancia para la muestra única en dos o más intervalos de tiempo durante el paso de la muestra única, en donde la señal de impedancia en un primer intervalo de tiempo es la primera señal de impedancia, la señal de impedancia en un segundo intervalo de tiempo es la segunda señal de impedancia; y las señales de impedancia en intervalos de tiempo posteriores son señales de impedancia adicionales; e
 35 incluir las señales de impedancia adicionales en la comparación y la determinación, de modo que la determinación se basa en cualquier diferencia entre las señales de impedancia.

40 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que preparar las muestras de microorganismos comprende incluir los microorganismos para la primera muestra, la segunda muestra y cualquier muestra adicional en un volumen de electrolito para producir una única muestra; y el método comprende:

pasar la muestra individual a través del citómetro de flujo de impedancia;
 obtener una señal de impedancia en un primer intervalo de tiempo durante el paso de la muestra única, siendo esta la primera señal de impedancia;
 45 agregar un agente antimicrobiano a la muestra única después del primer intervalo de tiempo; y
 obtener señales de impedancia adicionales en uno o más intervalos de tiempo adicionales durante el paso de la muestra única, en donde la señal de impedancia en un segundo intervalo de tiempo después del primer intervalo de tiempo es la segunda señal de impedancia y las señales de impedancia en intervalos de tiempo posteriores son señales de impedancia adicionales; e
 50 incluir las señales de impedancia adicionales en la comparación y la determinación, de modo que la determinación se basa en cualquier diferencia entre las señales de impedancia.

55 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la segunda muestra comprende el microorganismo expuesto a una concentración predefinida del agente antimicrobiano para su uso en el análisis del punto de corte del microorganismo, y la determinación de una sensibilidad comprende clasificar el microorganismo como susceptible, no susceptible, resistente o no resistente al agente antimicrobiano.

60 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la concentración del agente antimicrobiano en la segunda muestra es una concentración predefinida para indicar que el microorganismo es susceptible o no susceptible al agente antimicrobiano, y el método además comprende:

preparar una tercera muestra del microorganismo expuesto al agente antimicrobiano a una concentración más alta que la segunda muestra que está predefinida para indicar que el microorganismo es resistente o no resistente al agente antimicrobiano;
 65 pasar la tercera muestra a través del citómetro de flujo de impedancia para obtener una tercera señal de impedancia que representa uno o más componentes de los valores de impedancia de los microorganismos expuestos;

comparar la primera señal de impedancia y la tercera señal de impedancia; y la determinación de una sensibilidad comprende clasificar el microorganismo como susceptible o no susceptible con base en cualquier diferencia entre la primera señal de impedancia y la segunda señal de impedancia, y clasificar el microorganismo como resistente o no resistente con base en cualquier diferencia entre la primera señal de impedancia y la tercera señal de impedancia.

7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que los componentes de los valores de impedancia indican uno o más del tamaño del microorganismo, la forma del microorganismo, la estructura de la pared del microorganismo y la estructura interna del microorganismo.

8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende obtener las señales de impedancia usando trayectorias de corriente dispuestas a lo largo de más de una dirección con respecto a una dirección del paso de muestra a través del citómetro de flujo de impedancia de modo que los valores de impedancia indiquen una forma de los microorganismos.

9. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende obtener las señales de impedancia usando trayectorias de corriente dispuestas a lo largo de más de una dirección con respecto a una dirección de paso de muestra a través del citómetro de flujo de impedancia, y que además comprende deducir la rigidez de los microorganismos comparando las señales de impedancia obtenidas usando trayectorias de corriente con diferentes direcciones.

10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende obtener las señales de impedancia en más de una frecuencia.

11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende agregar partículas no biológicas tales como perlas a cada muestra para proporcionar información de referencia en las señales de impedancia para su uso en la compensación de fluctuaciones en las muestras y/o en el funcionamiento del citómetro de flujo de impedancia.

12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende determinar la fase y/o magnitud de las señales de impedancia para distinguir entre los microorganismos y las partículas no biológicas dentro de las señales de impedancia, y/o entre los microorganismos y cualquier especie de microorganismo diferente en las muestras.

13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, que además comprende usar la información de fase y/o magnitud para mejorar la resolución de las señales de impedancia obtenidas del citómetro de flujo de impedancia.

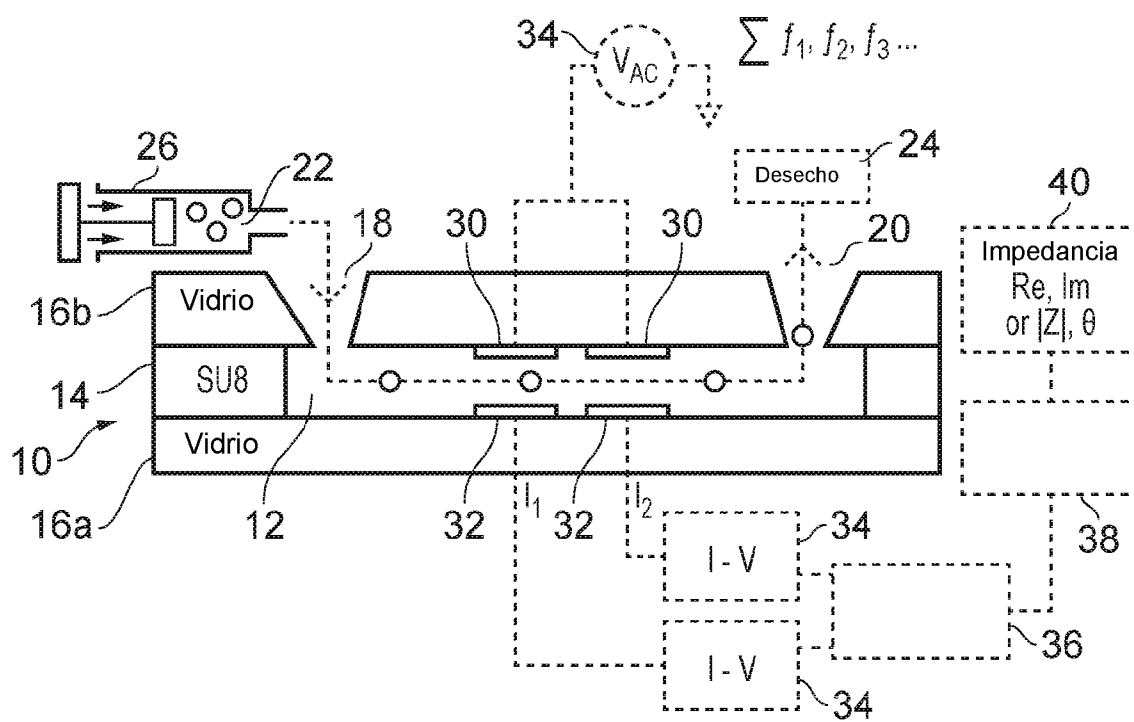


FIG. 1

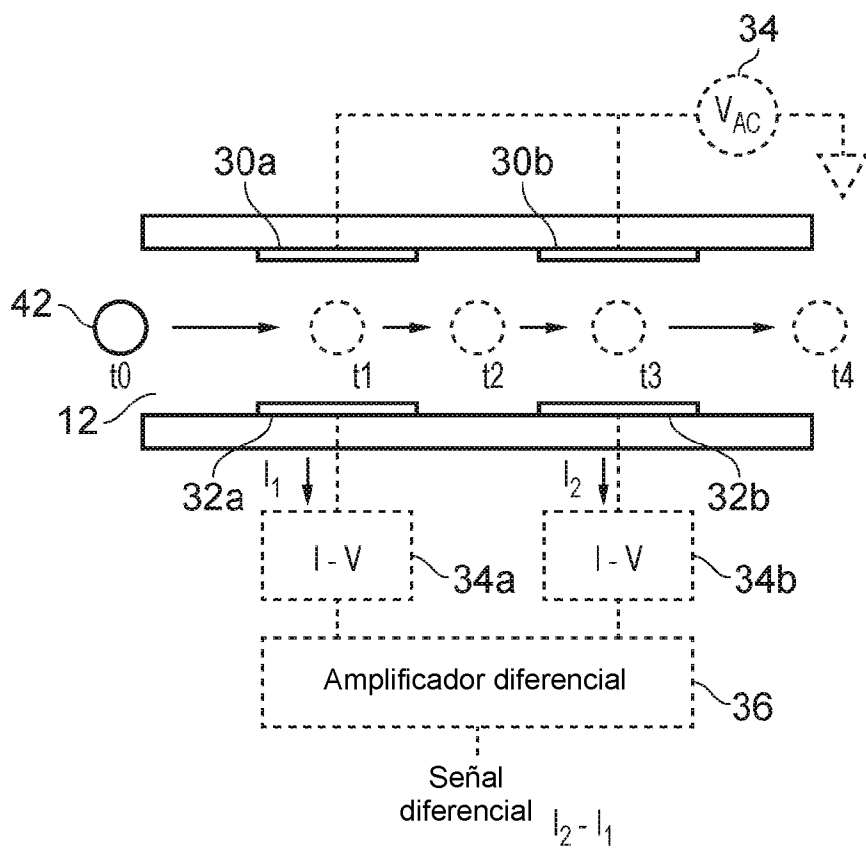


FIG. 2

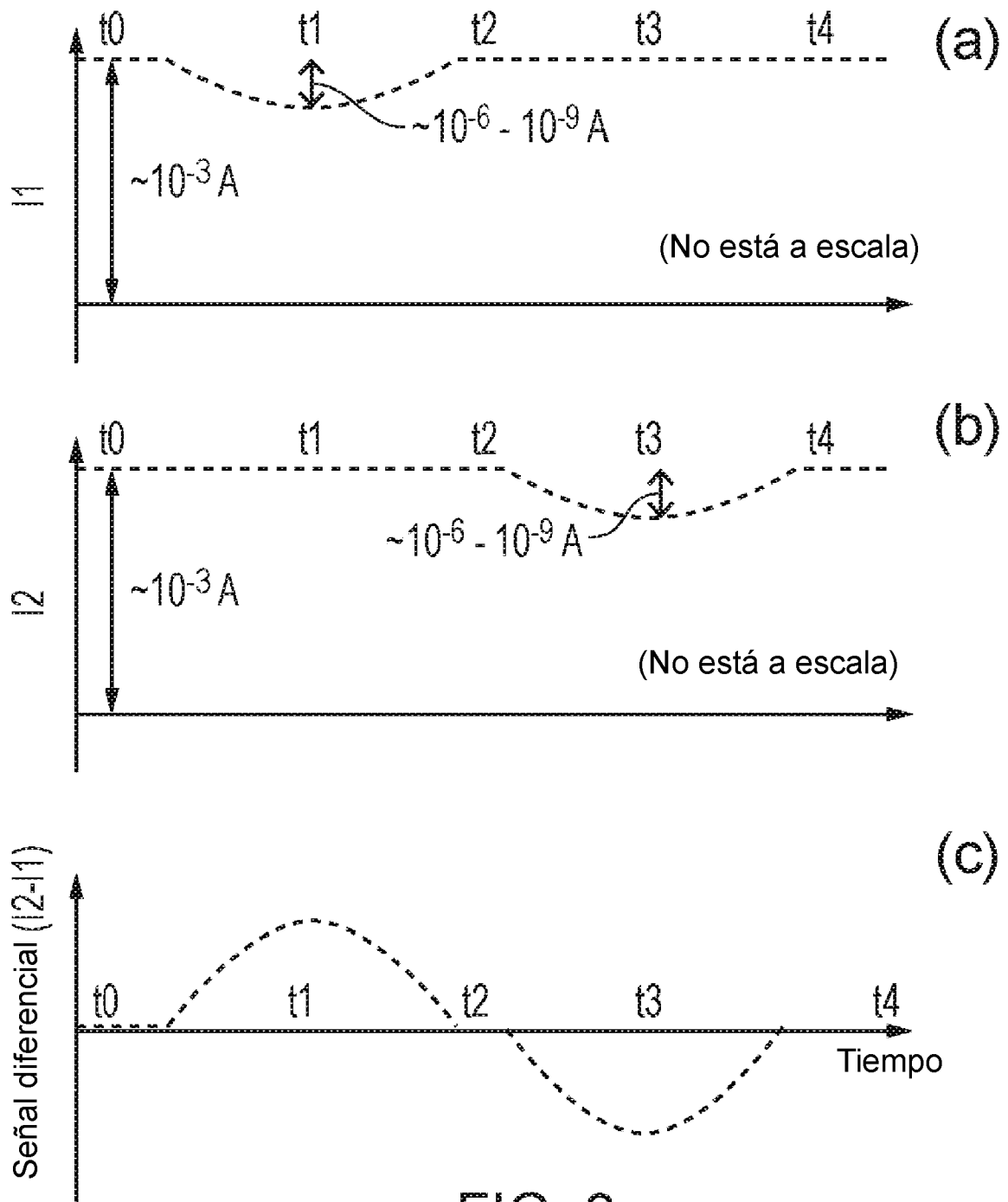


FIG. 3

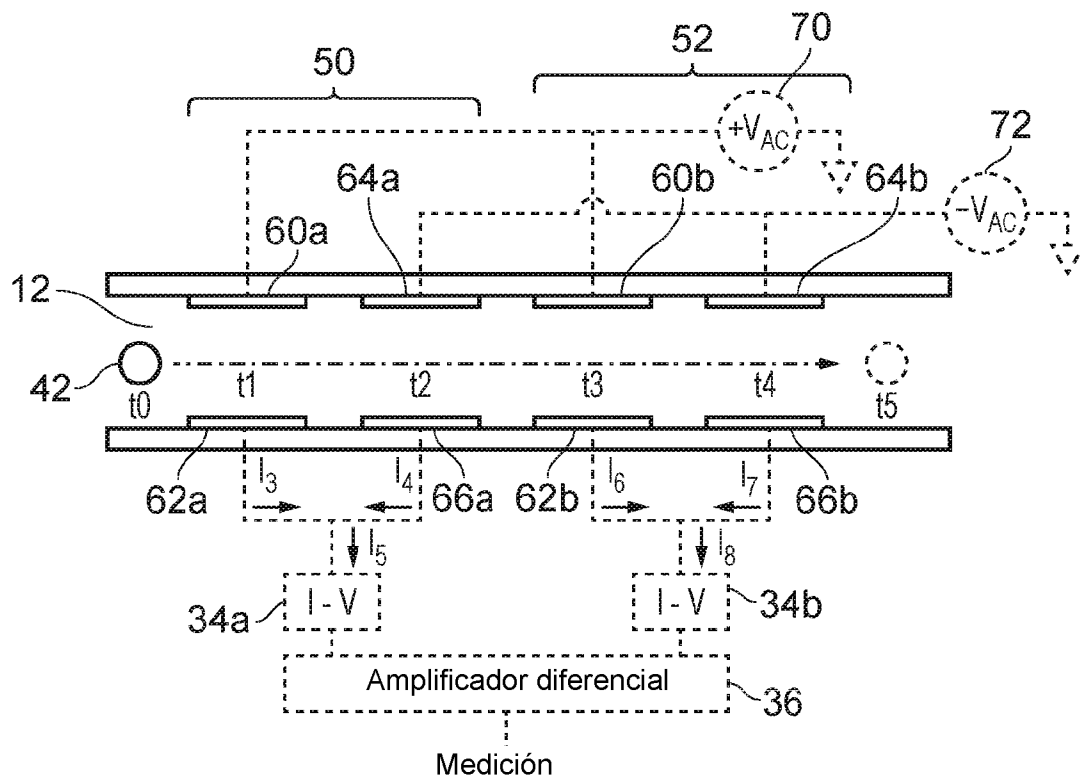


FIG. 4

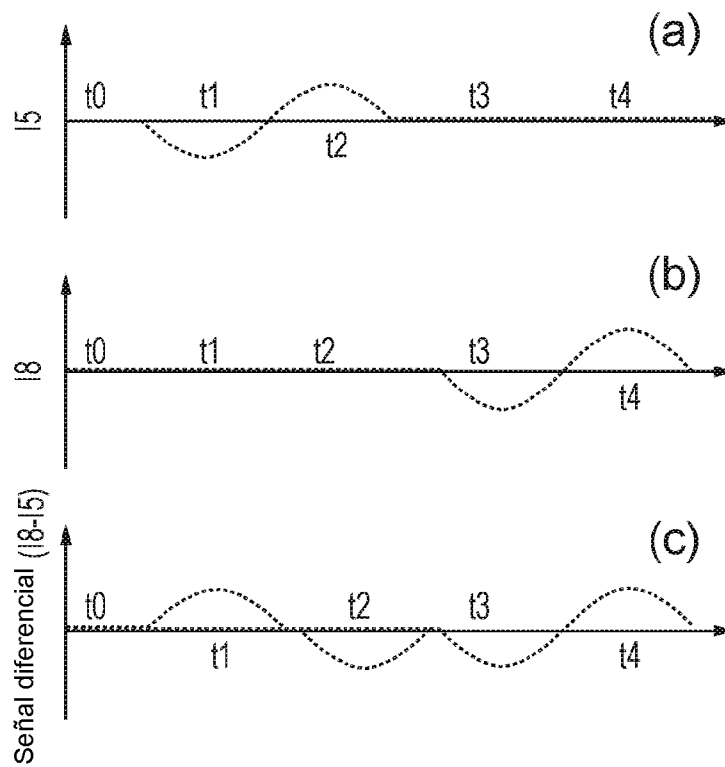


FIG. 5

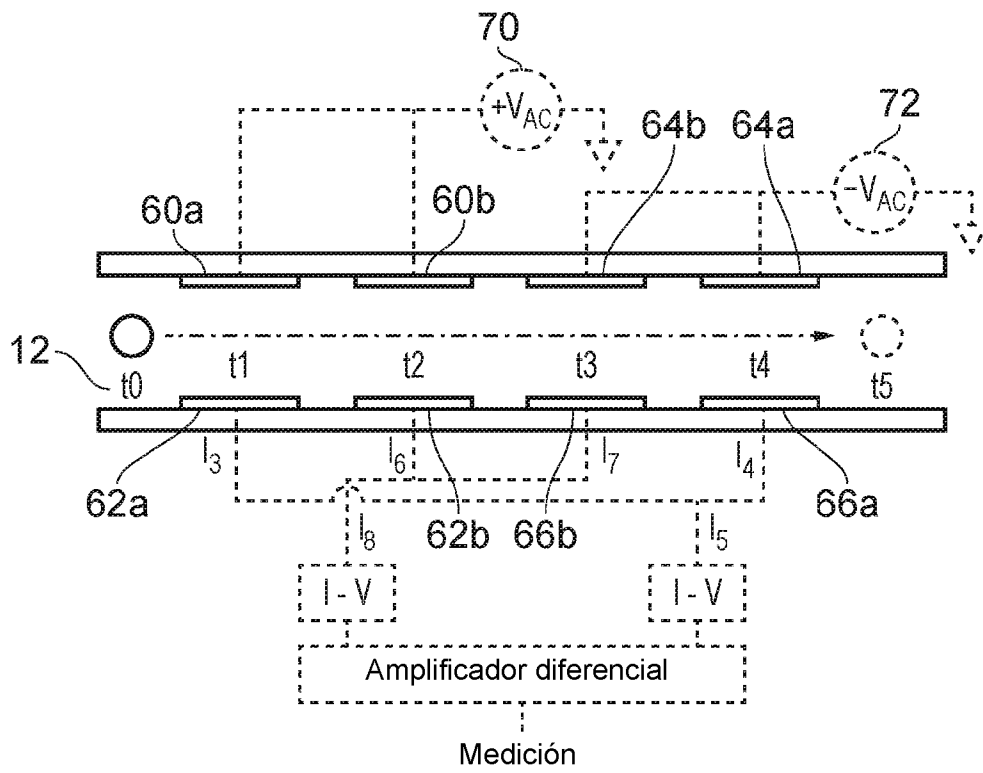


FIG. 6

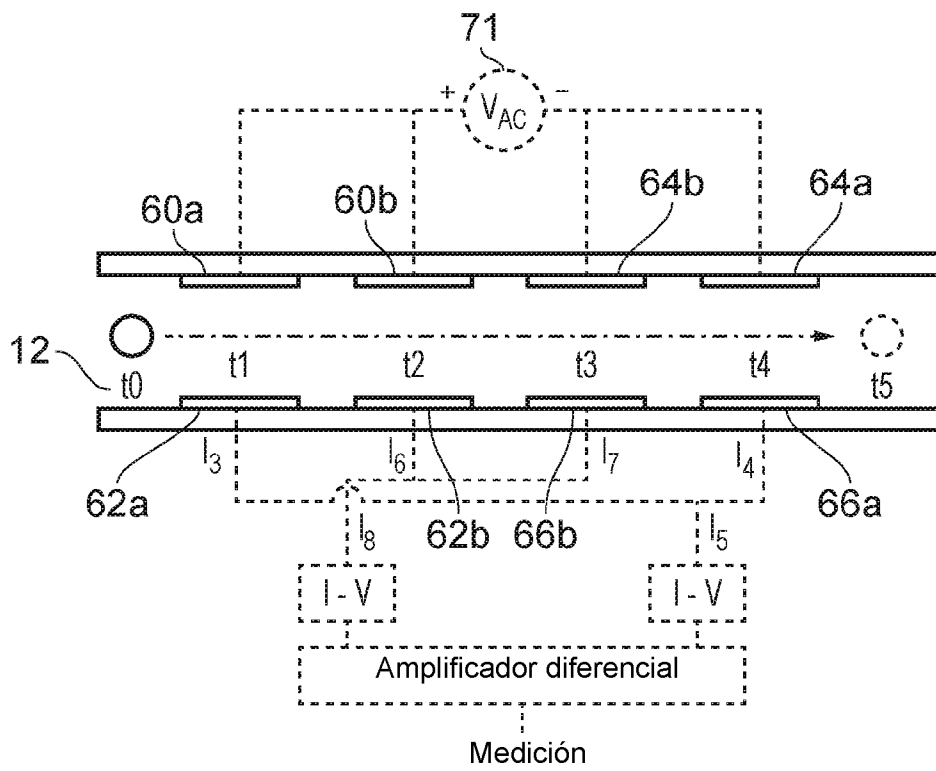


FIG. 7

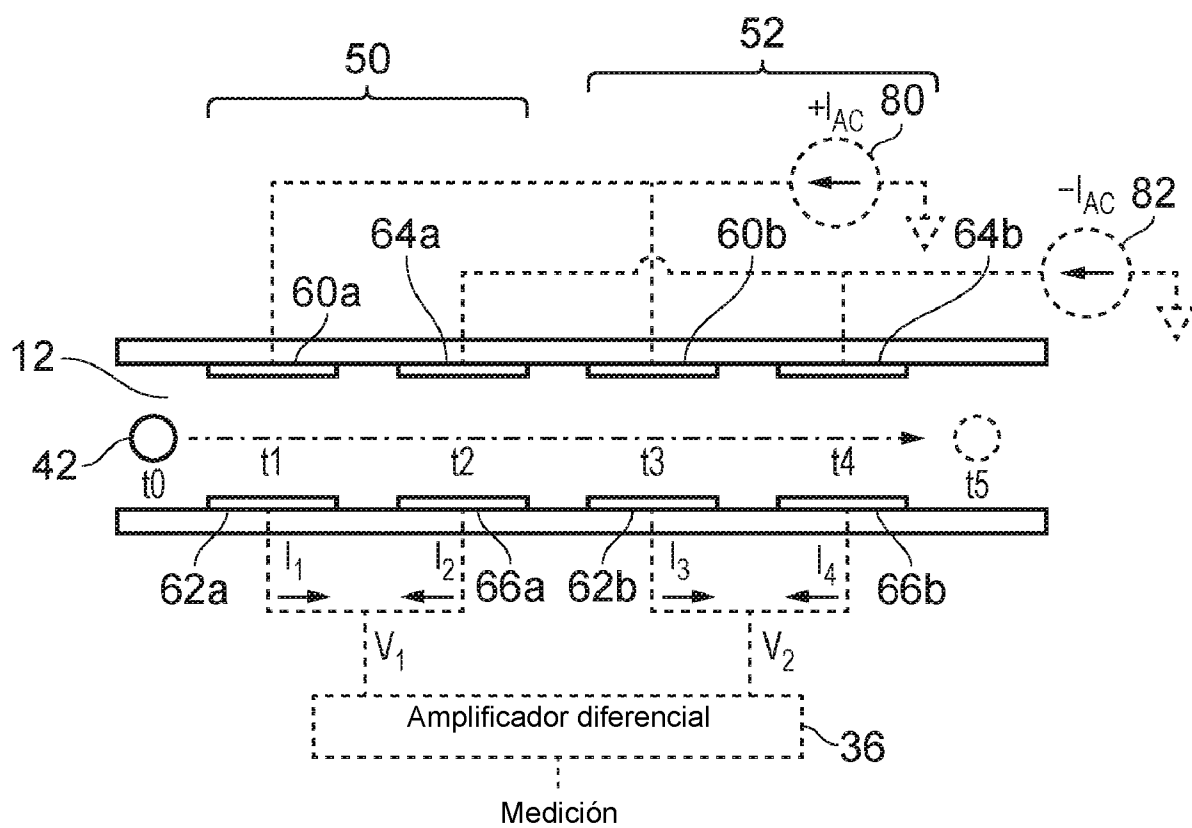


FIG. 8

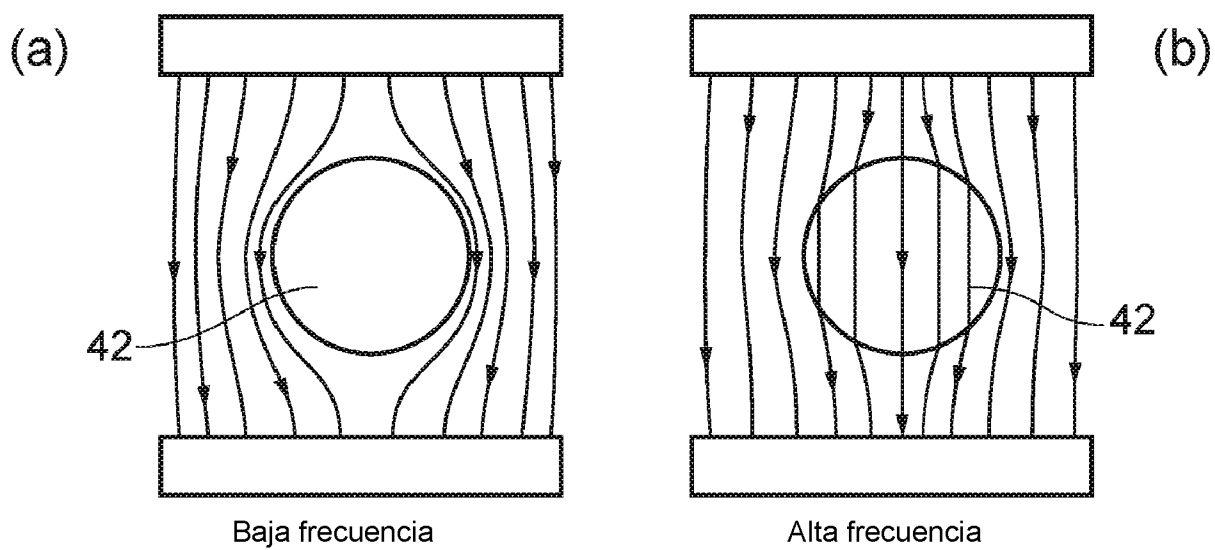


FIG. 9

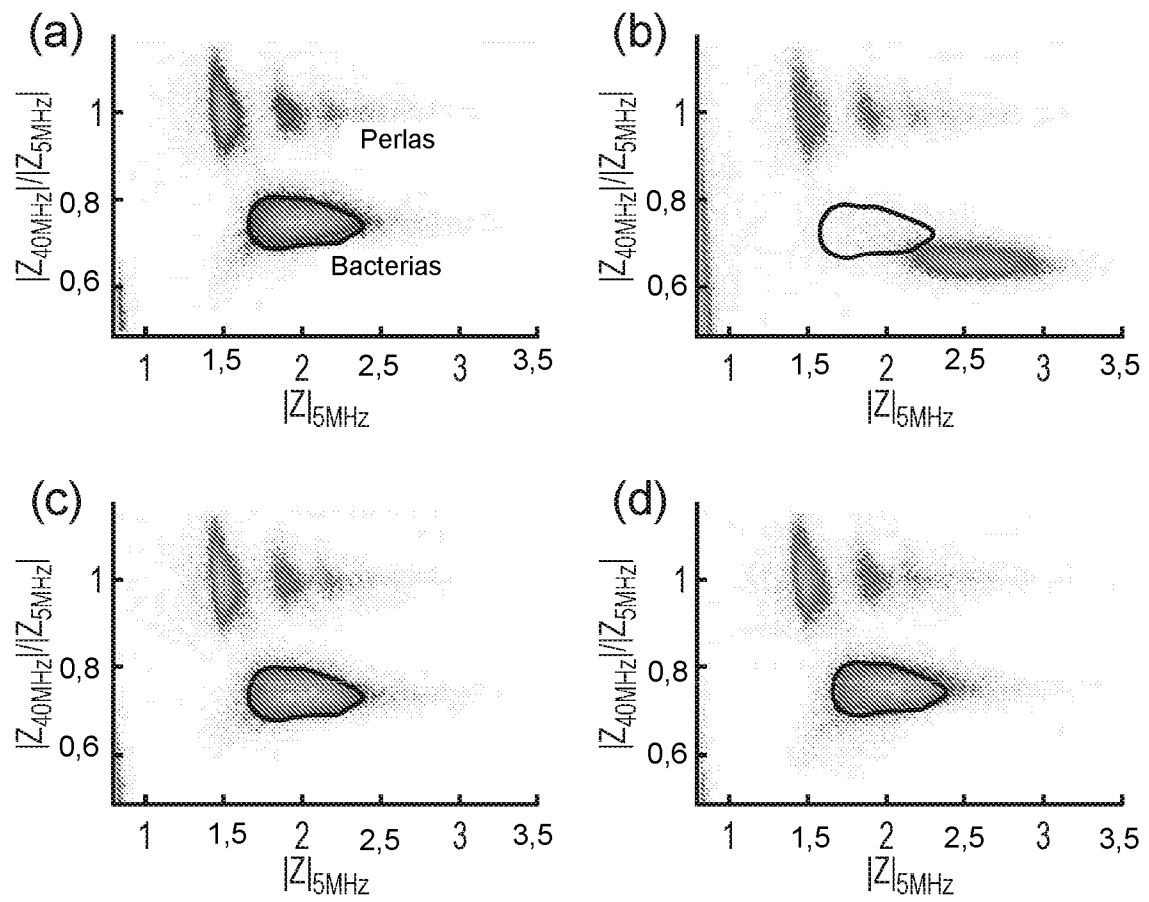


FIG. 10

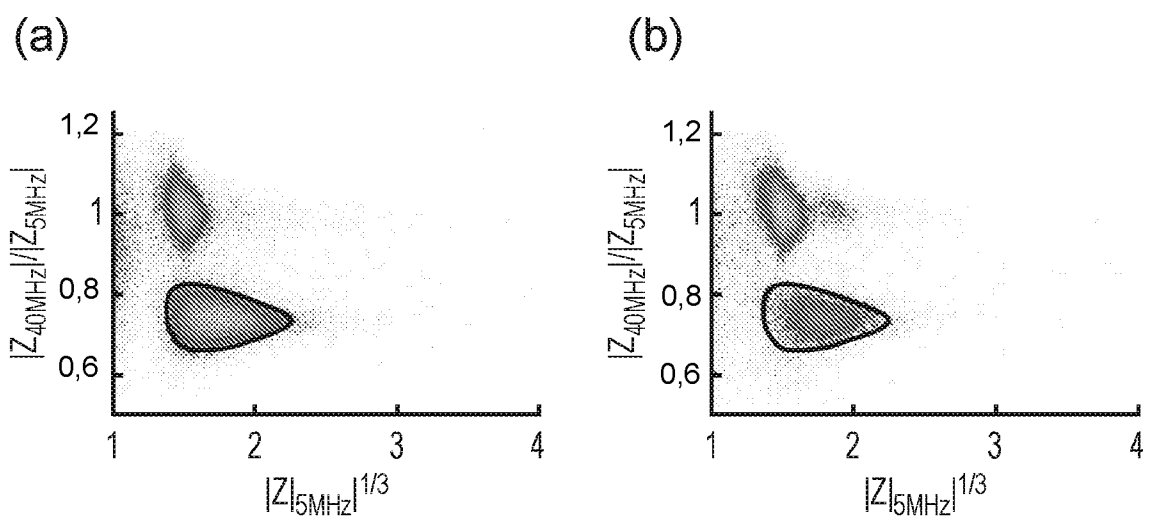


FIG. 11

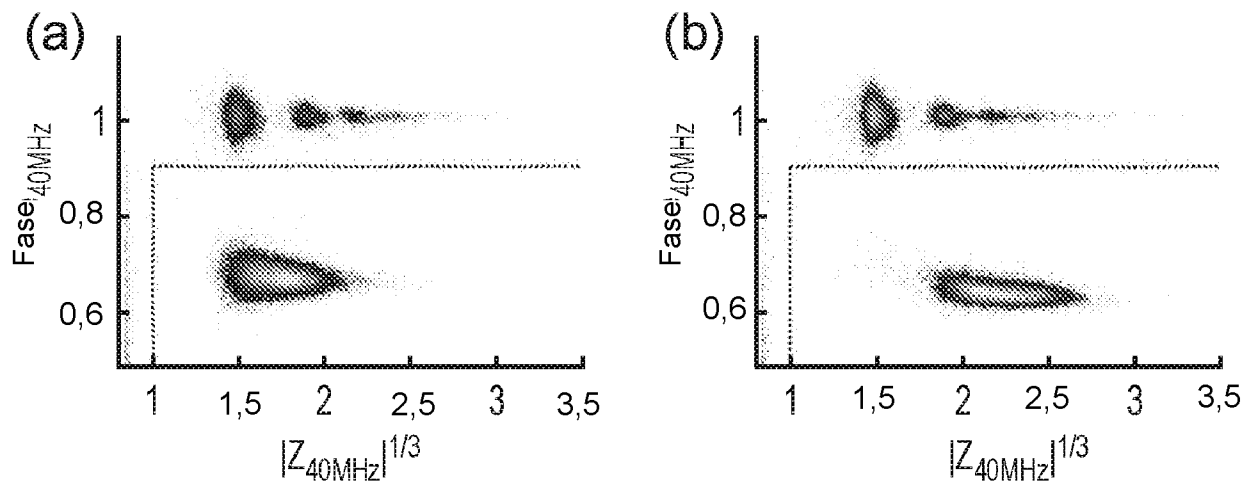


FIG. 12

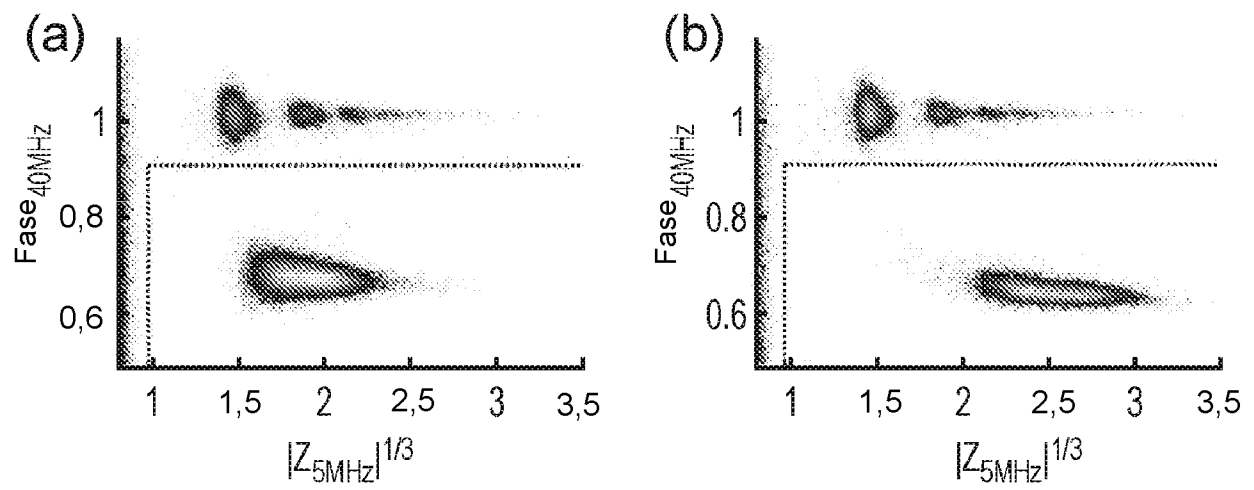


FIG. 13

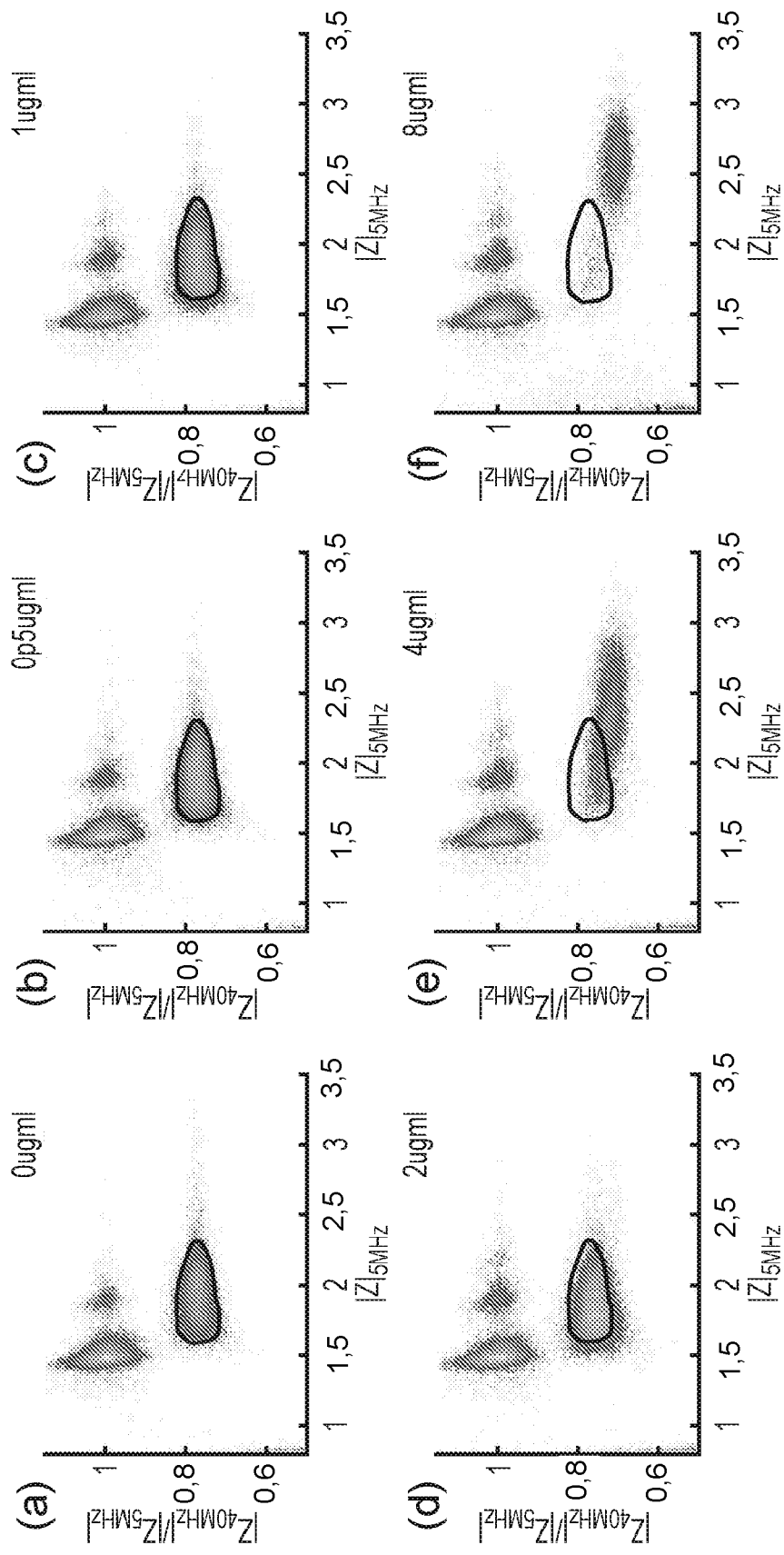


FIG. 14

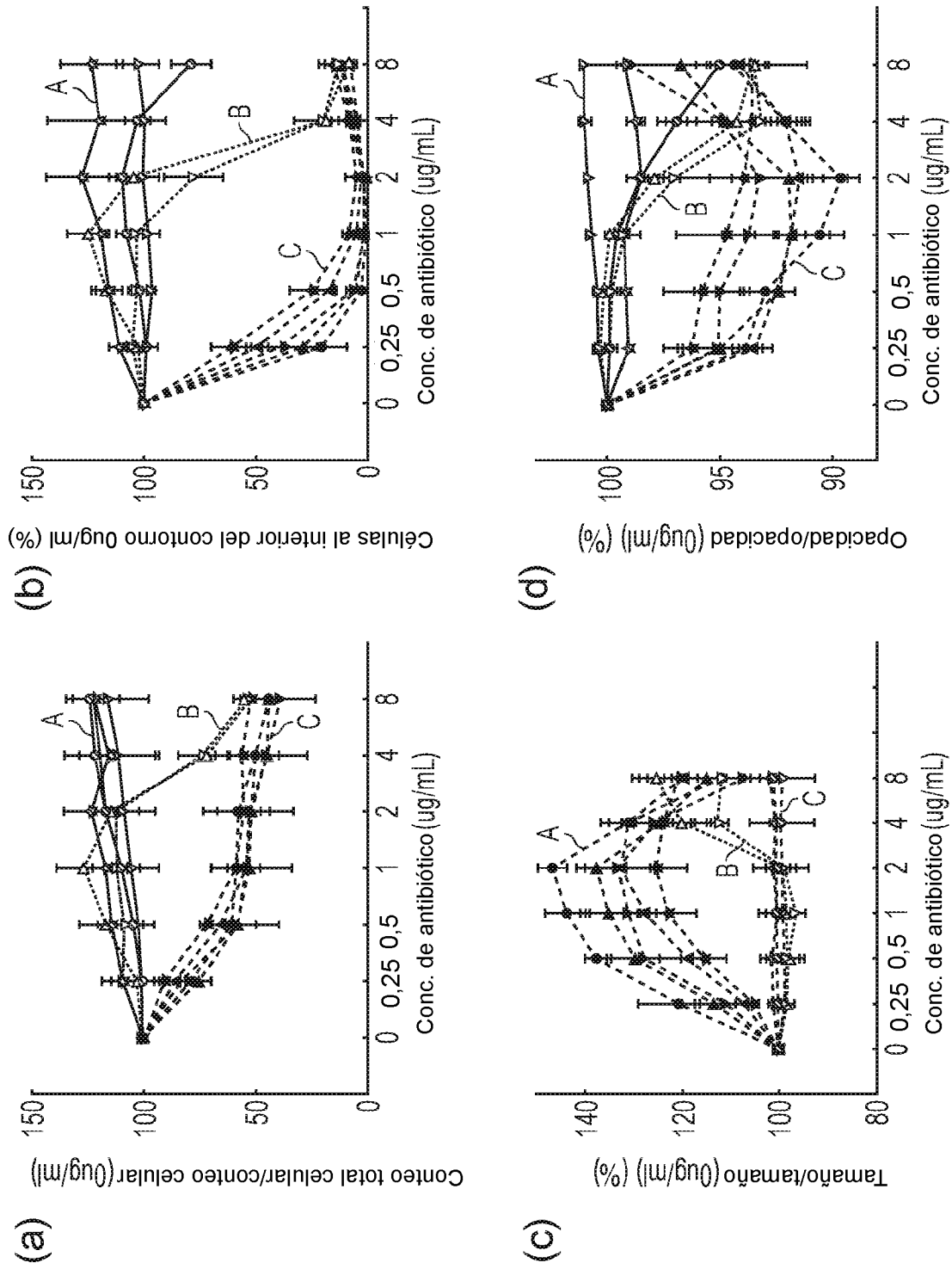


FIG. 15

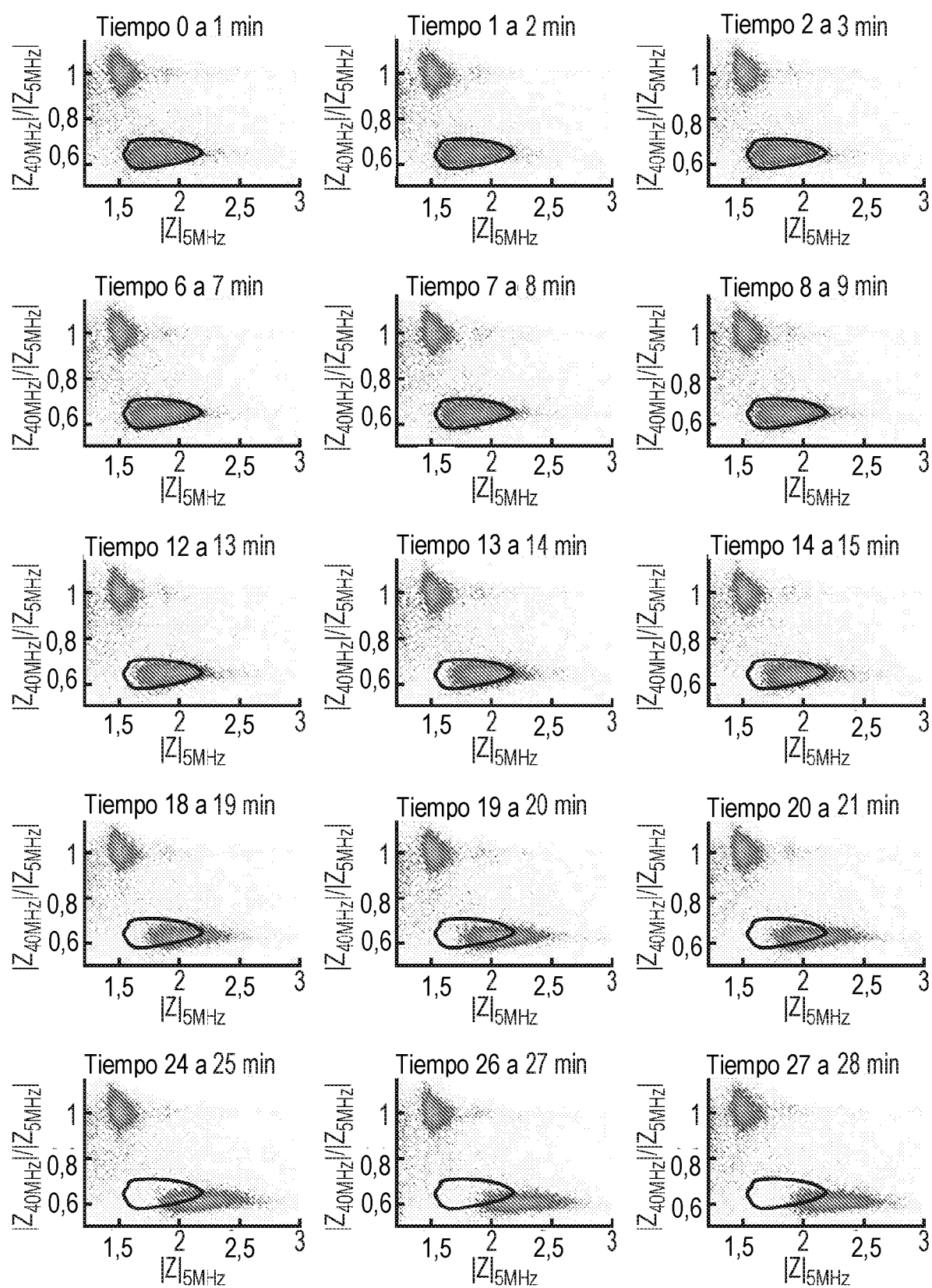


FIG. 16

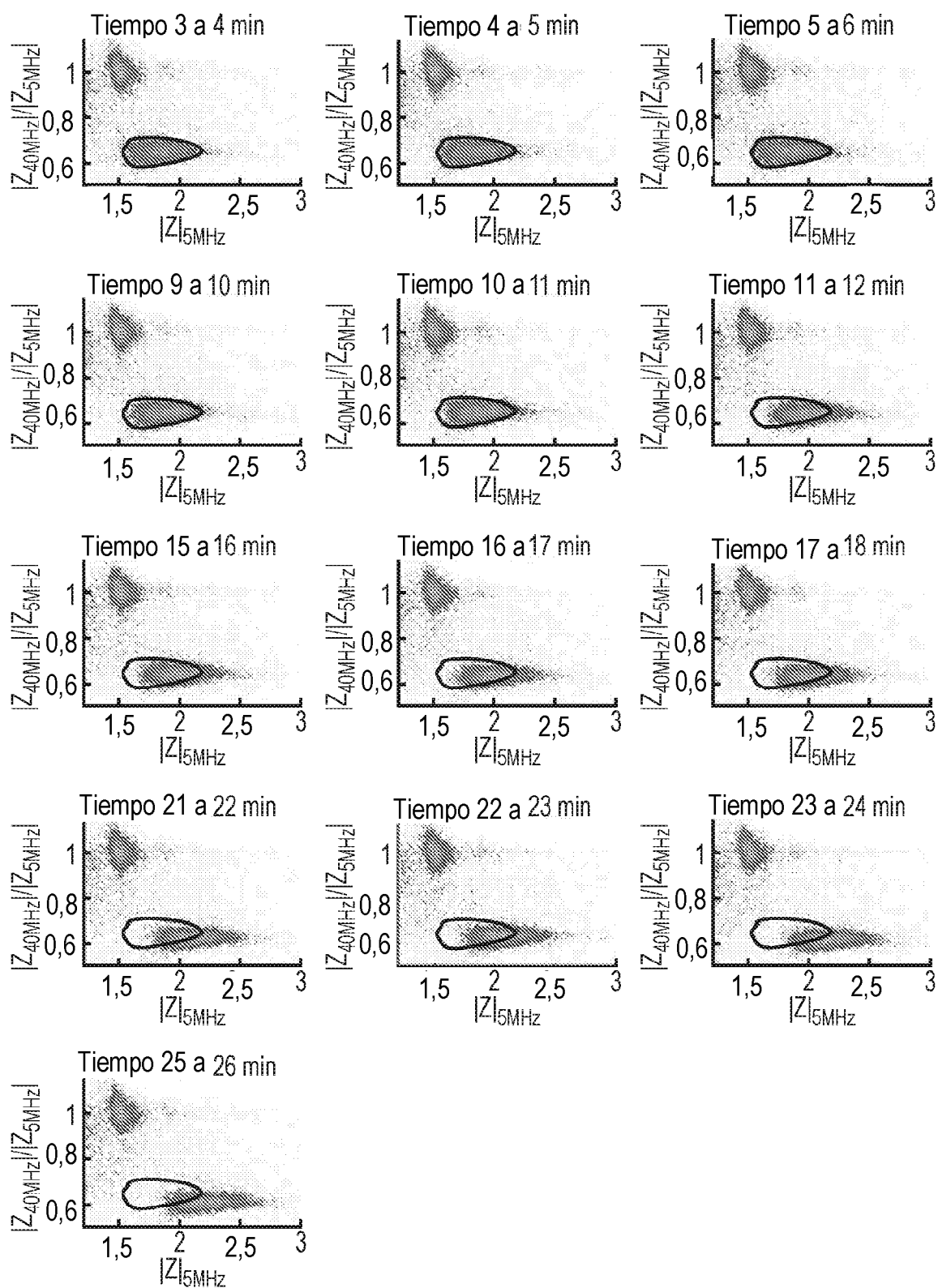


FIG. 16 (continuación)

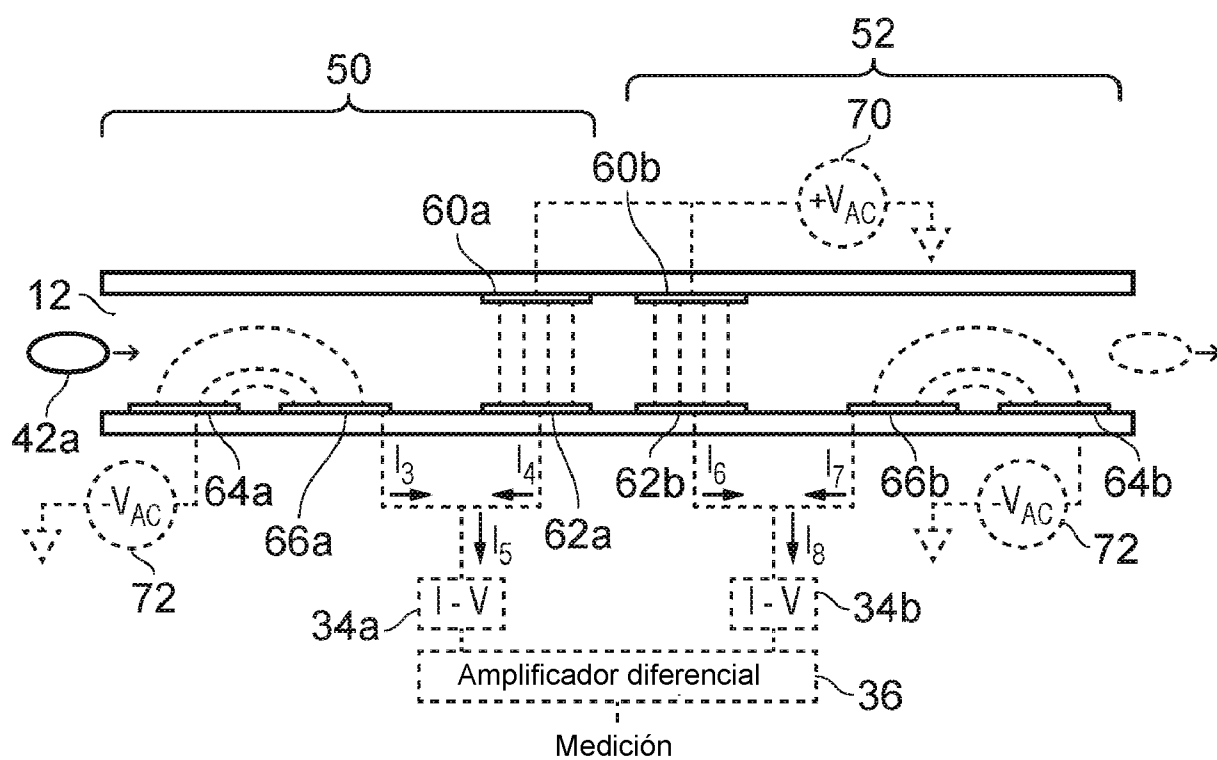


FIG. 17

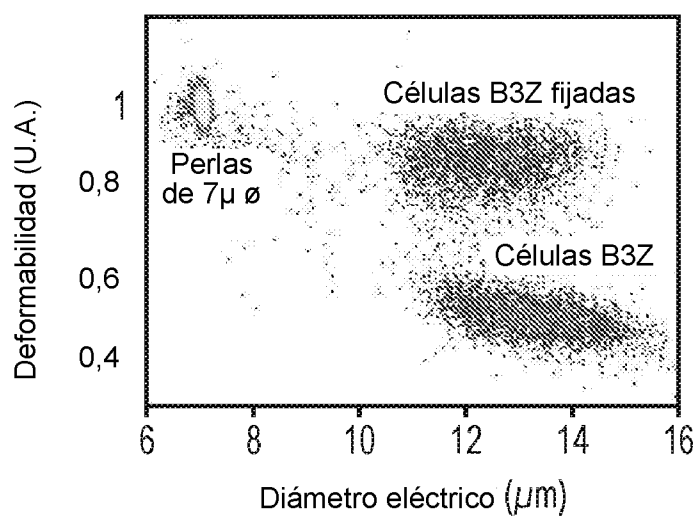


FIG. 18

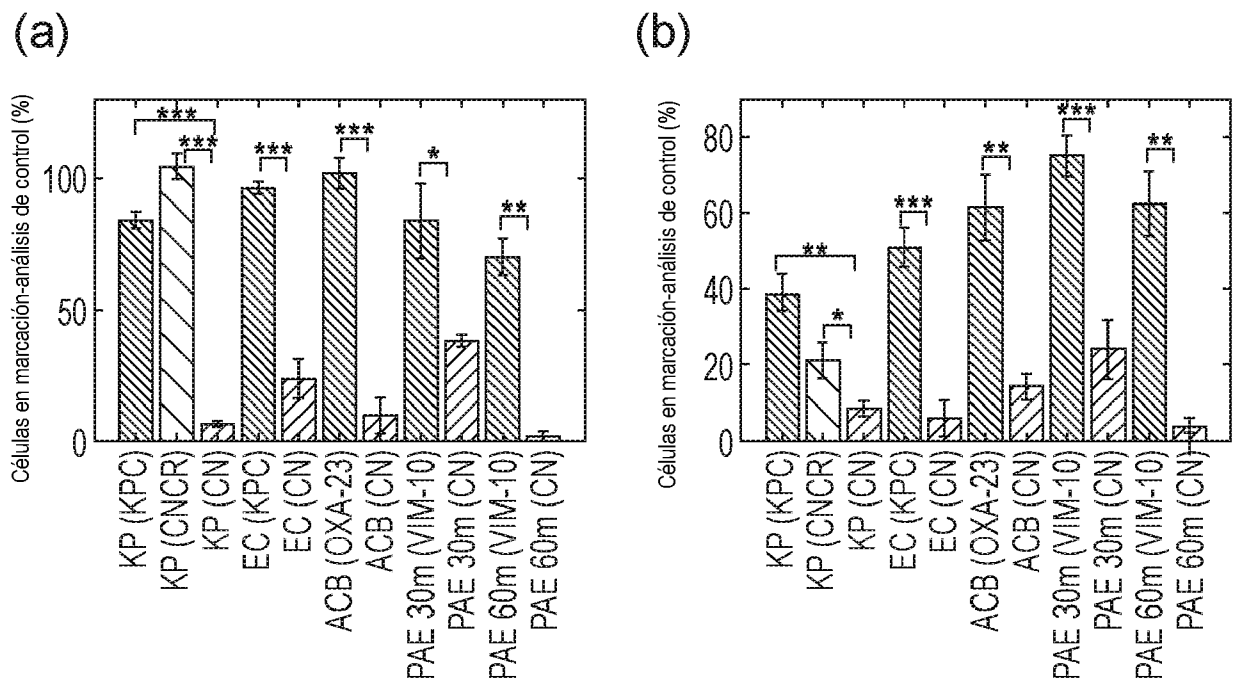


FIG. 19

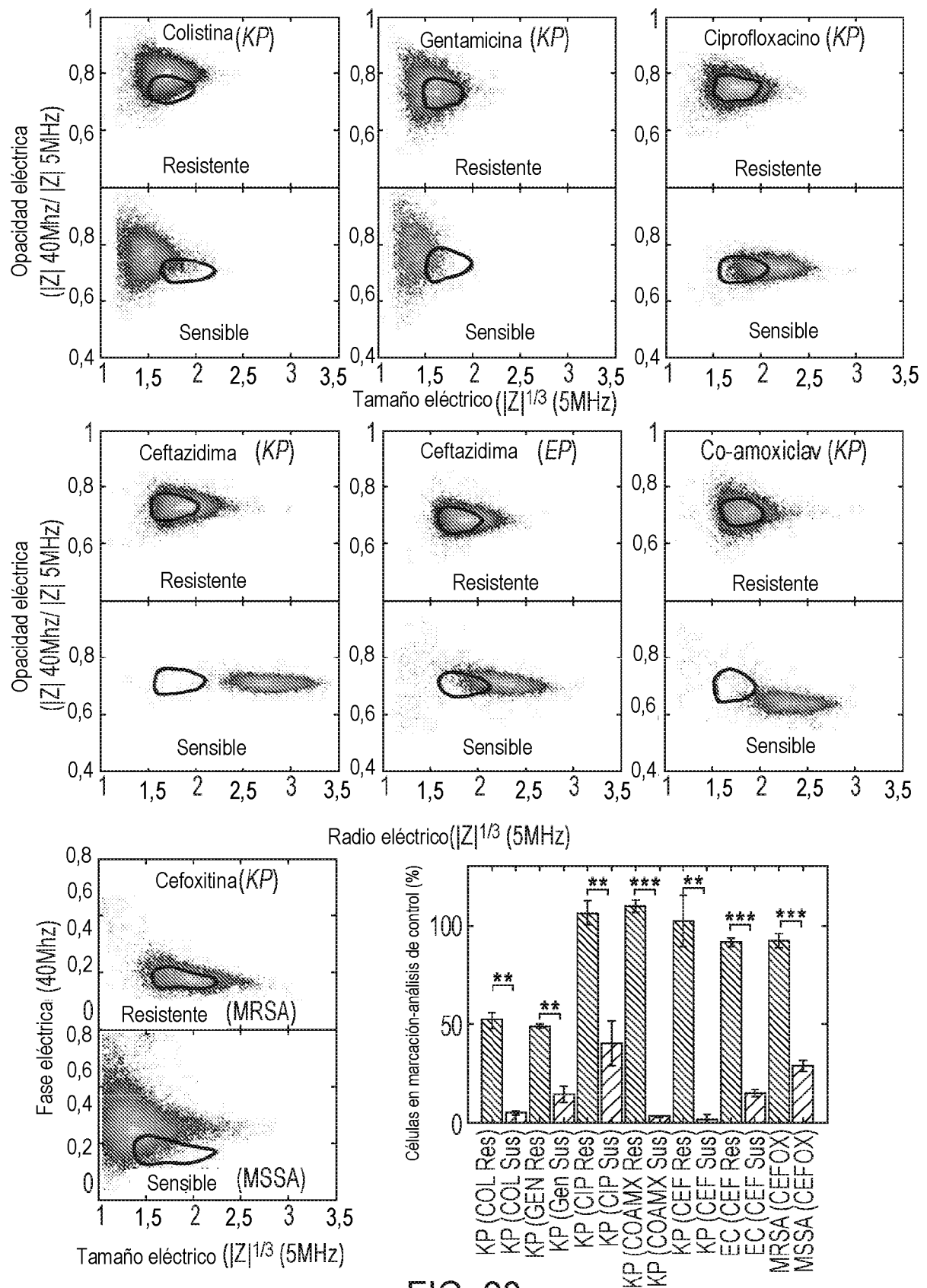


FIG. 20