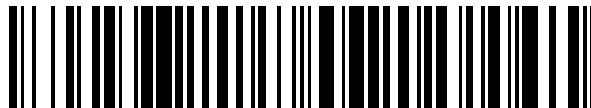


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 941 802**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/18 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

G01N 21/80 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2018 PCT/US2018/020181**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2018 WO18160668**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2018 E 18760618 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2023 EP 3583225**

54 Título: **Detección de resistencia a fármacos de microorganismos**

30 Prioridad:

01.03.2017 US 201762465691 P

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

25.05.2023

73 Titular/es:

**SPECIFIC TECHNOLOGIES LLC (100.0%)
500 Australian Avenue South Suite 120
West Palm Beach, Florida 33401, US**

72 Inventor/es:

**RHODES, PAUL A.;
CHAKRAVORTY, SOUMITESH y
LIM, SUNG HYUN**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 941 802 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

Detección de resistencia a fármacos de microorganismos

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica la prioridad y el beneficio de la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 62/465.691, presentada el 1 de marzo de 2017 y titulada "Detection of Drug Resistance of Microorganisms,".

10 **Campo de la invención**

Esta divulgación se refiere a la determinación de una susceptibilidad a antibióticos o resistencia de microorganismos.

Antecedentes

15 La resistencia antibiótica ahora se ha convertido en una amenaza global para los sistemas sanitarios. En los Estados Unidos, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) ha estimado recientemente que 2 millones de pacientes por año se ven afectados directamente por patógenos resistentes a antibióticos, lo que conduce a más de 23.000 muertes. Además, los costes de atención sanitaria relacionados con la resistencia a los antibióticos aumentan constantemente, ya que exceden los costes de más de \$20 mil millones anualmente con la inclusión de la pérdida de productividad, el coste total supera los \$35 mil millones. A pesar de las preocupaciones crecientes, los métodos actualmente disponibles requieren mucho tiempo y requieren una experiencia técnica significativa. La prueba de susceptibilidad antimicrobiana convencional (AST) incluye difusión en disco, dilución de agar, discos de gradiente de antibióticos y prueba de microdilución en caldo, que es el patrón de referencia actual.

25 La septicemia se diagnostica inicialmente a partir de signos y síntomas clínicos tales como alteraciones de temperatura corporal no explicada (hipertermia o hipotermia), taquicardia, taquipnea, vasodilatación periférica o choque. El diagnóstico clínico desencadena normalmente un amplio espectro de potentes tratamientos antibióticos que pueden o no ser apropiados para la infección específica, que se identifica por un hemocultivo posterior. La terapia antibiótica inapropiada duplica la mortalidad inducida por septicemia, que aumenta cada hora a partir del inicio del choque séptico hasta la administración de un antibiótico eficaz. Por tanto, cuanto más rápido se identifica un organismo causante, mejor será el resultado del paciente.

35 La susceptibilidad antibiótica se determina normalmente en un proceso de tres días que incluye una fase media de crecimiento de placas de dos días (a medida que las concentraciones iniciales en sangre de microorganismos pueden ser del orden de 3 o 5 UFC/ml) seguido de una prueba de susceptibilidad en un escáner automático. En algunos casos, el tratamiento con antibióticos eficaz de un paciente puede no comenzar hasta que se evalúa la susceptibilidad. Por tanto, sería ventajoso reducir la cantidad de tiempo requerida para evaluar la susceptibilidad a los antibióticos.

40 Uno de los primeros métodos de prueba de susceptibilidad antimicrobiana fue el método de macrocaldo o dilución de tubo. Este procedimiento implicó la preparación de diluciones dos veces de antibióticos (por ejemplo, 1, 2, 4, 8 y 16 pg/ml) en un medio de crecimiento líquido dispensado en los tubos de ensayo. Los tubos que contenían antibióticos se inocularon con una suspensión bacteriana estandarizada de 1-5x10⁵ UFC/ml. Después de la incubación durante la noche a 35 °C, los tubos se examinaron para determinar el crecimiento bacteriano visible tal como se evidencia por la turbidez. La concentración más baja de antibiótico que evitó el crecimiento representó la concentración inhibitoria mínima (CIM). Se consideró que la precisión de este método era de más o menos 1 dos veces las concentración, debido en gran parte a la práctica de preparar manualmente diluciones en serie de los antibióticos. La ventaja de esta técnica fue la generación de un resultado cuantitativo (es decir, la CIM). Las principales desventajas del método de macrodilución fueron la tarea tediosa, manual de preparación de las disoluciones antibióticas para cada prueba, la posibilidad de errores en la preparación de las disoluciones antibióticas y la cantidad relativamente grande de reactivos y espacio requeridos para cada prueba.

Actualmente, los sistemas de instrumentos se utilizan para estandarizar la lectura de los puntos finales y producir resultados de las pruebas de susceptibilidad. Por ejemplo, algunos instrumentos pueden incubar y analizar 40-96 bandejas de microdilución. Como en el método manual, los instrumentos monitorizan el pocillo para determinar cambios de turbidez para indicar la presencia o ausencia de bacterias.

60 Por consiguiente, actualmente no existen otros métodos para determinar directamente la susceptibilidad al medir si los organismos crecerán y reproducirán en presencia de antibióticos. Por tanto, la línea de tiempo requerida para determinar la susceptibilidad es relativamente larga, lo que conduce a muchos casos de muerte por septicemia que podrían evitarse si la detección se descubriera antes. La resistencia antimicrobiana es una exposición creciente en el cuidado de pacientes críticamente enfermos, entre los que la carga de infección permanece alta. Las tasas de escalado de la resistencia a los antibióticos se suman sustancialmente a la morbilidad, mortalidad y coste relacionado con la infección en la UCI. Tradicionalmente, la mayoría de los esfuerzos para comprender los problemas de resistencia y los resultados de la UCI han abordado organismos Gram positivos, tales como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

5 Sin embargo, en los Estados Unidos, las tendencias de alarma en cuanto a la resistencia también se informan para
 10 varios patógenos Gram negativos. Por ejemplo, los organismos de beta-lactamasa de espectro extendido (ESBL)
 ahora son endémicos en muchas UCI, y del 15 al 20 % de todos los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* de
 infecciones graves se clasifican como resistentes a múltiples fármacos (MDR) debido a la susceptibilidad in vitro
 reducida a tres o más clases de antibióticos. De incluso más preocupación son patógenos para los que los médicos
 tienen pocas opciones de antibióticos, concretamente *Acinetobacter baumannii* y *Enterobacteriaceae* que produce
 carbapenemasa (CPE). En el caso de estos organismos Gram negativos, los estudios también apuntan a una
 asociación entre la resistencia y los resultados clínicos y económicos. "Mechanisms of Antibiotic Resistance" de J. M.
 Munita y C. A. Arias in *Microbiol Spectr.* en 2016 proporciona varios ejemplos de resistencia a antibióticos. Diversas
 matrices de sensores colorimétricos se describen en las siguientes publicaciones de patentes: publicación de patente
 estadounidense 2015/0099694, concedida a Lim y col., y la publicación de patente internacional WO 2018/152372,
 concedida a Lim y col. El documento WO 2018/152372 es una novedad solo en el documento de la técnica anterior.
 15 El uso de matrices de sensores colorimétricos también se describe en el documento "Rapid Identification of Bacteria
 with Disposable Colorimetric Sensing Array" de J. R. Carey y col. en *J. Am. Chem. Soc.*, 2011.

Resumen

20 Los sensores colorimétricos se pueden utilizar para determinar una susceptibilidad de un microorganismo dado, o una
 muestra que se sospecha que contiene un microorganismo, o un antibiótico. En algunos aspectos, un sistema no
 según la presente invención podría utilizarse para identificar un tipo de bacterias u otro microorganismo (que ha
 infectado, por ejemplo, a un paciente) cultivando una muestra de sangre del paciente u otro mamífero en presencia
 de la matriz de sensores colorimétrica (CSA). Por consiguiente, si se sospecha que un paciente tiene septicemia, las
 25 muestras de la sangre del paciente podrían someterse a prueba para determinar (1) si el paciente tiene una infección,
 (2) la identidad del microorganismo que infecta al paciente y (3) la susceptibilidad o resistencia de ese microorganismo
 a los antibióticos aplicados.

30 Una realización a modo de ejemplo de un método según la presente invención incluye cultivar una muestra que
 contiene microorganismos en un medio y en comunicación gaseosa con una matriz de sensores colorimétrica. Los
 sensores en la matriz de sensores colorimétrica se exponen de este modo a compuestos orgánicos volátiles
 producidos por el microorganismo.

35 El método incluye además determinar si el microorganismo tiene un modo de resistencia a la al menos una sustancia.
 La determinación de este modo de resistencia puede basarse en una respuesta de los sensores en la matriz de
 sensores colorimétrica a los compuestos orgánicos volátiles. El método incluye además determinar el modo de
 resistencia que comprende al menos una de una bomba de flujo de salida, una descomposición enzimática de la al
 menos una sustancia, una alteración de un sitio al que se une la al menos una sustancia, una alteración de una ruta
 metabólica o una modificación a una envoltura celular del microorganismo. Las características opcionales se pueden
 encontrar en las reivindicaciones 2 a 14.

40 Una realización no según la presente invención se refiere a la reducción de una población de un microorganismo
 seleccionado en un mamífero que porta el microorganismo, e incluye recoger una muestra que incluye al menos uno
 de los microorganismos seleccionados del mamífero, cultivar el/los microorganismo(s) en presencia de una matriz de
 sensores colorimétrica, exponiendo así sensores en la matriz de sensores colorimétrica a compuestos orgánicos
 45 volátiles producidos por el/los microorganismo(s), identificar la susceptibilidad del/de los microorganismo(s) a una
 sustancia basándose en la respuesta de los sensores en la matriz de sensores colorimétrica a los compuestos
 orgánicos volátiles producidos por el/los microorganismo(s), y administrar una dosis de la sustancia al mamífero, en
 donde la dosis es eficaz para reducir la población del microorganismo identificado en el mamífero.

50 Una realización no según la presente invención se refiere a la reducción de una población bacteriana en un mamífero
 que muestra síntomas de infección, e incluye recoger una muestra de bacterias del mamífero, cultivar algunas de las
 bacterias en presencia de una matriz de sensores colorimétrica, exponiendo así sensores en la matriz de sensores
 colorimétrica a compuestos orgánicos volátiles producidos por las bacterias, identificar la susceptibilidad de las
 bacterias a una sustancia basándose en la respuesta de los sensores en la matriz de sensores colorimétrica a los
 55 compuestos orgánicos volátiles producidos por las bacterias, y administrar una dosis de la sustancia al mamífero, en
 donde la dosis es eficaz para reducir el número de bacterias identificadas en el mamífero.

60 Una realización no según la presente invención incluye cultivar una muestra que comprende una especie de bacterias
 en presencia de una matriz de sensores colorimétrica, exponiendo así sensores en la matriz de sensores colorimétrica
 a compuestos orgánicos volátiles producidos por las bacterias, e identificar las bacterias por especies y cepas
 basándose en la respuesta de los sensores en la matriz de sensores colorimétrica a los compuestos orgánicos volátiles
 producidos por las bacterias, en donde la identificación de las bacterias por especie y cepa comprende identificar una
 cepa resistente a sustancias de una especie de bacterias.

65 Otra realización no según la presente invención puede incluir cultivar una muestra que puede contener
 microorganismos en comunicación gaseosa con una matriz de sensores colorimétrica. Los sensores en la matriz de

sensores colorimétrica se exponen a compuestos orgánicos volátiles producidos por un microorganismo en la muestra. El método puede incluir entonces detectar una respuesta de la matriz de sensores colorimétrica a los compuestos orgánicos volátiles producidos por el microorganismo. El método puede incluir entonces determinar una resistencia del microorganismo a al menos una sustancia basándose en la respuesta detectada de la matriz de sensores colorimétrica.

Las implementaciones de los aspectos generales pueden incluir una o más de las siguientes características.

El microorganismo puede identificarse por especie y cepa (por ejemplo, basándose en la respuesta de los sensores en la matriz de sensores colorimétrica a los compuestos orgánicos volátiles producidos por las bacterias) antes de identificar la susceptibilidad de las bacterias a la sustancia. La identificación de las bacterias por especie y cepa puede incluir identificar un mutante resistente a antibióticos.

El microorganismo puede recogerse de un sustrato antes de cultivar el microorganismo. El sustrato puede ser, por ejemplo, tela tejida o no tejida, papel, metal o plástico.

En algunos casos, el microorganismo se recoge de un mamífero (por ejemplo, un ser humano) antes de cultivar el microorganismo. La recogida del microorganismo del mamífero puede incluir recoger una muestra de fluido o una muestra de tejido del mamífero, en donde la muestra de fluido comprende un gas (por ejemplo, aliento exhalado), un líquido (por ejemplo, sangre) o una combinación de los mismos. El mamífero puede mostrar síntomas de bacteriemia.

Una sustancia a la que el microorganismo es susceptible puede identificarse basándose en la respuesta de los sensores en la matriz de sensores colorimétrica a los compuestos orgánicos volátiles producidos por el microorganismo. La sustancia puede ser, por ejemplo, una medicación aprobada para su uso por animales o seres humanos. La sustancia puede seleccionarse basándose en la especie identificada y la cepa del microorganismo (por ejemplo, bacterias). En algunos casos, una dosis de la sustancia se administra al mamífero del que se recogió el microorganismo, en donde la dosis es eficaz para reducir el número de microorganismos identificados en el mamífero.

En algunos casos, la susceptibilidad del microorganismo a la sustancia puede evaluarse en el plazo de 64 horas, en el plazo de 48 horas, en el plazo de 36 horas, en el plazo de 24 horas, en el plazo de 12 horas, en el plazo de 10 horas, en el plazo de 8 horas, en el plazo de 6 horas, o en el plazo de 4 horas después de la identificación del microorganismo.

En determinados casos, cultivar las bacterias incluye cultivar las bacterias en un medio sólido o en un medio líquido. La respuesta de cada sensor puede incluir un cambio en uno o más componentes de color del sensor o un cambio de al menos un colorante en la matriz de sensores colorimétrica en una ventana de tiempo. La respuesta temporal y/o estática de los sensores puede producir un patrón de respuesta de color temporal o estático de las bacterias. La identificación de las bacterias por especie y cepa puede incluir comparar el patrón de color temporal y/o estático de las bacterias con una biblioteca de patrones de respuesta de color temporal y/o estático característicos de cepas conocidas de bacterias.

La respuesta de la matriz de sensores colorimétrica puede ser una respuesta de al menos un espectro de frecuencia de al menos un colorante en la matriz de sensores colorimétrica en una ventana de tiempo. La respuesta de al menos un espectro de frecuencia puede ser una respuesta de color de rojo, verde o azul. El al menos un colorante puede comprender uno cualquiera o una combinación de cualquiera de los siguientes: un colorante sensible a compuestos de azufre reducido, un indicador redox o un indicador de pH.

La susceptibilidad o resistencia de una bacteria u otro microorganismo a una sustancia puede evaluarse basándose en la respuesta de los sensores en la matriz de sensores colorimétrica a los compuestos orgánicos volátiles producidos por las bacterias. Una dosis de una sustancia a la que es susceptible la bacteria, puede administrarse al mamífero del que se recogieron las bacterias, siendo eficaz la dosis para reducir el número de bacterias identificadas en el mamífero.

Otra metodología no según la presente invención puede incluir cultivar una muestra que puede contener microorganismos. La muestra puede estar en comunicación con un sensor que es sensible a compuestos de azufre reducido. Esta comunicación expone el sensor a compuestos orgánicos volátiles producidos por un microorganismo. El método puede incluir entonces evaluar una resistencia del microorganismo a al menos una sustancia basándose en una respuesta del sensor.

Otra metodología no según la presente invención puede incluir cultivar una muestra que contiene microorganismos en un medio. La muestra puede estar en comunicación líquida con al menos un sensor. Esta comunicación expone al menos un sensor a compuestos orgánicos volátiles producidos por los microorganismos. El método puede incluir entonces predecir un perfil de resistencia a antibióticos de los microorganismos a al menos una sustancia basándose en una respuesta a lo largo del tiempo del elemento sensor a los compuestos orgánicos volátiles producidos por los microorganismos. En algunas implementaciones, la comunicación líquida puede comprender además una comunicación gaseosa.

Las ventajas descritas en el presente documento incluyen la identificación de especies y el ensayo de susceptibilidad para completar menos de 24 horas después de que las muestras alcancen el laboratorio.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos, que se incorporan y constituyen una parte de esta memoria descriptiva, ejemplifican las realizaciones de la presente invención y, junto con la descripción, sirven para explicar e ilustrar los principios de la invención. Los dibujos pretenden ilustrar características principales de las realizaciones ilustrativas de una manera esquemática. Los dibujos no pretenden representar todas las características de las realizaciones reales ni las dimensiones relativas de los elementos representados, y no están dibujados a escala.

La figura 1 representa un diagrama de ejemplo de un sistema para detectar una respuesta de matriz;

la figura 2 representa una vista en perspectiva de un recipiente de ejemplo y matriz de sensores;

la figura 3 representa un diagrama de una matriz de sensores de ejemplo;

la figura 4 representa un ejemplo de un método que determina una probabilidad de que un paciente tenga un malestar basándose en la detección y procesamiento de una respuesta del sensor;

las figuras 5A - 5C representan ilustraciones de diagramas de una matriz de sensores de ejemplo después de la exposición a analitos. La figura 5A representa una matriz de sensores de ejemplo antes de la exposición a un analito. La figura 5B representa una matriz de sensores de ejemplo después de la exposición a un analito. La figura 5C representa una ilustración de un mapa de diferencias (no basado en la muestra real).

La figura 6 representa un mapa de calor de una respuesta de sensor temporal.

La figura 7 representa un mapa de calor de una respuesta del sensor temporal que muestra características indicativas de un fenotipo susceptible.

La figura 8 representa mapas de calor de respuestas temporales de tres cepas diferentes de *E. coli*;

la figura 9 representa mapas de calor de respuestas temporales de tres cepas diferentes de *E. coli*;

la figura 10 representa un gráfico de líneas que muestra el retardo de tiempo de una respuesta de sensor para diferentes cepas con gráficos de barras que muestran la concentración inhibitoria mínima de carbapenem.

La figura 11 representa gráficos que muestran correlaciones entre el retardo del sensor y las concentraciones inhibitorias mínimas de determinados antibióticos.

La figura 12 representa mapas de calor de respuestas temporales de tres cepas diferentes de *S. aureus*;

la figura 13 representa mapas de calor de respuestas temporales de tres cepas diferentes de *S. aureus*;

la figura 14 representa gráficos que muestran respuestas de cambio de color de colorantes individuales en un espectro.

La figura 15 representa gráficos que muestran respuestas de cambio de color de colorantes individuales en un espectro.

En los dibujos, los mismos números de referencia y cualquier acrónimo identifican elementos o actúan con la misma estructura o funcionalidad similar para facilitar la comprensión y la conveniencia. Para identificar fácilmente la discusión de cualquier elemento o acto en particular, el dígito o dígitos más significativos en un número de referencia se refieren al número de figura en el que se introdujo por primera vez ese elemento.

Descripción detallada

A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Szycher's Dictionary de Medical Devices CRC Press, 1995, puede proporcionar una guía útil a muchos de los términos y frases usados en el presente documento. Un experto en la técnica reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, que podrían usarse en la práctica de la presente invención. De hecho, la presente invención no se limita de ninguna manera a los métodos y materiales descritos específicamente.

En algunas realizaciones, las propiedades tales como dimensiones, formas, posiciones relativas, etc., usadas para describir y reivindicar determinadas realizaciones de la invención deben entenderse como modificadas por el término “aproximadamente.”

5 Tecnología de nariz artificial

Los detectores selectivos de COV o “narices artificiales” se han desarrollado para detectar y caracterizar muestras gaseosas. Una multitud de tecnologías han implementado funciones de nariz artificial que incluyen, pero no se limitan a: matrices de sensores colorimétricos, matrices de polímeros, sustratos piezoeléctricos sensibles a la masa, transductores de ondas acústicas superficiales (SAW), microbalanzas de cristal de cuarzo, nanotubos de carbono funcionalizados y nanopartículas de oro.

El trabajo inicial en el campo de las narices artificiales se realizó por Wilkens y Hatman en 1964, aunque se ha llevado a cabo el aumento de la investigación realizada en esta área desde la década de 1980. Véase, por ejemplo, W. F. Wilkens, AD. Hatman. *Ann. NY Acad. Sci.*, 116, 608 (1964); K. Pursaud, G. H. Dodd. *Nature*, 299, 352-355 (1982); y J. W. Gardner, P. N., Bartlett. *Sensors and Actuators B*, 18-19, 211-220 (1994). Los detectores selectivos de vapor o “narices artificiales” se basan normalmente en la producción de una señal o pantalla interpretable tras la exposición a una sustancia emisora de vapor u odorizante (a continuación en el presente documento denominado “analito”). Más específicamente, las narices artificiales típicas se basan en la unión química selectiva u otras interacciones moleculares en la interfaz entre un compuesto de detección de la nariz artificial y un analito u odorizante, y a continuación transformando esa unión química en una señal o pantalla, es decir, transducción de señales.

Se han usado matrices de polímeros que tienen un único colorante para narices artificiales. Es decir, una serie de polímeros químicamente diversos o mezclas de polímeros se eligen de modo que su respuesta compuesta distingue un odorizante o analito dado de otros. Los ejemplos de detectores de vapor de matriz de polímero, incluyendo el polímero conductor y los materiales compuestos de polímero conductor/negro de carbono, se discuten en: M. S. Freund, N. S. Lewis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2652-2656 (1995); B.J. Doleman, R. D. Sanner, E. J. Severin, R.H. Grubbs, N. S. Lewis, *Anal. Chem.* 70, 2560-2564 (1998); T. A Dickinson, J. White, J. S. Kauer, D. R. Walt, *Nature* 382, 697-700 (1996)(matriz de polímeros con detección óptica); A E. Hoyt, AJ. Ricco, H. C. Yang, R. M. Crooks, *J. Am. Chem. Soc.* 117,8672 (1995); y J. W. Grate, M. H. Abraham, *Sensors and Actuators B* 3, 85-111 (1991).

Otros materiales de interfaz incluyen monocapas autoensambladas funcionalizadas (SAM), óxidos metálicos y dendrímeros. La transducción de señales se logra comúnmente con sustratos piezoeléctricos sensibles a la masa, transductores de ondas acústicas superficiales (SAW), o materiales conductores. También se han examinado transductores ópticos (basados en absorbancia o luminiscencia). Se describen ejemplos de detectores basados en óxido metálico, SAM y dendrímero en J. W. Gardner, H.V. Shurmer, P. Corcoran, *Sensors and Actuators B* 4, 117-121(1991); J. W. Gardner, H. V. Shurmer, T. T. Tan, *Sensors and Actuators B* 6, 71-75 (1992); y R. M. Crooks, A. J. Ricco, *Acc. Chem. Res.* 31, 219-227 (1998). Estos dispositivos también usan un único colorante.

También se han desarrollado técnicas usando una metaloporfirina para la detección óptica de un único gas específico, tal como oxígeno o amoníaco, y para la detección de vapor mediante capas químicamente interactivas en microbalanzas de cristal de cuarzo. Véase A. E. Baron, J. D. S. Danielson, M. Gonterman, J. R. Wan, J. B. Callis, *Rev. Sci. Instrum.* 64, 3394-3402 (1993); J. Kavandi, y col., *Rev. Sci. Instrum.* 61, 3340-3347 (1990); W. Lee, y col., *J. Mater. Chem.* 3, 1031-1035 (1993); A. A. Vaughan, M. G. Baron, R. Narayanaswamy, *Anal Comm.* 33, 393-396 (1996); J. A. J. Brunink, y col., *Anal. Chim. Acta* 325, 53-64 (1996); C. DiNatale, y col., *Sensors and Actuators B* 44, 521-526 (1997); y C. DiNatale, y col., *Mat. Sci. Eng. C* 5, 209-215 (1998).

Otras técnicas incluyen nanotubos de carbono funcionalizados a veces integrados en un transistor, véase DNA-Decorated Carbon Nanotubes for Chemical Sensing Cristian Staii y Alan T. Johnson, Jr, *Nano Letters* 2005 and functionalized gold nanoparticles véase Broza, Y. Y., & Haick, H. (2013). Nanomaterial-based sensors for detection of disease by volatile organic compounds. *Nanomedicine*, 8(5), 785-806; Barash, O., Peled, N., Hirsch, F. R., & Haick, H. (2009). Sniffing the Unique “Odor Print” of Non-Small-Cell Lung Cancer with Gold Nanoparticles. *Small*, 5(22), 2618-2624.

55 Matrices de sensores colorimétricos

Existen narices artificiales basadas en matrices de sensores colorimétricos que son capaces de detectar los COV a bajas concentraciones y un alto grado de precisión. Las matrices de sensores colorimétricos pueden detectar compuestos orgánicos volátiles haciendo reaccionar con los compuestos y cambiando el color en función de la cantidad y de los compuestos de tipo expuestos a la matriz. El patrón resultante de cambios de color comprende una huella digital alta que permite la identificación de mezclas complejas, incluyendo firmas de enfermedad en la respiración exhalada y en ensayos sellados. Diversas matrices de sensores colorimétricos se describen en las siguientes publicaciones de patentes: patente estadounidense 6.368.558 de Suslick, patente estadounidense n.º 6.495.102, de Suslick, y col., patente estadounidense n.º 7.261.857, de Suslick y col., y publicación de patente estadounidense 2008/0199904.

Colorantes quimiosensibles

Los matrices de sensores colorimétricos que utilizan colorantes quimiosensibles (químicamente sensibles) son capaces de detectar mezclas de COV individuales y de COV complejas hasta concentraciones de baja parte por mil millones (ppb). “Colorantes quimiosensibles” se refiere a cualquier material que absorbe, refleja y/o emite luz cuando se expone a radiación electromagnética, o cualquier otro indicador que experimente un cambio en las propiedades espectrales en respuesta a determinados cambios en su entorno químico. “Cambio en propiedades espectrales” generalmente se refiere a un cambio en la frecuencia y/o intensidad de la luz que absorbe y/o emite el colorante. Los colorantes quimiosensibles pueden incluir colorantes y pigmentos.

Por ejemplo, se pueden utilizar las siguientes cinco clases de colorantes sensibles químicamente: (i) colorantes que contienen iones metálicos que responden a la basicidad de Lewis (es decir, donación de par de electrones, ligadura de iones metálicos), (ii) indicadores de pH que responden a la acidez/basicidad de Brønsted (es decir, acidez de protones y enlaces de hidrógeno), (iii) tintes con dipolos permanentes grandes (por ejemplo, colorantes solvatocrómicos) que responden a polaridad local, (iv) sales metálicas que responden a reacciones redox. La utilización de este amplio espectro de interacciones químicas altamente sensibles permite una matriz de sensores colorimétrica para detectar e identificar clases muy diversas de compuestos de metabolitos.

Por ejemplo, para el reconocimiento de analitos con capacidades de ácido/base de Lewis, es deseable el uso de porfirinas y sus complejos metálicos. Las metaloporfirinas son ideales para la detección de vapores de ligandos metálicos debido a sus sitios de coordinación abiertos para la fijación axial, sus grandes desplazamientos espectroscópicos tras la unión del ligando, su intensa coloración, y su capacidad para proporcionar diferenciación de ligando basándose en la coordinación selectiva de metal. Además, las metaloporfirinas son colorantes de respuesta cruzada, que muestran respuestas a una gran variedad de diferentes analitos a diferentes grados y por diferentes cambios de color.

Un colorante de ácido/base de Lewis se define como un colorante que ha sido identificado por su capacidad para interactuar con los analitos compartiendo aceptor-donante de un par de electrones del analito. Esto da como resultado un cambio en el color y/o la intensidad del color que indica la presencia del analito. Los colorantes de ácido/base de Lewis incluyen colorantes que contienen iones metálicos o colorantes que contienen boro de tres coordenadas. El cambio en las propiedades espectrales de un colorante ácido-base de Lewis puede estar relacionado con la interacción ácido-base de Lewis y la unión del ligando, pero también con la formación de complejos $\pi-\pi$, los enlaces de hidrógeno y/o los cambios de polaridad.

Los ácidos de Lewis a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, porfirinas que contienen iones metálicos (es decir, metaloporfirinas), complejos salen, clorinas, porfirinas bis-pocket y ftalocianinas. La diversidad dentro de las metaloporfirinas puede obtenerse mediante la variación de la porfirina original, el centro metálico de porfirina o los sustituyentes de porfirina periférica. La porfirina original también se denomina porfirina de base libre, que tiene dos átomos de nitrógeno central protonados (es decir, cationes de hidrógeno unidos a dos de los átomos de nitrógeno de pirrol central). En un ejemplo, una porfirina original es la denominada forma de base libre 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (H_2TPP), su dianión es 5,10,15,20-tetrafenilporfirinato(-2) (dianión de TPP), sus complejos metalados y sus formas ácidas (H_3TPP^+ y H_4TPP^{+2}). Esta porfirina puede formar complejos metalados, por ejemplo, con Sn^{4+} , Co^{3+} , Co^{2+} , Cr^{3+} , Mn^{3+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ru^{2+} , Zn^{2+} , Ag^{2+} , In^{3+} e Ir^{3+} . Los colorantes de metaloporfirina que contienen iones metálicos se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 6.368.558 de Suslick y col. y en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2003/0143112 de Suslick y col.. Los iones metálicos particularmente adecuados complejados con colorantes para detectar amoníaco incluyen metales de Zn(II) y Co(III). En realizaciones particulares de la presente invención, el colorante ácido de Lewis es una metaloporfirina. Por ejemplo, la diversidad dentro de las metaloporfirinas puede obtenerse mediante la variación de la porfirina original, el centro metálico de porfirina o los sustituyentes de porfirina periférica. La porfirina original también se denomina porfirina de base libre, que tiene dos átomos de nitrógeno central protonados (es decir, cationes de hidrógeno unidos a dos de los átomos de nitrógeno de pirrol central). Una porfirina original particularmente adecuada es de 5,10,15,20-tetrafenilporfirinato(-2) (dianión TPP), sus complejos metalados, su denominada forma de base libre (H_2TPP) y sus formas ácidas (H_3TPP^+ y H_4TPP^{+2}). Los colorantes de metaloporfirina que contienen iones metálicos adecuados para usar en el aparato y método de la presente invención incluyen, pero no se limitan a:

2,3,7,8,12,13,17,18-octafluoro-5,10,15,20-tetrakis-(pentafluorofenil)porfirinatocobalto(II) [$Co(F_{28}TPP)$];

2,3,7,8,12,13,17,18-octabromo-5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozinc(II) [$Zn(Br_8TPP)$];

5,10,15,20-tetrafenilporfirinatozinc(II) [$ZnTPP$];

5(fenil)-10,15,20-trikis(2',6'-bis(dimetil-t-butilsiloxil)fenil)porfirinatozinc(II) [$Zn(Si_6PP)$];

5,10,15,20-tetrakis(2',6'-bis(dimetil-t-butilsiloxil)fenil)porfirinatozinc(II) [$Zn(Si_8PP)$];

5,10,15,20-tetrafenilporfirinatocobalto (II) [$CoTPP$];

5,10,15,20-tetrakis(2,6-difluorofenil)porfirinatozinc(II) [Zn-F2PP]; y

5,10,15,20-tetrakis(2,4,6-trimetilfenil)porfirinatozinc(II) [ZnTMP].

La síntesis de tales porfirinas se describe en la solicitud de patente de estadounidense n.º 10/279.788.

Colorantes sensibles al pH

El colorante quimiosensible puede ser, por ejemplo, un colorante sensible al pH. Los colorantes que son sensibles al pH incluyen el indicador de pH o tintes indicadores de ácido-base que pueden cambiar de color tras la exposición a ácidos o bases. Un colorante de ácido de Brønsted de la presente descripción es un tinte indicador de pH que cambia de color en respuesta a cambios en la acidez o basicidad de protones (Brønsted) del medio ambiente. Por ejemplo, los colorantes de ácido de Brønsted son, en general, colorantes no metalados que son donantes de protones que pueden cambiar de color donando un protón a una base de Brønsted (es decir, un aceptor de protones). Los colorantes de ácido de Brønsted incluyen, pero no se limitan a, porfirinas protonadas, pero no metaladas, clorinas, porfirinas bis-pocket, ftalocianinas y colorantes polipirrólicos relacionados. Los colorantes polipirrólicos, cuando se protonan, son, en general, colorantes sensibles al pH (es decir, un indicador de pH o tintes indicadores de ácido-base que cambian de color tras la exposición a ácidos o bases).

En una realización, un colorante de ácido de Brønsted es una porfirina no metalada tal como dicatión de 5,10,15,20-tetrakis(2',6'-bis(dimetil-t-butilsiloxil)fenil)porfirina [H4Si8PP]⁺²; 5,10,15,20-tetrafenil-21H,23H-porfirina [H2TPP]; o dicatión de 5,10,15,20-tetrafenilporfirina [H4TPP]⁺². En otra realización de la presente invención, un colorante de Brønsted seleccionado es un colorante indicador que incluye, pero no se limita a, púrpura de bromocresol, rojo de cresol, rojo Congo, azul de timol, verde de bromocresol, rojo Nilo, azul de bromotimol, rojo de metilo, amarillo de nitrazina, rojo de fenol, rojo de bromofenol, naranja Disperse 25, y azul de bromofenol. Tal como apreciará el experto en la técnica, los ácidos de Brønsted descritos en el presente documento también pueden considerarse bases de Brønsted en condiciones de pH particulares. Asimismo, una forma de base libre no metalada, no protonada de una porfirina bis-pocket también se puede considerar una base de Brønsted. Sin embargo, estas formas de colorante también se consideran expresamente dentro del alcance de los colorantes descritos en el presente documento.

Los ejemplos de colorantes de ácidos de Brønsted incluyen porfirinas protonadas, pero no metaladas; cloros; porfirinas bis-pocket; ftalocianinas, y colorantes polipirrólicos relacionados. Los ejemplos de colorantes ácidos de Brønsted de porfirina no metalada incluyen dicatión de 5,10,15,20-tetrakis(2',6'-bis(dimetil-t-butilsiloxil)fenil)porfirina; 5,10,15,20-tetrafenil-21H,23H-porfirina; o dicatión de 5,10,15,20-tetrafenilporfirina. Otros ejemplos de colorantes de ácidos de Brønsted incluyen rojo de clorofenol, verde de bromocresol, púrpura de bromocresol, azul de bromotimol, rojo de bromopirogalol, violeta de pirocatecol, rojo de fenol, azul de timol, rojo de cresol, alizarina, naranja Mordant, naranja de metilo, rojo de metilo, rojo de Congo y azul Victoria. B, azul de eosina, marrón graso B, benzopurpurina 4B, floxina B, naranja G, amarillo de metanilo, verde de naftol B, azul de metileno, safranina O, violeta de metileno 3RAX, naranja de Sudán G, hidrato de morina, rojo neutro, naranja disperso #25, ácido rosólico, marrón graso RR, cloruro de cianidina, 3,6-acridinamina, 6'-butoxi-2,6-diamino-3,3'-azodipiridina, base de para-rosanilina, base de naranja de acridina, violeta cristal, base de carbinol verde malaquita, rojo Nilo, azul Nilo, amarillo de nitrazina, rojo de bromofenol, azul de bromofenol, azul de bromoxilenol, sal tetrasódica de naranja de xilenol, 1-[4-[[4-(dimetilamino)fenil]azo]fenil]-2,2,2-trifluoroetanol-, perclorato de 4-[2-[4-(dimetilamino)fenil]etenil]-2,6-dimetil-piridilo y 1-amino-4-(4-decilfenilazo)-napftaleno.

Colorantes solvocrómicos

El colorante quimiosensible puede ser, por ejemplo, un colorante solvatocrómico o un colorante vapocrómico. Los colorantes solvatocrómicos que pueden utilizarse cambian de color en respuesta a cambios en la polaridad general de su entorno, principalmente a través de fuertes interacciones dipolo-dipolo y de dispersión. Hasta cierto punto, todos los colorantes son intrínsecamente solvatocrómicos, siendo algunos más sensibles que otros. Los ejemplos particulares de colorantes solvatocrómicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, colorantes de Reichardt, colorante de 4-hidroxiestiril-piridinio, yoduro de 4-metoxicarbonil-1-etilpiridinio y 2,6-difenil-4-(2,4,6-trifenil-1-piridinio)-fenolato.

La adición de al menos un colorante de ácido de Brønsted a una matriz que contiene al menos un colorante de ácido de Lewis que contiene iones metálicos puede mejorar la sensibilidad de la matriz para analitos particulares y aumentar la capacidad de discriminar entre analitos. Por ejemplo, se ha demostrado que las matrices de sensores colorimétricos detectan compuestos orgánicos volátiles y mezclas complejas a los niveles de ppb (Rakow, y col. (2005) Angew. Chem. Int. Ed. 44:4528-4532). Además, el uso de uno o más colorantes que contienen iones metálicos en combinación con uno o más colorantes de ácido Brønsted puede crear ventajosamente una firma indicativa de la presencia de un analito particular. Por tanto, mientras que algunas realizaciones pueden utilizar al menos un colorante de ácido y/o base de Lewis, un colorante ácido y/o básico de Brønsted, o un colorante solvatocrómico zwitteriónico, otras realizaciones de esta descripción pueden utilizar al menos dos clases diferentes de colorantes en las presentes matrices. En una realización, la matriz de sensores colorimétrica contiene al menos un colorante de ácido y/o de base

de Lewis, un colorante ácido y/o básico de Brønsted o un colorante solvatocrómico zwitteriónico. En otra realización, la matriz de sensores colorimétrica contiene al menos un colorante de ácido y/o base de Lewis y un colorante ácido y/o básico de Brønsted. En una realización adicional, la matriz de sensores colorimétrica contiene al menos un colorante de ácido y/o base de Lewis y un colorante solvatocrómico zwitteriónico. En aún una realización adicional, la matriz de sensores colorimétrica contiene al menos un colorante ácido y/o básico de Brønsted y un colorante solvatocrómico zwitteriónico. Todavía realizaciones adicionales pueden utilizar al menos tres clases diferentes de colorantes en las presentes matrices, es decir, al menos un colorante de ácido y/o base de Lewis, un colorante ácido y/o básico de Brønsted y un colorante solvatocrómico zwitteriónico.

Una matriz que incluye un colorante sensible al pH y/o un colorante solvatocrómico o vapocrómico puede ser útil para diferenciar analitos que no se unen a, o se unen sólo débilmente a, iones metálicos. Tales analitos incluyen compuestos ácidos, tales como ácidos carboxílicos, y determinados compuestos orgánicos que carecen de funcionalidad ligable. Los ejemplos de compuestos orgánicos que carecen de funcionalidad ligable incluyen alcanos, arenos y algunos alquenos simples y alquinos, especialmente si están impedidos estéricamente. Los ejemplos de compuestos orgánicos que carecen de funcionalidad ligable también incluyen moléculas que están lo suficientemente impedidas estéricamente como para impedir la ligación eficaz. Las matrices que incluyen un colorante sensible al pH y/o un colorante solvatocrómico o vapocrómico se describen, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2003/0143112 de Suslick y col..

Colorantes sensibles a redox

El colorante quimiosensible puede ser, por ejemplo, un colorante sensible a redox que experimenta un cambio en las propiedades espectrales dependiendo de su estado de oxidación. Los ejemplos de colorantes que son sensibles a redox incluyen indicadores redox tales como azul de metileno, negro azulado de naftol, ponceau brillante, α -naftoflavona, fucsina básica, amarillo de quinolina, acetato de tionina, naranja de metilo, rojo neutro, difenilamina, ácido difenilaminosulfónico, 1,10 -fenantrolina hierro(II), sales de permanganato, sales de plata y sales de mercurio.

Colorantes sensibles a iones metálicos

El colorante quimiosensible puede ser, por ejemplo, un colorante sensible a iones metálicos que experimenta un cambio en las propiedades espectrales en presencia de iones metálicos. Los ejemplos de colorantes que son sensibles a iones metálicos incluyen colorantes indicadores de iones metálicos tales como negro de eriocromo T, murexida, 1-(2-piridilazo)-2-naftol y violeta de pirocatecol.

Pigmentos quimiosensibles

El colorante quimiosensible puede ser un pigmento quimiosensible. En algunos casos, el pigmento quimiosensible es un pigmento poroso. Una partícula de pigmento porosa tiene un área de superficie quimiosensible que es mucho mayor que el área de superficie quimiosensible de una partícula de pigmento no porosa correspondiente. Los ejemplos de pigmentos porosos incluyen carbonato de calcio poroso, carbonato de magnesio poroso, sílice porosa, alúmina porosa, titanía porosa y zeolitas.

Nanopartícula quimiosensible

El colorante quimiosensible puede ser una nanopartícula quimiosensible. Una nanopartícula quimiosensible puede ser una nanopartícula discreta, o puede estar formada por iones o moléculas formadores de nanopartículas. La nanopartícula puede estar en una variedad de formas, incluyendo una nanoesfera, una nanovarilla, una nanofibra y un nanotubo. Los ejemplos de nanopartículas quimiosensibles incluyen sólidos de porfirina nanoporosos, nanopartículas de semiconductores tales como puntos cuánticos y nanopartículas de metal.

Matriz de colorantes

El uso de más de un tipo de colorante quimiosensible puede expandir el intervalo de analitos a los que la matriz es sensible, puede mejorar la sensibilidad a algunos analitos, y/o puede aumentar la capacidad de discriminar entre analitos. En algunos casos, una matriz colorimétrica incluye de 2 a 1.000 sensores, de 4 a 500 sensores, o de 8 a 250 sensores. En determinados casos, una matriz colorimétrica incluye de 10 a 100 sensores (por ejemplo, de 16 a 80 sensores, 36 sensores o 60 sensores). Cada sensor en una matriz colorimétrica puede incluir un colorante diferente. Sin embargo, puede ser deseable incluir sensores duplicados que incluyen el mismo colorante. Los sensores duplicados pueden ser útiles, por ejemplo, para proporcionar redundancia a la matriz y/o servir como indicador para el control de calidad. La tabla 1 enumera colorantes quimiosensibles a modo de ejemplo para una matriz de sensores colorimétrica que tiene 36 sensores.

65

ES 2 941 802 T3

TABLA 1. Colorantes quimiosensibles a modo de ejemplo para una matriz de sensores colorimétrica.

N.º	Colorante
5	1 5,10,15,20-Tetrafenil-21H,23H-porfina zinc
	2 5,10,15,20-Tetrafenil-21H,23H-porfina cobre (II)
	3 Cloruro de 5,10,15,20-tetrafenil-21H,23H-porfina manganeso (III)
10	4 Cloruro de hierro (III) de 2,3,7,8,12,13,17,18-octaetil-21H,23H-porfina
	5 5,10,15,20-Tetrafenil-21H,23H-porfina cobalto (II)
	6 <i>meso</i> -Tetra(2,4,6-trimetilfenil)porfina
15	7 Amarillo de nitrazina (básico)
	8 Rojo de metilo (básico)
	9 Rojo de clorofenol (básico)
20	10 Negro azul de naftilo
	11 Azul de bromotimol (básico)
	12 Azul de timol (básico)
25	13 Púrpura de <i>m</i> -cresol (básico)
	14 Acetato de zinc (II) con púrpura de <i>m</i> -cresol (básico)
	15 Cloruro de mercurio (II) con azul de bromofenol (básico)
30	16 Cloruro de Mercurio (II) con verde de bromocresol (básico)
	17 Acetato de plomo (II)
	18 Tetrayodofenolsulfonaftaleína
35	19 Fluoresceína
	20 Verde de bromocresol
	21 Rojo de metilo
40	22 Púrpura de bromocresol
	23 Rojo de bromofenol
	24 Amarillo brillante
45	25 Nitrato de plata + azul de bromofenol (básico)
	26 Nitrato de plata + verde de bromocresol (básico)
	27 Cresol rojo (ácido)
50	28 Naranja disperso 25
	29 Púrpura de <i>m</i> -cresol
	30 Amarillo de nitrazina
55	31 Rojo cresol
	32 Verde de bromocresol
	33 Rojo de fenol
60	34 Azul de timol
	35 Azul de bromofenol
65	36 Púrpura de <i>m</i> -cresol

Sustrato de colorante

Según la presente invención, la pluralidad de colorantes quimiosensibles se puede depositar sobre un sustrato de matriz en una combinación de patrones predeterminados. Dicho de forma alternativa, los colorantes están dispuestos en una configuración resuelta espacialmente bidimensional (o lineal o de otro tipo) de modo que tras la interacción con uno o más analitos, una respuesta distinta de color e intensidad de cada colorante crea una firma indicativa de uno o más analitos. Una pluralidad de colorantes quimiosensibles abarca 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o 50 colorantes individuales. En realizaciones particulares, una pluralidad de colorantes quimiosensibles es de 2 o más, 5 o más, 10 o más, 15 o más, 20 o más, 25 o más, o 30 o más colorantes. Los colorantes quimiosensibles se pueden depositar en combinaciones de patrones predeterminados de filas, columnas, espirales, etc., y se pueden usar una o más matrices de colorante quimiosensible en un recipiente. Los colorantes se pueden fijar de forma covalente o no covalente en o sobre un sustrato de matriz de sensores colorimétrica mediante deposición directa, que incluye, entre otros, aerógrafo, impresión por chorro de tinta, serigrafía, estampado, micropipeta o dispensación de nanolitros.

El sustrato para retener los colorantes quimiosensibles puede ser cualquier material o materiales adecuados, incluyendo, pero sin limitarse a, placas para cromatografía, papel, papeles de filtro, membranas porosas o polímeros, vidrios o metales mecanizados adecuadamente. En algunas realizaciones, el sustrato puede incluir un sustrato hidrófobo. En algunas realizaciones, se usa una matriz de sol-gel nanoporosa como sustrato para los colorantes.

Se puede fabricar un pigmento nanoporoso mediante la inmovilización de colorantes químicamente sensibles en siloxanos modificados orgánicamente (ormosils). En algunas realizaciones, el pigmento se crea utilizando una pulverización electrónica para generar un aerosol a partir de disoluciones precursoras que contienen el colorante y otros materiales, que a continuación se calienta para formar microesferas encapsuladas con colorante. Estas microesferas encapsuladas con tinte se pueden imprimir a continuación en papel, tal como papel para cromatografía para formar una matriz de sensores colorimétrica. Estos ormosils porosos de sol-gel pueden proporcionar una buena matriz para colorantes debido a una gran área superficial, buena estabilidad en un amplio intervalo de pH, inercia relativa en muchos entornos y transparencia en el espectro UV-visible.

Una matriz sol-gel nanoporosa tiene un área de superficie enorme a escala microscópica, lo que da como resultado una sensibilidad de parte por mil millones (ppb) En algunas realizaciones, se puede requerir una matriz de sol-gel nanoporosa para detectar las firmas traza de compuestos orgánicos volátiles (COV) de cáncer de pulmón y otras enfermedades en la orina u otros fluidos biológicos. El pigmento nanoporoso es un sol-gel basado en silicio con una enorme área superficial, aumentando considerablemente las oportunidades de interacción entre el analito y el indicador y, por tanto, logrando una gran sensibilidad en una amplia gama de moléculas volátiles, incluyendo especies cruciales para el diagnóstico del cáncer. Además, la alta resistencia química del pigmento nanoporoso permite que un fabricante aumente la diversidad química de los colorantes depositados sobre el sustrato nanoporoso, lo que mediante la adición de reactivos cromogénicos que eran demasiado reactivos para incorporar sobre sustratos compuestos por materiales diferentes. Los pigmentos nanoporosos se describen más detalladamente en Lim y col., Responsive Nanoporous Pigments: Colorimetric Sensor Arrays and the Identification of Aliphatic Amines, Langmuir 24 (22), 2008.

Exposición de la matriz a analitos

Para analitos de gas o vapor, se pasa una corriente de gas que contiene el analito sobre la matriz, y se pueden obtener imágenes antes, durante y/o después de la exposición a la corriente de gas. Preferiblemente, se obtiene una imagen después de que la muestra y la matriz se hayan equilibrado. Si la corriente de gas no está presurizada, puede ser útil usar una bomba miniaturizada.

Para los analitos disueltos en un disolvente, acuoso o no acuoso, la primera imagen puede obtenerse en aire o, preferiblemente, después de la exposición al disolvente portador puro que se usa de la muestra. La segunda imagen de la matriz puede obtenerse después del inicio de la exposición de la matriz a la muestra. Preferiblemente, se obtiene una imagen después de que la muestra y la matriz se hayan equilibrado.

Una matriz colorimétrica puede usarse para detectar analitos en la respiración exhalada. La detección de compuestos en la respiración exhalada puede ser útil para detectar infecciones o enfermedades. La detección colorimétrica de amoníaco en la respiración exhalada se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2005/0171449 de Suslick y col.

La matriz de sensores colorimétrica puede estar en comunicación gaseosa con una muestra de fluido y/o un medio de cultivo sólido o líquido, u otros materiales que contienen la muestra. Esto permitirá que los compuestos orgánicos volátiles emitidos desde la muestra (por ejemplo, de microorganismos en la muestra) se evaporen al aire en el recipiente y entren en contacto con la matriz de sensores colorimétrica. En algunas realizaciones, el recipiente se sella, y la matriz de sensores colorimétrica se expone a compuestos orgánicos volátiles emitidos por los microorganismos u otras fuentes de COV. En otras realizaciones, podrían utilizarse diferentes recipientes u otros mecanismos para exponer la matriz de sensores colorimétrica al gas emitido desde la muestra. Esto podría incluir diversos canales o tubos que podrían transportar los compuestos orgánicos volátiles emitidos desde la muestra a un estado gaseoso.

Detección de respuesta de nariz artificial

Detector

5 En realizaciones en las que se utiliza una matriz de sensores colorimétrica como la tecnología de nariz artificial, los cambios de color de los colorantes químicamente sensibles pueden detectarse por cualquier detector óptico adecuado u otro detector. En realizaciones que pertenecen a una matriz de sensores colorimétrica, un detector puede monitorizar la respuesta espectroscópica, respuesta de transmisión o respuesta de reflectancia de los colorantes en el elemento de detección colorimétrico en una o más longitudes de onda de una manera resuelta espacialmente de modo que
10 todas las manchas en la matriz de sensores colorimétrica sean fotografiados individualmente o abordados y el color de cada mancha se determina individualmente. Para los fines de la presente descripción, los términos color y colorimétrico están destinados a incluir longitudes de onda en la porción visible del espectro electromagnético, así como la porción invisible del espectro electromagnético, por ejemplo, infrarrojos y ultravioleta.

15 La detección de color se puede lograr con un espectrofotómetro de imágenes, un escáner plano, un escáner deslizante, una cámara digital de vídeo o CCD o CMOS, o una fuente de luz combinada con un detector CCD o CMOS. Se puede emplear cualquier otro o vídeo, así como una cámara analógica o digital. Además, puede usarse cualquier formato de imagen, por ejemplo, RGB (rojo, verde y azul) o YUV. Incluso se pueden usar imágenes en escala de grises simples. En otras modalidades que utilizan otras tecnologías de nariz artificial, un detector o sensor puede usarse de manera
20 similar para proporcionar una respuesta del detector indicativo de las interacciones moleculares que se producen en la sonda del detector u otro sensor.

La sensibilidad de una matriz de sensores colorimétrica es principalmente una función de dos factores, la capacidad de una mancha de colorante para cambiar de color cuando se expone a un analito y la capacidad del detector para
25 detectar ese cambio de color.

En algunas realizaciones, un sistema de medición espectroscópica óptico puede dividir el espectro visible en muchas ventanas de paso de banda individuales, mientras que un sistema de formación de imágenes tricolor por definición contiene solo tres de tales ventanas. Por tanto, un sistema de medición espectroscópica óptico es capaz de detectar
30 cambios de color más pequeños que los que se pueden detectar mediante sistemas de imágenes de tres colores, aumentando eficazmente la sensibilidad del sistema de detección de respuesta cruzada completo. Por consiguiente, en realizaciones particulares de la presente descripción, se emplea un sistema de medición espectroscópica óptico como detector. Tal como se usa en el presente documento, los sistemas de medición espectroscópica ópticos se refieren a cualquier sistema que produzca una mayor resolución de color que un sistema de formación de imágenes de tres colores. Este puede ser un espectrograma de imágenes, una(s) sonda (s) de fibra óptica acoplada a un
35 espectrograma u otro sistema espectroscópico.

Proceso de detección y configuración del sistema

40 La figura 1 ilustra un ejemplo de un sistema, en algunas realizaciones, la muestra y el recipiente 200 (tal como se muestra en la figura 2) se mantienen a una temperatura constante mediante una incubadora. Haciendo referencia de nuevo a la figura 1, en algunas realizaciones, el detector 130 puede incorporarse en una incubadora para permitir que el detector se registre de manera continua o intermitente la respuesta colorimétrica de los colorantes 710 a través de la ventana 270 mientras se deja los recipientes 200 sin perturbar a una temperatura constante. Después de la
45 aplicación de los COV contenidos en la orina puede comenzar a reaccionar con la matriz de sensores colorimétrica 120.

Antes de la aplicación de una muestra, un detector 130 puede registrar una imagen del conjunto de sensores actualmente cargados 120 como control para comparación posterior y resta de cambios de color. Por consiguiente, esto permitirá que el sistema mida los cambios de color en función de la variación de ese perfil de color inicial de matriz particular. En realizaciones asociadas con otras tecnologías de nariz artificial, el detector puede registrar una lectura inicial para comparación con una lectura posterior después de la introducción de una muestra. Después de la aplicación de una muestra a un recipiente de sensor 200, un detector 130 puede a varios intervalos o después de un intervalo de tiempo establecido, detectar y registrar la respuesta colorimétrica de los colorantes 710 u otra respuesta del detector
50 130. En algunas realizaciones, el software puede configurarse en el servidor 150 o el dispositivo 140 de procesamiento para controlar automáticamente la sincronización precisa del detector 130 y la grabación de los datos capturados por el detector 130. Por ejemplo, el detector 810 puede registrar una imagen cada minuto, cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 minutos, o a intervalos entre, o en 20 o 30 minutos, u otros intervalos adecuados. En algunas realizaciones, el detector 130 puede registrar continuamente datos de la matriz de sensores colorimétrica 120. El detector 130 puede
60 registrar imágenes durante una hora, 2, 3, 4, 5 o 6 horas u otro marco de tiempo adecuado. En algunas realizaciones, el marco de tiempo puede seleccionarse basándose en cuándo la tasa de cambio de color está cerca de la homeostasis o ha detenido la reacción. En otras realizaciones, el cambio de color puede detenerse cuando una tasa de cambio de color cae por debajo de un determinado umbral.

65 La figura 2 representa un recipiente ilustrativo 200 con matriz de sensores colorimétrica 120 para detectar compuestos orgánicos volátiles emitidos desde una muestra. El recipiente 200 puede incluir un medio de cultivo sólido o líquido

conocido generalmente en la técnica. Una muestra, tal como una muestra de fluido (por ejemplo, sangre, esputo, aliento exhalado) de un mamífero, una muestra de tejido de un mamífero, o similar, se coloca o inyecta en el recipiente 200.

5 La figura 3 ilustra una realización de una matriz de sensores colorimétrica 120. En una realización, una matriz de sensores colorimétrica 120 puede incluir un sustrato 720 sobre el cual pueden depositarse una variedad de colorantes 710 químicamente sensibles. Los colorantes 710 pueden cambiar de color después de la exposición a y reaccionar con compuestos orgánicos volátiles. Determinados colorantes responden a determinados COV que permiten determinar una mezcla particular de COV por su cambio de color único mostrado en el conjunto de sensores 120.

10

Procesamiento de datos

Los datos producidos desde el detector 130 u otros instrumentos asociados con una tecnología de nariz artificial pueden almacenarse y procesarse posteriormente para la evaluación y el diagnóstico de la muestra. Se puede incorporar un detector 130 en cualquier sensor adecuado u otros instrumentos asociados con un sistema de tecnología de nariz artificial. El procesamiento de los datos puede realizarse en el dispositivo 140 de procesamiento, el servidor 150 u otro dispositivo informático conectado al sistema. Diversas tecnologías y sistemas de nariz artificial pueden proporcionar una respuesta o una salida indicativa de las interacciones químicas o moleculares que se producen en un sensor asociado con la tecnología de nariz artificial. Por ejemplo, muchas realizaciones pueden utilizar un detector 130 para detectar cambios después de la introducción de una muestra de orina que contiene COV.

15

20

Procesamiento de datos del detector para la matriz de sensores colorimétrica

En realizaciones que utilizan una nariz artificial basada en matriz de sensores colorimétrica, un detector 130 puede utilizarse para detectar cambios ópticos en la matriz 120. En algunas realizaciones, el detector 130 solo puede capturar una imagen de la matriz de sensores 120 antes y en un único punto en el tiempo después de la exposición del tinte 710 a la muestra. En otras realizaciones, el detector 130 puede capturar imágenes en diversos momentos o continuamente después de la exposición de la muestra al colorante 710. Las diferencias de cambio de color antes y en varios puntos después de la introducción de la muestra se usan para clasificar o determinar las propiedades de la muestra. Por ejemplo, cuando se usa en combinación con la matriz de sensores colorimétrica 120 y el software de análisis de imágenes, se pueden generar diferencias colorimétricas restando los valores de las imágenes de colorante generadas antes y después de la exposición del colorante a una muestra. En algunas realizaciones, las diferencias colorimétricas representan perfiles de tono e intensidad para la matriz 120 en respuesta a analitos contenidos en la muestra. Por tanto, para cada imagen, el detector 130 puede extraer un vector de 16 bits (los valores R, G y B si, por ejemplo, se usan de 80 indicadores) antes y después de la exposición. Cuando se usa según el método de la presente descripción, se puede crear una firma de cambio de color única para la muestra que proporciona tanto reconocimiento cualitativo como análisis cuantitativo de compuestos orgánicos volátiles presentes en la muestra.

25

30

35

La figura 4 ilustra un ejemplo de un procedimiento según una realización a modo de ejemplo de la presente descripción. Determinadas o todas las etapas enumeradas en la figura 4 pueden implementarse o controlarse mediante un dispositivo de procesamiento 140, detector 130, base de datos 160 asociada, servidor 150 y otros componentes electrónicos que se comunican a través de una red. Estos componentes integrados de ordenador o procesador pueden implementar automáticamente el proceso ilustrado para proporcionar una indicación de si un paciente tiene cáncer de pulmón.

40

45

Por ejemplo, la primera muestra puede exponerse a una nariz artificial 810. Esto puede ser implementado por un cuidador que aplica una muestra dentro de un recipiente 200 o un dispositivo 140 de procesamiento para abrir una puerta u otra característica para permitir la exposición de la muestra a la nariz artificial 810 para comenzar. La exposición a la muestra podría realizarse mediante cualquier método adecuado que permita que el gas de espacio de cabeza se exponga a, entre en contacto con, o se encuentre dentro de la proximidad gaseosa a la matriz colorimétrica 120. A continuación, una respuesta o imagen o varias respuestas o imágenes tal como se describe en el presente documento de la matriz colorimétrica u otra nariz artificial 820 puede ser capturada por un detector 130. En algunas realizaciones, el detector 130 capturará primero una imagen o varias imágenes de la matriz colorimétrica o la nariz artificial 820 como una referencia antes de la exposición de la matriz colorimétrica 120 a la muestra tal como se describe en el presente documento. Particularmente, las respuestas o lecturas de las tecnologías pueden tomarse antes y después de la introducción de la muestra al sensor o detector de nariz artificial 130.

50

55

A continuación, el sistema puede procesar los datos de imagen u otros datos de respuesta de nariz artificial 830 capturados por el detector 130. El procesamiento 830 puede realizarse por cualquier dispositivo 140 de procesamiento conectado al sistema. Por ejemplo, el sistema puede determinar una diferencia colorimétrica entre la imagen de referencia y las imágenes capturadas después de la exposición de la matriz de sensores colorimétrica 120 al gas de espacio de cabeza de la muestra.

60

A continuación, el sistema puede calcular o determinar una probabilidad 840 de que un paciente del que se tomó la muestra tiene un cáncer, una infección de un microorganismo, y determinada información sobre la enfermedad o microorganismos incluyendo su susceptibilidad a los antibióticos, basándose en el procesamiento de la imagen u otro

65

detector 130, datos 830. Esto puede realizarse comparando la diferencia colorimétrica determinada en la etapa 830 de procesamiento a una base de datos 160 a diferencias colorimétricas asociadas con las muestras que pertenecen a pacientes con dolencias conocidas tales como infecciones de microorganismos, cáncer u otras enfermedades. Por ejemplo, un análisis estadístico puede realizarse usando un análisis de HCA o PCA (tal como se describe más completamente en el presente documento) para determinar la probabilidad de que una muestra indique que el paciente asociado tiene cáncer, una infección o una infección resistente al fármaco, basándose en comparaciones con diferencias en las muestras en la base de datos que se sabe que tienen cáncer o cáncer de pulmón o se basan en otras técnicas de procesamiento que filtran e identifican determinadas características de la respuesta.

10 Implementación por ordenador del análisis

Para implementar el sistema de procesamiento y análisis basado en imágenes, el sistema también puede incluir un dispositivo de almacenamiento de memoria acoplado operativamente al procesador que almacena una multiplicidad de patrones de respuesta de color temporal y/o estático de especies y/o cepas conocidas de microorganismos (por ejemplo, bacterias, levaduras, protozoos). Por tanto, el sistema es operable para generar un patrón de respuesta de color temporal y/o estático de una muestra que incluye un microorganismo, e identificar automáticamente el microorganismo (por ejemplo, por especies y cepas) comparando el patrón de respuesta de color generado de la matriz 120 con la multiplicidad almacenada de patrones de respuesta de color temporales y/o estáticos (por ejemplo, la “biblioteca”) de especies y/o cepas conocidas de microorganismos. La comparación del patrón de respuesta de color generado con la biblioteca de especies y/o cepas conocidas de microorganismos puede lograrse mediante uno de varios métodos estadísticos descritos en el presente documento.

En otras realizaciones, la información emitida por el detector 130 puede enviarse a una base de datos remota para procesarse y compararse con una base de datos centralizada para determinar el conjunto de datos de coincidencia más cercano. En otras realizaciones, determinadas partes del cálculo pueden realizarse localmente en un procesador en el sistema y algunas partes pueden realizarse de manera remota mediante un procesador u otro dispositivo informático en un servidor. En algunas realizaciones, puede estar contenido en el sistema una biblioteca de conjuntos de datos con puntos de datos anteriores para cepas antibióticas conocidas y/o resistencias o susceptibilidad conocidas en el sistema o en un servidor centralizado. En las realizaciones del servidor, los datos podrían actualizarse continuamente y almacenarse a medida que se realizan más ensayos y los organismos se identifican junto con las susceptibilidades.

El sistema puede entonces emitir una indicación de la probabilidad 850 a una pantalla asociada con el sistema. La salida de la indicación puede ser una probabilidad porcentual de un paciente que tiene cáncer, una infección, una determinación umbral de si el paciente debe tener un cribado o prueba de seguimiento para el cáncer o infección, o pruebas adicionales para validar los resultados u otras indicaciones adecuadas. Los sistemas y métodos descritos en la presente memoria también pueden proporcionar información cuantitativa adicional con respecto al diagnóstico que puede ayudar a un paciente en la toma de decisiones.

40 Analizar imágenes de matrices

Analizar las diferencias entre la primera imagen y la segunda imagen puede incluir la comparación cuantitativa de las imágenes digitales antes y después de la exposición al analito. Con el uso de software personalizado o software gráfico convencional tal como Adobe® PhotoShop®, se puede obtener un mapa de diferencias restando la primera imagen de la segunda imagen. Para evitar artefactos de sustracción en la periferia de las manchas, el centro de cada mancha puede promediarse.

Las figuras 5A-5C son ilustraciones de una imagen de ejemplo de una matriz de sensores colorimétrica, que muestra la matriz antes de la exposición a *E. coli* 25922 (figura 5A), después de la exposición a *E. coli* 25922 (figura 5B), y un mapa de diferencia de estas dos imágenes (figura 5C). Los datos de comparación obtenidos del mapa de diferencias incluyen cambios en los valores rojo, verde y azul (ΔRGB) para cada mancha en la matriz. Los cambios en las propiedades espectrales que se producen tras la exposición a un analito, y el mapa de diferencias de color resultante, pueden servir como una huella digital única para cualquier analito o mezcla de analitos en una concentración dada.

En el caso más simple, un analito puede representarse por un único vector 3 x que representa los valores ΔRGB para cada colorante, donde x es el número de colorantes que se exponen en la ecuación (1). Esto supone que el equilibrio es relativamente rápido y que cualquier reacción irreversible entre el analito y el colorante son lentas con respecto al tiempo de equilibrio inicial:

$$\text{Vector de diferencia} = \Delta R1, \Delta G1, \Delta B1, \Delta R2, \Delta G2, \Delta B2, \dots, \Delta Rx, \Delta Gx, \Delta Bx \quad (1)$$

Alternativamente, la respuesta temporal del analito puede usarse para realizar una identificación rápida, preferiblemente usando un “vector de tiempo-pila” de valores de ΔRGB en función del tiempo. En la ecuación 2, se muestra un vector de tiempo-pila para una matriz de 36 colorantes en tiempos m, n, y finalmente z, todo el uso del barrido inicial como la línea de base para las diferencias en los valores rojo, verde y azul:

Vector de pila de tiempo = $\Delta R1m, \Delta G1m, \Delta B1m, \Delta R2m, \Delta G2m, \Delta B2m, -\Delta R36m, \Delta G36m, \Delta B36m, \dots \Delta R1n, \Delta G1n, \Delta B1n, \dots \Delta R36m, \Delta G36m, \Delta B36m, \dots \Delta R36z, \Delta G36z, \Delta B36z$ (2)

Por consiguiente, cada respuesta de analito puede representarse digitalmente como un vector de dimensión $3xz$, donde x es el número de colorantes y z es el número de barridos en diferentes momentos. La comparación cuantitativa de tales vectores diferenciales puede hacerse simplemente midiendo la distancia euclidiana en el espacio $3xz$. Tales vectores pueden tratarse entonces usando análisis quimiométricos o estadísticos, incluyendo el análisis de componentes principales (PCA), análisis de agrupamiento jerárquico (HCA) y análisis discriminante lineal. Se prefieren los métodos estadísticos adecuados para datos de dimensionalidad alta. Como ejemplo, HCA examina sistemáticamente la distancia entre los vectores que representan cada colorante, formando grupos sobre la base de las distancias multivariadas entre las respuestas de analito en el espacio de color ARGB multidimensional usando la varianza mínima (“Ward”) para la clasificación. A continuación, se puede generar un dendograma que muestre la agrupación de los datos de las distancias euclidianas entre los vectores de analitos, como un árbol ancestral.

15 CSA para la identificación de microorganismos

Las matrices de sensores colorimétricos descritas en el presente documento pueden usarse para identificar y/o monitorizar microorganismos patógenos y no patógenos. En un ejemplo, una muestra que incluye microorganismos de un mamífero (por ejemplo, un ser humano) que muestra síntomas de una enfermedad o que muestra el tratamiento para una enfermedad puede tomarse del mamífero (por ejemplo, en forma de una muestra de fluido tal como sangre o aliento exhalado, o en forma de una muestra de tejido) y cultivarse en presencia de una matriz de sensores colorimétrica. En otros ejemplos, los microorganismos tales como *Saccharomyces cerevisiae* y otros se pueden monitorizar en procesos tales como los procesos de horneado y fermentación alcohólica, la generación de electricidad en las pilas de combustible microbiano y la producción de biocombustible.

La respuesta de los sensores en la matriz de sensores colorimétrica a los compuestos orgánicos volátiles produce un patrón de respuesta de color temporal o estático específico de la tensión, lo que permite que el microorganismo se identifique mediante la comparación del patrón de respuesta de color con patrones de respuesta de color para cepas conocidas. La comparación puede lograrse, por ejemplo, visualmente o automáticamente.

Si bien las bacterias de una especie dada comparten determinadas características, diferentes cepas de la misma especie producen patrones de respuesta de color (o “huellas dactilares”) notablemente diferentes, lo que permite la discriminación entre cepas de la especie dada (por ejemplo, entre *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y entre *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina). Los patrones de respuesta de color permiten la identificación de microorganismos por especies y cepas y determinadas características resistentes a antibióticos en una fracción del tiempo (por ejemplo, aproximadamente tres cuartos del tiempo, aproximadamente una mitad del tiempo, o aproximadamente un cuarto del tiempo) de otros métodos, basados al menos en parte en condiciones tales como concentración, medio de cultivo, condiciones de cultivo (por ejemplo, temperatura) y similares.

Los microorganismos tales como bacterias, levaduras, protozoos y hongos pueden identificarse tal como se describe en el presente documento. Las especies de bacterias que pueden identificarse incluyen, por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus sciuri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Vibrio cholera*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia cepacia*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter freundii*, *Micrococcus leuteus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus Group A*, *Streptococcus Group B*, *S. marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus anthracis*, *Bordetella pertussis*, *Clostridium* sp., *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheria*, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*, *Shigella* spp., *Haemophilus influenzae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas perolens*, *Pseudomonas fragi*, *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium* sp., *Veillonella* sp., *Yersinia pestis*, y *Yersinia pseudotuberculosis*. Las cepas de bacterias que pueden identificarse incluyen, por ejemplo, *S. aureus* 25923, *S. aureus* 29213, *S. aureus* 43300, *S. aureus* IS-13, *S. aureus* IS-38, *S. aureus* IS-43, *S. aureus* IS-70, *S. aureus* IS-120, *S. aureus* IS-123, *S. aureus* IS-124, *S. aureus* 33591 resistente a meticilina, *S. epidermidis* 35984, *S. sciuri* 49575, *P. aeruginosa* 10145, *P. aeruginosa* IS-15, *P. aeruginosa* IS-65, *P. aeruginosa* IS-22, *P. aeruginosa* IS-36, *P. aeruginosa* 27853, *E. faecium* 19434, *E. faecalis* 23241, *E. faecalis* 51299 resistente a vancomicina, *E. coli* 25922, *E. coli* 53502, *E. coli* 35218, *E. coli* 760728, *E. coli* IS-39, *E. coli* IS-44, *A. xylosoxidans* IS-30, *A. xylosoxidans* IS-35, *A. xylosoxidans* IS-46, *A. xylosoxidans* IS-55, *C. diversus* IS-01, *C. diversus* IS-28, *C. diversus* IS-31, *C. diversus* IS-33, *K. pneumoniae* IS-130, *K. pneumoniae* IS-133, *K. pneumoniae* IS-136, *K. pneumoniae* 33495, *B. anthracis* Ames, *B. anthracis* UM23CL2, *B. anthracis* Vollum, *Y. pestis* CO92, *Y. pestis* Java 9, *S. epidermidis* 12228, *S. epidermidis* IS-60, *S. epidermidis* IS-61, *P. mirabilis* IS-18, *P. mirabilis* IS-19, *P. mirabilis* 12453, *S. marcescens* IS-48, *S. marcescens* IS-05, y *S. marcescens* 13880, donde “IS-#» se refiere a aislados clínicos y las otras cepas son cepas de referencia ATCC®. Las especies de hongos que pueden identificarse incluyen, por ejemplo, *Microsporium* sp., *Trichophyton* sp., *Epidermophyton* sp., *Sporothrix schenckii*, *Wangiella dermatitidis*, *Pseudallescheria boydii*, *Madurella grisea*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, y *Candida albicans*. De manera similar, se pueden identificar las levaduras que incluyen Ascomycota (Saccharomycotina, Taphyrinomycotina,

Schizosaccharomycetes) y Basidiomycota (Agaricomycotina, Tremellomycetes, Pucciniomycotina, Microbotryomycetes) y, si se desea, evaluar la susceptibilidad. Los ejemplos incluyen *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*. También pueden identificarse Protozoa, incluyendo flagelados (por ejemplo, *Giardia lamblia*), ameboides (por ejemplo, *Entamoeba histolytica*), esporozoos (por ejemplo, *Plasmodium knowlesi*), y ciliados (por ejemplo, *Balantidium coli*) tal como se describe en el presente documento.

Firma de resistencia al fármaco - Cultivado sin antibióticos

Se ha descubierto que la respuesta del sensor 120 de una muestra cultivada sin antibióticos (por ejemplo, solo en medio de crecimiento) proporciona adicionalmente información sobre la resistencia al fármaco de los microorganismos en la muestra. Por ejemplo, en algunos casos, la respuesta del sensor 120 o la respuesta del sensor temporal 120 puede proporcionar información adicional sobre los perfiles resistentes al fármaco de un organismo.

Esta respuesta temporal de uno o dos indicadores o colorantes 710 en algunos casos puede proporcionar información sobre la resistencia al fármaco de los microorganismos en la muestra. En algunos casos, una determinada clase de colorantes 710 que responden a una determinada clase de compuestos puede proporcionar información o una indicación de un perfil resistente a fármacos. Esto puede deberse a que los microorganismos resistentes a fármacos emiten una determinada clase de compuestos, potencialmente en determinados momentos en su ciclo de crecimiento que son diferentes del microorganismo no resistente a fármacos.

En otros ejemplos, la firma de la respuesta o ciertas partes de múltiples indicadores o colorantes 710 puede indicar que la muestra contiene un microorganismo resistente a fármacos. En algunos ejemplos, la respuesta temporal de ciertos colorantes 710 puede indicar un microorganismo resistente a fármacos. Por ejemplo, un determinado indicador puede estar presente o aumentar o disminuir un cambio en las propiedades espectrales en un momento anterior o posterior al inicio de la incubación de la muestra en medios de crecimiento. En algunos ejemplos, el indicador puede cambiar una determinada cantidad en un determinado tiempo si los microorganismos tienen determinados tipos de resistencia al fármaco.

La respuesta de los indicadores o colorantes 710 puede indicar diferentes tipos de resistencia al fármaco, incluyendo resistencia a antibióticos primarios, secundarios o terciarios. En algunos ejemplos, la respuesta de los indicadores o colorantes 710 puede indicar un perfil de resistencia de múltiples fármacos. Esta respuesta puede detectarse antes de la identificación de los microorganismos en algunos casos. En algunos casos, el patrón de respuesta detectado para la resistencia a múltiples fármacos puede ser el mismo para diferentes especies y tipos de organismos cultivados en una muestra.

La respuesta de los indicadores o colorantes 710 en la matriz 120 también puede indicar un modo de resistencia exhibida por el/los microorganismo(s) cultivado(s) en la muestra. Por ejemplo, existen varios modos conocidos a través de los cuales los microorganismos pueden ser resistentes a los antibióticos. Estos incluyen (1) desarrollar enzimas que desactiven los antibióticos, (2) alteración del sitio de unión del antibiótico, (3) alteración de una ruta metabólica con la que el antibiótico interfiere, (4) el desarrollo de capas de envoltura celular que son impermeables a los antibióticos (o varias) y (5) bombas (por ejemplo, flujo de salida) que bombeen sustancias dañinas en el microorganismo que pueden conferir resistencia a múltiples fármacos. La firma de respuesta de la matriz de sensores colorimétrica 120 también puede indicar los modos de resistencia del microorganismo a diversos antibióticos, sin cultivar la muestra o microorganismos en presencia de antibióticos.

Técnicas de procesamiento para determinar la resistencia al fármaco

Se pueden utilizar diversas técnicas tal como se describe en la presente memoria para detectar los patrones de respuesta de la matriz 120 y procesar los patrones para predecir o identificar muestras que contienen microorganismos con resistencia a antibióticos. Por ejemplo, tal como se describe, los detectores 130 pueden detectar los patrones de respuesta en diversos puntos de tiempo, y comparar los patrones a tiempo es igual a cero, u otros tiempos para indicar cambios en la respuesta de las respuestas iniciales o cambiantes en determinados puntos de tiempo.

Por ejemplo, el cambio porcentual para cada colorante 710 o indicador a lo largo del tiempo puede procesarse para identificar diversos umbrales o firmas que indican que los microorganismos cultivados pueden tener resistencia a antibióticos. Por ejemplo, el sistema puede determinar un cambio porcentual en las propiedades espectrales de cada una de las respuestas de espectro R, g y B de los colorantes 710 en la matriz 120. Por consiguiente, la respuesta generalmente detectará cambios que indican cantidades cambiantes de analitos en diversos periodos de tiempo durante la incubación. Los cambios porcentuales pueden incluir aumentos o disminuciones en la intensidad espectral de un espectro rojo, verde o azul. En otros ejemplos, pueden detectarse diferentes longitudes de onda, o solo se puede analizar una longitud de onda para un cambio de umbral.

En algunos ejemplos, el sistema puede detectar determinados patrones de cambios espectrales a lo largo del tiempo desde un colorante o conjunto de colorantes 710. Esto puede ser cambios espectrales de intensidad que siguen un determinado aumento o disminución de la velocidad, siguen un patrón de aumento y disminución, o aumentar una determinada cierta cantidad o disminuir una determinada cantidad en una ventana de tiempo. En algunos ejemplos,

se puede identificar un patrón de aumentos, disminuciones o cantidades constantes como relevantes para una resistencia al fármaco de los microorganismos en una muestra.

5 Por consiguiente, en algunos ejemplos, los cambios de intensidad espectral pueden representarse en un mapa de calor que muestra el cambio porcentual de la intensidad espectral para cada uno de R, G y B para cada colorante 710, cada 20 minutos durante 48 horas. Un ejemplo de un mapa de calor se ilustra en la figura 6. Estos mapas de calor pueden utilizarse como una primera etapa para reducir la dimensionalidad de los datos, y luego pueden procesarse adicionalmente para identificar patrones coincidentes en los datos, mediante métodos de correlación y otros como se describe en el presente documento. Los cambios en la respuesta pueden emitirse o mostrarse como un mapa de calor que muestra los cambios en respuesta para cada colorante 710 a intervalos de tiempo crecientes desde el nivel inicial. Los cambios en la respuesta pueden mostrarse como diversos cambios en las propiedades espectrales de los colorantes 710.

15 Por consiguiente, estas firmas de resistencia a fármacos pueden identificarse a partir de los datos de imagen de diversos métodos de procesamiento disponibles. Por ejemplo, se pueden obtener conjuntos de datos o una biblioteca de respuestas de organismos resistentes a fármacos, y se guardan en la base de datos y se analizan para determinar patrones o indicadores o colorantes específicos 710 que tienen respuestas indicativas de resistencia a fármacos. Por ejemplo, si se determina que un subconjunto de los indicadores tiene una respuesta relevante que es predictiva de la resistencia al fármaco, entonces se pueden usar varias medidas para identificar esos cambios, que incluyen: una respuesta promedio, un umbral de cambio espectral, una ventana de tiempo de cambio de umbral u otros filtros.

20 En algunos ejemplos, una respuesta promedio del sensor de un conjunto de microorganismos resistentes a fármacos puede tomarse durante determinados periodos de tiempo durante la incubación. Esas respuestas promedio podrían filtrarse luego para encontrar cambios umbral que están presentes significativamente en la mayoría o todas las muestras. A continuación, podrían utilizarse algoritmos de correlación y coincidentes para identificar esas características en nuevas muestras, por ejemplo, para encontrar un cambio espectral umbral o cambios en los indicadores que se apagan para ser significativos en los promedios.

25 Confirmación con los ensayos genómicos

30 Una vez que se identifica un organismo resistente al fármaco usando los sistemas y métodos descritos, los cuidadores pueden usar otros ensayos que confirman los resultados (por ejemplo, ensayos GeneXpert). Por consiguiente, el sistema puede comenzar o modificar el tratamiento una vez que se identifica una infección resistente al fármaco, entonces otro ensayo puede confirmar o especificar adicionalmente el organismo y el plan de tratamiento.

35 Ejemplos

40 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor la invención reivindicada y no pretenden interpretarse como limitativos del alcance de la invención. En la medida en que se mencionan materiales o etapas específicos, es simplemente con fines ilustrativos y no pretende limitar la invención. Un experto en la técnica puede desarrollar medios o reactivos equivalentes sin el ejercicio de la capacidad de la invención y sin apartarse del alcance de la invención que se define por las reivindicaciones adjuntas.

45 Ejemplo 1: Firmas de *E. Coli* resistentes a carbapenem

50 Las enterobacterias resistentes a carbapenem (CRE) o enterobacterias productoras de carbapenemasa (CPE) son bacterias Gram negativas que son resistentes a la clase de antibióticos carbapenem, considerados los fármacos de último recurso para tales infecciones. Los carbapenémicos son los agentes antimicrobianos más efectivos contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Los carbapenémicos tienen un penémico junto con el anillo betalactámico y, como todos los demás betalactámicos, inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana al unirse e inactivar las proteínas de unión a penicilina (PBP). Esta estructura molecular única les otorga una estabilidad excepcional frente a muchas betalactamasas, incluyendo AmpC y la mayoría de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Los mecanismos de resistencia a los carbapenémicos han surgido bajo la presión del uso de carbapenémicos en entornos clínicos y pueden clasificarse como enzimáticos, mediados por carbapenemasas (betalactamasas que hidrolizan carbapenémicos entre otros betalactámicos) y no enzimáticos, incluida la hiperexpresión de bombas de expulsión por mutaciones. Sin embargo, la resistencia a los carbapenémicos se desarrolla con frecuencia debido a la presencia concomitante de más de un mecanismo. Además, la disminución de la permeabilidad de la membrana externa evita que los antibióticos entren en la membrana celular y proporciona resistencia a determinados tipos de carbapenémicos.

60 La resistencia a los carbapenémicos es una causa importante de morbilidad y mortalidad en los hospitales. Las cepas que albergan mecanismos de resistencia a los carbapenémicos comprometen gravemente la selección de tratamientos apropiados debido al hecho de que la resistencia a los carbapenémicos se asocia comúnmente con la resistencia a otras clases de antibióticos. Por consiguiente, la detección de cepas resistentes a los carbapenémicos y la implementación de medidas estrictas de control de infecciones se vuelven fundamentales para limitar la propagación de los mecanismos de resistencia subyacentes. Por consiguiente, la capacidad de detectar rápidamente la resistencia a los carbapenémicos es fundamental para detener la propagación y la muerte de pacientes con una infección.

Actualmente, la resistencia a los carbapenémicos tarda días en identificarse mediante flujos de trabajo de laboratorio y, por tanto, con frecuencia puede provocar la muerte y propagarse con bastante rapidez en entornos hospitalarios. Por ejemplo, se pueden realizar pruebas de susceptibilidad para determinar si los microorganismos crecen en presencia de antibióticos o pruebas de enzimas carbapenemasas. Por consiguiente, se está convirtiendo en un problema cada vez más crítico de abordar que no tiene una solución lo suficientemente rápida.

Por consiguiente, las CRE se cultivaron en presencia de un sensor 120 para determinar si alguna firma o patrón único podría identificar la resistencia a los carbapenémicos, en un cultivo que no incluía antibióticos de la clase de los carbapenémicos. Sorprendentemente, se identificó una firma resistente a los fármacos carbapenémicos en mapas de calor generados para una respuesta del sensor 120 de *E. coli* cultivada en un medio de cultivo a las 15 horas, un hallazgo revolucionario dado que los métodos más rápidos disponibles actualmente tardan días. Además, la respuesta del sensor 120 para CRE frente a *E. coli* no CRE mostró una diferencia que fue tan dramática en algunos de los tintes del sensor 710 en el sensor 120 durante una determinada ventana de tiempo que incluso podría identificarse con el ojo humano.

Particularmente, este estudio se realizó en 35 muestras de *Escherichia coli* que incluían 16 CRE y 19 muestras no CRE que se tomaron directamente de un hemocultivo primario. Las muestras se cultivarán en medio líquido de hemocultivo aerobio VersaTREK. El inóculo inicial de 10 ml a 16 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml se hizo por triplicado. El detector 130 capturó una imagen del sensor 120 usado en este estudio una vez cada 20 minutos. Se realizó un ensayo Carba-R en una réplica de cada una de las muestras. Carba-R es un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la detección y diferenciación rápidas de los genes responsables de la resistencia a los carbapenémicos.

La figura 7 ilustra los resultados del estudio que muestran un mapa de calor de la progresión de una respuesta del sensor de *E. coli* a lo largo del tiempo. Tal como se muestra, a las 9 horas, el sistema detecta el crecimiento de las bacterias y a las 25 horas el sistema puede detectar un patrón de sensores de *E. coli*. A continuación, a las 15 horas se muestra un fenotipo de susceptibilidad en el mapa de calor que es común a otras cepas de *E. coli*.

La figura 8 ilustra mapas de calor de cepas de *E. coli* susceptibles a carbapenem que todas incluyen la característica de determinada respuesta del sensor que indica una susceptibilidad a carbapenem. Tal como se ilustra, la prueba *Carba-R* fue negativa para cada una de estas cepas. La figura 9 ilustra mapas de calor de *E. coli* resistente a carbapenem que todas carecen de la característica que está presente en las cepas susceptibles, por consiguiente, la falta de la característica significa o indica que estas cepas de *E. coli* son probablemente resistentes a carbapenem. Por ejemplo, en la figura 9, la característica (mayor respuesta del sensor para ciertos indicadores) que estaba presente como un parche rojo en el periodo de tiempo indicado (por ejemplo, a partir de las 15 horas) que significa susceptibilidad, se retrasó un poco y no apareció hasta horas después. Por consiguiente, esta falta de respuesta en la ventana de tiempo indicada parece ser indicativa de una resistencia a carbapenem para *E. coli*.

Tal como se ilustra en la figura 10, la resistencia a carbapenem de *E. coli* se predice por esta demora solo con una precisión del 88 % frente a la exactitud de *Carba-R* del 97,1 %. Además, tal como se muestra en la figura 11, los datos de la figura 10 se pueden utilizar para crear un modelo de regresión que prediga la concentración inhibitoria mínima de carbapenem en función del retraso de la aparición de la característica. Por consiguiente, en algunos ejemplos, el retardo de tiempo de una respuesta umbral para determinados colorantes 710 en el sensor 120 puede procesarse para determinar una concentración inhibitoria mínima ("CIM") de carbapenem sin realizar pruebas o respuestas fenotípicas del fármaco. Esto es particularmente ventajoso, porque la respuesta del sensor 120 sin la presencia de antibióticos puede ser suficiente sola no sólo para determinar la resistencia al fármaco, en particular resistencia a carbapenem, sino para determinar una CIM sin aplicar antibióticos en diferentes concentraciones que tardarían muchas horas más.

Ejemplo 2: Firmas MSSR resistentes al fármaco

La aparición de cepas resistentes a metilina de *Staphylococcus aureus* ("MRSA") también es un problema mundial en la medicina clínica. Se estima que las personas con MRSA son un 65 % más propensas a morir que las personas con una forma no resistente de la infección. Por consiguiente, se probaron bacterias estafilocócicas para determinar si podría identificarse la firma de la resistencia al fármaco.

Específicamente, se sometió a prueba *Staphylococcus* sensible a metilina ("MSSA") para determinar si demostraría una respuesta del sensor similar que indicó la susceptibilidad a los fármacos que era independiente de la cepa y se comparó con *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina ("MRSA"). Por consiguiente, un análisis de respuestas del sensor 120 que comparan la resistencia a la metilina y resistencia a la metilina de *S. aureus* se realizó para determinar si podrían identificarse firmas de resistencia. La figura 12 ilustra un mapa de calor que muestra la respuesta del sensor 120 de tres cepas susceptibles a metilina. Dos de tres muestran una respuesta similar a las cepas susceptibles de *E. coli*. La figura 13 ilustra un mapa de calor que muestra la respuesta del sensor 120 de tres cepas resistentes a metilina. Todos muestran una respuesta similar a las cepas resistentes de *E. coli*. Estos resultados son bastante interesantes, ya que la metilina es un antibiótico en la familia de los antibióticos de la penicilina, no la familia

de los carbapenems, tal como se prueba con *E. coli*. Por consiguiente, la respuesta del sensor 120 de cepas resistentes a meticilina fue similar a *E. coli* resistente a carbapenem. Esto muestra que los métodos descritos para analizar la respuesta de un sensor, en particular, un retraso en un cambio en ciertos indicadores o colorantes 710 en el sensor, pueden utilizarse en diferentes cepas e incluso especies de bacterias y otros microorganismos. Por consiguiente, la técnica de detección descrita puede utilizarse para identificar microorganismos con resistencia a fármacos que aún no se han identificado por especies o cepas. Por consiguiente, esta es una herramienta poderosa ya que los organismos y las cepas evolucionan continuamente a un ritmo cada vez mayor, y se necesita otro mecanismo para identificar la resistencia a fármacos más rápido que fenotípicamente usando pruebas de concentración de fármacos de susceptibilidad y más sólido que la identificación genómica.

Ejemplo 3: cepas de CRE frente a CSE de *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella es un tipo de bacteria Gram negativa que puede provocar diferentes tipos de infecciones relacionadas con la atención médica, tales como neumonía, infecciones del torrente sanguíneo, infecciones de heridas o del sitio quirúrgico y meningitis. Cada vez más, la bacteria *Klebsiella* ha desarrollado resistencia a los antimicrobianos, incluso más recientemente a la clase de antibióticos conocidos como carbapenémicos. Por consiguiente, la identificación y el tratamiento de estas infecciones resistentes a los antibióticos, especialmente en el entorno sanitario, se está volviendo cada vez más importante.

Por tanto, se realizó un análisis en cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenem (“CRE”) y sensibles a carbapenem (“CSE”). Se compararon las respuestas del sensor 120 de cuatro cepas de CSE y cuatro cepas de CRE. En este ejemplo, en lugar de analizar los indicadores o colorantes 710 que cambian más notablemente para *E. coli* y *S. aureus* en el ejemplo 1 y 2, se examinaron otros colorantes indicadores 710 para ver si se podrían identificar patrones adicionales en las respuestas de esos colorantes 710.

Las figuras 14 y 15 ilustran los resultados de esta comparación. Tal como es inmediatamente evidente a partir de los gráficos, se observan patrones muy similares entre las manchas indicadas o los colorantes 710 para la CRE y se observan patrones muy similares entre las mismas manchas o colorantes 710 para cepas de CSE.

Por ejemplo, la mancha 3-B ilustra un cambio ascendente más largo antes de invertir bruscamente la respuesta del sensor. La mancha 3-B muestra un color azul en la respuesta del sensor. Por consiguiente, se pueden implementar algoritmos que se filtran para aumentar el tiempo y, a continuación, determinar cuándo disminuye considerablemente la respuesta del sensor. Por ejemplo, en algunos ejemplos, una pendiente promedio puede determinarse incluso en una ventana de tiempo corto, y cuando se vuelve negativa, puede determinarse una ventana de tiempo del aumento. Si esa ventana de tiempo del aumento es mayor que un umbral dado, en algunos ejemplos, un algoritmo puede convertir un aumento ponderado de la probabilidad de que el microorganismo sea resistente a carbapenem.

La mancha 4-R ilustra una diferencia aún más drástica, donde las cepas susceptibles de la izquierda tienen una respuesta en la que la parte roja del indicador cae bruscamente en un momento justo antes de la marca 40. La mancha 4-R muestra un color rojo en la respuesta del sensor. Tal como puede verse, los indicadores o colorantes 710 a la derecha para la cepa resistente a carbapenem no tienen la misma caída en 40. Por consiguiente, un algoritmo en este caso puede encontrar una pendiente promedio del cambio en el color del componente rojo de la mancha 4. Una vez que la pendiente cambia a una pendiente negativa por debajo de un umbral predeterminado, el algoritmo y el equipo de procesamiento pueden determinar que al menos un microorganismo en el cultivo puede ser resistente a carbapenem. En algunos casos, puede emitirse una probabilidad porcentual de resistencia basada en las características detectadas por el gráfico.

La mancha 11B (que muestra una respuesta del sensor azul) y 16G (que muestra una respuesta del sensor verde), en la Figura 14, y las manchas 29B (que muestra una respuesta del sensor azul) y 35G (visualización de una respuesta del sensor verde) en la Figura 15 ilustran patrones y diferencias similares entre las cepas resistentes y susceptibles. Por consiguiente, en algunas realizaciones, se puede analizar una etapa de procesamiento que analiza la tasa de cambio de uno o más de los colores de uno o más de los colorantes 710. Una tasa umbral de cambio en una cierta ventana de tiempo puede ser indicativa de una falta o presencia de una resistencia o un cambio de umbral en una dirección positiva o negativa. En algunos ejemplos, las firmas en determinadas ventanas de tiempo pueden compararse sólo para determinados colorantes 710 para determinar una resistencia. La resistencia puede ser un cambio porcentual de resistencia, una resistencia a un determinado antibiótico o clase de antibióticos, o ser un modo de resistencia, tal como una bomba de flujo de salida.

Ejemplo 4: cepas de CRE frente CSE de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* CRE muestran tiempos de detección más tempranos y menos variables cuando se comparan con las cepas de *E. coli* susceptibles a carbapenem (*E. coli* CSE). Un método puede tomar imágenes de manera continua y monitorizar los cambios de color en la CSA, mientras que las bacterias crecen en el hemocultivo. Los cambios de color se analizan en tiempo real y se desencadena un evento de detección tan pronto como el software identifica inequívocamente un patrón de firma volátil bacteriana emergente, lo que indica que la muestra de hemocultivo es positiva para el crecimiento bacteriano. La identificación de la tinción de Gram ocurre simultáneamente o poco después

de la detección bacteriana, seguida de identificación de especies. Por ejemplo, un panel de muestras de *E. coli* puede incluir 17 cepas de CRE y el tiempo de detección para las cepas osciló entre 9 horas y 10 horas siendo el tiempo promedio de detección 9,65 horas desde el tiempo de inoculación. La mayoría de las cepas de CRE se detectaron entre 9,3 y 9,7 horas. Por otra parte, 40 cepas de CSE en el panel, mostraron tiempos de detección considerablemente variables que varían entre 9 horas y tanto como 14,7 horas siendo el tiempo promedio de detección 10,2 horas. Más del 50 % de las cepas de CSE mostraron tiempos de detección mayores de 10 horas. La variación en los tiempos de detección para una única cepa no fue más de 20 minutos (un evento de captura de imagen) entre las réplicas técnicas se ejecutó en un solo día, y no más de 40 minutos (dos eventos de captura de imagen) entre las réplicas técnicas ejecutadas en diferentes días independientemente de la muestra de sangre usada para los experimentos. Se realizaron experimentos repetidos con las cepas con tiempos de detección entre 11 y 14 horas para confirmar que los tiempos de detección retardada fueron consistentes en experimentos realizados durante un periodo de 6 a 8 meses. Las UFC por ml de sangre en las botellas oscilaron entre 8 UFC/ml y 18 UFC/ml al comienzo de la ejecución durante todo el periodo en el que se realizaron los experimentos, para todas las ejecuciones. Los tiempos de detección no tenían relación con los perfiles de susceptibilidad a los antibióticos de las cepas, ya que se detectaron varias cepas pan-sensibles tan tarde como 12 – 14 horas.

Las cepas de *E. coli* CRE muestran un retraso característico en la activación del cambio de color a un conjunto específico de indicadores en comparación con las cepas de *E. coli* CSE. La CSA es una matriz de 73 indicadores colorimétricos diferentes incrustados en una matriz de sol-gel, que detectan y discriminan un amplio intervalo de COV emitido por diferentes bacterias que crecen en un medio de hemocultivo (Ref). Los diferentes indicadores representan una combinación cuidadosamente formulada de colorantes para detectar cambios en el pH y la polaridad, analitos electrofílicos, reacciones redox y un huésped de otros productos químicos presentes en el espacio de cabeza de bacterias en crecimiento. Esta mezcla compleja de COV desencadena un cambio en el color de los indicadores reactivos diferencialmente, que es representativo tanto de la naturaleza de los COV como de la velocidad a la que son liberados por las bacterias en crecimiento en el espacio superior. Existe una tasa claramente diferenciable de liberación de COV entre las cepas de CRE y CSE, con cepas de CRE que dan como resultado una activación retardada de los indicadores colorimétricos en las posiciones 21-25 en la CSA en comparación con las cepas de CSE. Las manchas 21-25 pertenecen a un conjunto de indicadores incoloros que responden altamente a compuestos de azufre reducido junto con otras familias volátiles con afinidades menores, y desarrollan color oscuro tras la exposición a compuestos volátiles bacterianos. Estos indicadores mostraron un retraso marcado en el desarrollo de color en las cepas de CRE en comparación con las cepas de CSE, lo que indica que la tasa de liberación de compuestos de azufre reducido fue más lenta en las cepas de CRE. Esto es claramente apreciable cuando se comparan los patrones de emisión de señal de COV de las cepas de CRE y CSE. Un análisis de muestras puede determinar el patrón dinámico del cambio de color que se produce durante el crecimiento bacteriano analizando la tasa de cambio de intensidad de color con el tiempo como mapas de cambio de color, trazas de tiempo y mapas de calor espacio-temporal. Todas las tres modalidades de análisis muestran claramente la diferencia espacio-temporal en la aparición de señales en los indicadores 21-25 entre las cepas de CRE y CSE. Este patrón de emisión retardada de COV se puede denominar como “activador de la característica de susceptibilidad de carbapenem de *E. coli* (Carba-S)” y este retraso en el tiempo de activación puede ayudar a predecir la susceptibilidad a carbapenem de las cepas sometidas a prueba.

Calcular la “demora” en el activador de la característica Carba-S después de la detección de una cepa permite la predicción de la susceptibilidad de carbapenem en *E. coli* con alta precisión. Un paradigma de predicción para la susceptibilidad a carbapenem en *E. coli* se puede encontrar calculando el tiempo que tarda una cepa en generar este grupo específico de compuestos volátiles después de la detección automatizada en un sistema de hemocultivo. Se puede observar un patrón emergente en tiempo real de la señal 21-25 para cada cepa. El punto de tiempo más temprano en el que se observaron señales para todos los cinco indicadores se consideró el “tiempo de activación de la característica Carba-S”. Calcular la diferencia entre el tiempo de activación de la característica Carba-S y el tiempo de detección para cada cepa permite la estimación de un “tiempo de retardo de activación” para cada cepa. Se puede designar una “puntuación de CIM de carbapenem” para cada cepa, que es el valor acumulativo de CIM para los cuatro carbapenems para una cepa individual. El tiempo de retraso de activación puede compararse con la puntuación de CIM de carbapenem para cada cepa.

Existe una clara relación entre el tiempo de retraso de la activación y la puntuación de CIM de carbapenem, con los tiempos de retraso de activación más largos correspondientes a CIM de carbapenem superiores. Las cepas de CRE del 76 % (13/17) mostraron un retraso medible del desencadenante de Carba-S que varía de 9,3 horas a 16,7 horas con el tiempo promedio de retraso de activación de ~12 horas. Por otro lado, el 87,5 % (35/40) de las cepas de CSE mostraron un tiempo de retraso de activación que varía desde tan pronto como 5 horas hasta menos de 9 horas, con un retraso promedio de activación de ~7 horas. Basándose en estas observaciones, un tiempo de retraso de la activación de $\geq 9,3$ horas es un indicador de la resistencia putativa de carbapenem en *E. coli*. La aplicación de este parámetro de retardo de activación, permite la predicción de una susceptibilidad de carbapenem con una sensibilidad y especificidad del 76,5 % (IC del 95 % 49,7 %-92,2 %) y del 87,5 % (IC del 95 % 72,4 %-95,3 %) respectivamente para todas las 57 cepas en un panel de estudio. La precisión de la predicción de la susceptibilidad a carbapenem es del 84,21 %. Cuatro de las 17 cepas de CRE muestran un tiempo de retraso de activación inferior a 9,3 horas y 5 de las 40 cepas de CSE muestran un tiempo de retardo de activación superior a 9,3 horas, que no se ajustó a consideraciones de paradigma de retardo de activación. Al analizar las características de crecimiento de estas cepas, 3/5 de las cepas de CSE positivas falsas crecieron extremadamente lentamente con tiempos de detección entre 11 y

13 horas, lo que da como resultado una activación retardada de la señal 21-25 para estas cepas. Una sola cepa de CRE falsa negativa puede crecer extremadamente rápido con una respuesta volátil muy vigorosa que da como resultado un tiempo de retraso de activación de 4 horas, que es mucho más temprano que el tiempo de activación de la característica Carba-S de todas las demás cepas en un panel. Pueden eliminarse las cuatro cepas, o cualquier número de cepas, con características de crecimiento anómalas. Se puede realizar un análisis secundario del paradigma de predicción de CRE en las 53 cepas restantes. Eliminar las cuatro cepas anómalas aumenta la sensibilidad de un paradigma de predicción de susceptibilidad de carbapenem al 81,3 % (IC del 95 % 53,7 %-95 %) y especificidad al 94,5 % (IC del 95 % 80,5 %-99,1 %). La precisión del ensayo aumentó en casi del 6 % al 90,6 %.

Se puede realizar un análisis de regresión para estimar la relación de los patrones de respuesta de los indicadores en el CSA con la CIM de carbapenem de las cepas de CREc.

El dendrograma metabolómico se puede generar usando los patrones espaciotemporales de liberación de COV y agrupando las cepas resistentes y susceptibles a carbapenem en dos grupos independientes. Los COV liberados desencadenan un patrón espacio-temporal de cambios de color en el conjunto de sensores, de los cuales pueden construirse mapas de calor espacio temporal que reflejan el curso temporal de la salida volátil y las huellas metabólicas específicas de la cepa. La diferencia entre los mapas de calor espacio temporal de las diferentes cepas puede estimar su "afinidad" con respecto a sus perfiles de firma volátil. Para generar dendrogramas metabolómicos que son reflectantes de la firma de COV de las cepas, se puede usar una herramienta de análisis jerárquica de micrómetros. Cada respuesta del indicador se puede normalizar a la desviación estándar de cero y de la unidad. Las diferencias de mapa térmico de tensión pueden calcular "distancias" entre las diferentes cepas, lo que permite la construcción de dendrogramas metabolómicos. Cuando se realiza el análisis para las 53 cepas (excluyendo 4 cepas con propiedades de crecimiento aberrantes), las cepas de CSEc y CREc se agrupan claramente en dos grupos independientes principales. Esto subraya su patrón espacio específico de susceptibilidad de carbapenem de emisión volátil en *E. coli*.

Se puede realizar una prueba genotípica rápida en todos los cultivos de sangre positiva después de que la ejecución se terminase (24 horas) para todas las muestras, y por separado en diez muestras aleatorias (5 CRE y 5 CSE) justo después de la detección. El ensayo puede detectar todos los plásmidos de CRE correctamente para las 16/17 cepas que albergaban el plásmido de CRE. Por ejemplo, una única cepa de CRE sin ningún plásmido de CRE se detectó como negativa para CRE por el ensayo, que también se detectó como CSE. Todas las 40 cepas de CSE se detectaron como negativas para CRE correctamente. No hubo diferencia en el rendimiento independientemente de si el ensayo se realizó al final de la ejecución de 24 horas o justo después de la detección. Los valores de sensibilidad y especificidad del ensayo Xpert Carba-R en el panel completo de 57 cepas fueron del 94,1 % (IC del 95 % 69,2 %-99,7 %) y del 100 % (IC del 95 % 89,1 % -100 %) respectivamente con una precisión del 98,2 %. El 82,3 % de la predicción de CRE y el 87,5 % de la predicción de CSE coincidió entre las dos pruebas. El cálculo del acuerdo entre los dos ensayos dio como resultado un coeficiente Kappa de 0,68 (IC del 95 % 0,47-0,88) que indicó un acuerdo "bueno" entre las dos pruebas. La eliminación de las 4 cepas con características de crecimiento aberrantes no dio como resultado ningún cambio en las características de rendimiento del ensayo Carba-R, pero aumentó el valor de coeficiente Kappa hasta 0,821 (IC del 95 % 0,65-0,99), lo que indicó un acuerdo "muy bueno" entre las dos pruebas. En este panel de 53 cepas, la predicción de CRE mostró un acuerdo del 87,5 % y la predicción de CSE mostró un acuerdo del 94,6 %. Esto indicó que una prueba de sensibilidad carbapenémica putativa del cultivo primario mostró una alta concordancia con una prueba genotípica definitiva como el ensayo Xpert Carba-R.

Por tanto, existe un nuevo paradigma para identificar una firma de susceptibilidad de carbapenem putativa en *E. coli* obtenida durante el hemocultivo primario monitorizando el patrón espacio-temporal de la liberación de metabolitos volátiles. El diseño de CSA permite una detección precisa de los metabolitos volátiles emergentes en el espacio libre de bacterias en crecimiento en el hemocultivo, que es indicativo de no sólo el tipo de metabolitos volátiles, sino también el tiempo y el patrón en el que se liberan durante diferentes fases del crecimiento bacteriano. La monitorización continua de las señales volátiles emergentes del espacio superior bacteriano creciente permite la detección del patrón diferencial de la amplia variedad de compuestos volátiles liberados a lo largo del tiempo, observando la activación selectiva del conjunto específico de indicadores colorimétricos formulados para reaccionar con el conjunto específico de moléculas volátiles correspondiente. Esta característica única del sistema, en oposición a simplemente medir el crecimiento de las bacterias permite la identificación de esta diferencia espacio-temporal en la emisión de compuestos de azufre reducido en cepas de *E. coli*, que se relacionan con su susceptibilidad de carbapenem. La monitorización de la emisión retardada de los compuestos de azufre reducido en las cepas de CRE en comparación con las cepas de CSE permite una predicción precisa de la susceptibilidad a los carbapenémicos en 48/53 cepas de *E. coli* con características de crecimiento normales.

Este es el primer informe de cualquier plataforma de diagnóstico que puede generar una predicción acerca de la susceptibilidad a carbapenem en *E. coli* del hemocultivo primario, obviando cualquier prueba de susceptibilidad posterior. La eliminación de 4 cepas con propiedades de crecimiento anómalas del análisis secundario se basa en el tiempo a los resultados de detección para múltiples cepas de referencia de *E. coli*, para qué estudios rutinarios han ejecutado más de mil réplicas técnicas. El presente ejemplo también eliminó tres cepas de CSE que crecieron extremadamente lentamente y una cepa de CRE que creció extremadamente rápido, lo que confundió la característica de retraso de activación. De estas 53 cepas, el sistema no pudo identificar sólo tres cepas de CRE como CRE, ya que no mostraron la característica de retraso característica observada en las otras cepas de CRE. Una de estas cepas de

5 CRE no transportó ningún plásmido de CRE y también se detectó como CRE-negativo mediante el ensayo Xpert Carba-R. Las dos cepas de CSE que se identificaron como CRE, mostraron un tiempo de retraso de 9,3 horas que era igual que el tiempo de retraso de activación umbral mínimo para cepas de CRE. Sólo 1/13 de las cepas de CRE positivas verdaderas mostraron un tiempo de retardo de activación similar de 9,3 horas. En el panel de 53 cepas de *E. coli*, el 81 % de las cepas de CSE mostraron un retraso de activación de la característica de CRE por debajo de 8 horas y el 68 % de las cepas de CRE mostraron un retraso de activación por encima de 10 horas.

10 Los dos compuestos de azufre reducido volátiles más comunes producidos por bacterias son sulfuro de hidrógeno y metilmercaptano. Unos pocos estudios han notificado variantes positivas de sulfuro de hidrógeno de *E. coli* que fueron diferentes de las típicas cepas de *E. coli* que no producen H₂S (Ref). Sin embargo, estas cepas positivas para H₂S son una excepción y se han informado principalmente en heces de cerdos. Esto no debe tener relevancia para un panel de estudio que consiste en cepas clínicas o cepas de laboratorio de referencia derivadas de huéspedes humanos. Ningún estudio previo ha demostrado ninguna relación entre el grado de producción de metilmercaptano en cepas de *E. coli* y susceptibilidad a antibióticos. La posibilidad de un “coste” metabólico en *E. coli* debido a la adquisición de resistencia a carbapenem, que se refleja como una producción más lenta de componentes de azufre reducidos no parece probable, ya que las cepas de CRE en promedio mostraron tiempos de detección más rápidos que las cepas de CSE. Este fenómeno también está posiblemente no relacionado con los plásmidos de CRE adquiridos por las cepas ya que 3/4 cepas de CRE diferentes que no mostraron el retraso característico de la señal 21-25 contenían plásmidos NDM o KPC. Las otras cepas de CRE que mostraron el retraso específico de la resistencia a carbapenem también contenían plásmidos NDM o KPC. El panel en el presente estudio a modo de ejemplo de cepas de CSE consistió en ESBL, cepas monorresistentes y varias pan-S también. Este fenómeno de activación retardada 21-25 no parecía estar relacionado con la adquisición de ningún otro plásmido inductor de resistencia (aparte de los plásmidos de CRE), ya que ninguna de las cepas de ESBL en el panel de estudio mostró un retraso en la activación de la característica CRE y todas las cepas de CSE que mostraron un crecimiento más lento o un retraso en la activación no característica fueron pan-S.

30 Este nuevo fenómeno, una diferencia en la tasa de liberación de compuestos de azufre reducido, diferencia dos grupos genotípicos o metabólicos distintos de cepas de *E. coli*. Una clase de cepas muestra una tasa de emisión más lenta característica de compuestos de azufre reducido y posiblemente tiene una mayor propensión de adquirir plásmidos de CRE; y una segunda clase de cepas que liberan compuestos de azufre reducido a un ritmo comparativamente más rápido, son relativamente pobres en la adquisición de plásmidos inductores de resistencia, más específicamente plásmidos de CRE. Mediante el estudio de los mapas de calor espaciotemporales del patrón de emisión de COV en *E. coli* creciendo en medios de hemocultivo, se puede encontrar que los compuestos de azufre reducido son uno del último grupo de volátiles que se emiten posiblemente en la última fase logarítmica a estacionaria, ya que incluso la activación de la señal 21-25 más temprana se produce al menos 5 horas después de la detección (~15-16 horas después de la inoculación). La clase de cepas de *E. coli* que muestran una liberación de azufre notablemente más lenta, parece tener una tasa de crecimiento más rápida y una mayor probabilidad de adquirir plásmidos de CRE, mientras que la clase de cepas con tasas de crecimiento variables y tiempos de detección posteriores parecen mostrar una liberación temprana de compuestos de azufre reducido y tener menor probabilidad de adquirir plásmidos de CRE. Esto se somete a prueba por el dendrograma metabólico que da como resultado claramente una separación dicotomosa de las cepas de *E. coli* en grupos CRE y CSE, que podrían ser reflectantes de estas dos clases de cepas. La excelente correlación de la predicción con una prueba genotípica definitiva también puede explicarse por esta propuesta.

45 En resumen, una firma altamente predictiva del fenotipo CRE de *E. coli*, obtenido durante el cultivo primario usando un sistema de hemocultivo basado en CSA, combina la detección y el ID de microorganismos. La prueba Carba-R realizada directamente en muestras de hemocultivo con adiciones positivas también muestra un excelente rendimiento en un conjunto de muestras. El alto nivel de concordancia entre las pruebas fenotípicas y genotípicas justifica la razón para la prueba de reflejo de una determinación de resistencia putativa rápida, sin trabajo, obtenida de la huella digital de cultivo CSA, a un ensayo basado en sonda molecular de confirmación tal como el ensayo Carba-R. Este sistema de cultivo único permitirá un medio de efecto económico para caracterizar la deformación y predecir el perfil de susceptibilidad a carbapenem de *E. coli* durante el cultivo primario y el enlace eficiente a los ensayos de confirmación genómica como el ensayo Carba-R y, por tanto, acelera el tratamiento apropiado.

55 Las cepas *E. coli* usadas en el estudio se obtuvieron de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) “banco de aislamientos de AR”, banco de recogida de cepas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y banco de cepas clínicas de New York-Presbyterian Hospital (Queens, NY, EE. UU.). Todas las cepas de la colección de CDC se caracterizaron bien con respecto a su susceptibilidad a antibióticos y perfil de plásmido. Todo el panel de cepa en el estudio consistió en 17 cepas resistentes a carbapenem (CR) y 40 cepas susceptibles a carbapenem (CS). Dieciséis de los diecisiete cepas de CR contenían plásmidos de CRE que pertenecen a clase NDM (12 cepas) y KPC (4 cepas), con una única cepa que no contiene plásmidos de CRE o ESBL. Las cepas CS representaron una amplia gama de perfiles de susceptibilidad a antibióticos que varían entre la dirección pan-susceptible, monorresistente y ESBL, pero todas eran susceptibles a carbapenems (tabla?). Se prepararon reservas de glicerol para cada cepa y se almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior.

65 Se usaron placas GN4F Gram negativas (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) para determinar las concentraciones inhibitorias mínimas de los carbapenems doripenem, ertapenem, imipenem y meropenem. Se sembraron las cepas

de *E. coli* en placas de agar sangre (BAP) (Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA, EE. UU.) a 37 °C y se subcultivaron una vez más antes de su uso. Se usaron varias colonias de las placas BAP para generar un patrón de 0,5 McFarland (~1.5 × 10⁸ UFC/ml) en solución salina estéril. A partir de esta suspensión, se transfirieron 10 µl a 11 µl de caldo Muelle Hinton ajustado con cationes (MHB) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) para el ensayo de sensibilidad. Después se añadieron 50 µl de la suspensión de MHB a cada pocillo de la placa de Sensititre GN4F y la placa se incubó durante 18-24 horas a 37 °C después de cubrirla con un sello de placa transparente. La placa se leyó usando un soporte de espejo y se registraron los valores de CIM para cada antibiótico. La susceptibilidad requiere que los carbapenems se realizaran según los criterios de concentración de punto de ruptura clínico de 2013 CLSI (µg/ml) para carbapenems para Enterobacteriaceae (Rennie y Jones 2014).

Para la preparación del inóculo, se suspendieron colonias de BAP en solución salina estéril y se ajustó la turbidez a un patrón de 0,5 McFarland. Cada suspensión se diluyó luego en serie y se colocó en placas para confirmar la concentración de las bacterias en la suspensión. Se añadió una suspensión bacteriana de 1 ml correspondiente a una dilución apropiada del patrón McFarland, a una botella de hemocultivo VersaTREK Redox 1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), junto con 10 ml de sangre completa adquirida de Innovative Research (Novi, MI, EE. UU.), para garantizar que la concentración final de bacterias añadidas fuera de 10 UFC/ml de sangre en cada botella (100 UFC por botella). La tapa de cada botella de hemocultivo se equipó con una matriz de sensores colorimétrica (CSA) dentro de un cartucho de sensor patentado (Specific Technologies, Mountain View, CA, EE. UU.) junto con una junta tórica y un biofiltro para asegurar la colocación segura de la CSA en las tapas de la botella. La CSA consiste en una matriz dimensional elevada de diversos indicadores colorimétricos químicamente sensibles incrustados en una matriz nanoporosa impresa en una membrana de PVDF desechable, fabricada por Specific Technologies (Ref). Cada cepa se ejecutó por triplicado durante un periodo de dos a tres días diferentes con al menos dos muestras de sangre diferentes para garantizar la reproducibilidad de las señales obtenidas. Cada experimento fue acompañado por control negativo por triplicado, que contenía frascos de hemocultivo con 10 ml de sangre y 1 ml de solución salina estéril. Una vez completada cada ejecución, el medio de hemocultivo positivo se sembró en un BAP para confirmar la pureza y los recuentos celulares al final de la ejecución. Las muestras de control negativo también se sembraron en placas para confirmar que el medio de cultivo así como la sangre fueron estériles después de completar la ejecución.

Los hemocultivos enriquecidos se ejecutaron en un instrumento de cultivo de sangre (BCI) "Spot-On" para uso exclusivo en desarrollo (DUO) (Specific Technologies, Mountain View, CA, EE. UU.). El instrumento DUO consiste en un ordenador portátil con un software BCI personalizado para la identificación de especies y dos componentes principales; un escáner de lecho plano ajustado sobre la tapa del instrumento y un agitador de 12 botellas para acomodar las botellas de hemocultivo VersaTREK. Después de la inoculación de sangre enriquecida con *E. coli*, las botellas VersaTREK se ajustaron con las tapas del cartucho del sensor, insertada en el instrumento y la ejecución se realizó dentro de una incubadora a 37 °C. Cada ejecución se realizó utilizando el software BCI automatizado, durante el cual las imágenes de los sensores se recogieron automáticamente en un espacio de 20 minutos hasta la finalización de la ejecución a las 24 horas, para registrar secuencialmente el cambio en el color de los indicadores de matriz de sensores en exposición a los compuestos volátiles emitidos por las bacterias en crecimiento. El software BCI está programado para identificar automáticamente la ID de Gram seguida de la identificación de la especie de las bacterias una vez que el hemocultivo se vuelve positivo. Al final de la ejecución, los datos se analizaron utilizando el software Dataviewer desarrollado en Specific Technologies. El software Dataviewer permite la visualización de la tasa en cambio de la intensidad de color de los puntos indicadores en la exposición a COV como gráficos de trazas de tiempo, mapas de calor espacio-temporal y mapas de cambio de color. El patrón espacio-temporal de la aparición de las señales de COV con el tiempo puede determinarse claramente para cada punto usando estos tres modos de visualización de datos.

El ensayo Xpert Carba-R se realizó en cultivos de sangre positiva al final de la serie, así como a la detección (para diez cepas aleatorias). Se añadieron 20 µl del cultivo positivo a la botella de reactivo de muestra proporcionada y se agitaron con vórtex durante diez segundos. Se añadieron 1,7 ml de la mezcla a la cámara de muestra del cartucho Xpert Carba-R (Cepheid Inc., Sunnyvale, CA) y el ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante en un instrumento GeneXpert IV (Cepheid Inc., Sunnyvale, CA). Se registraron las salidas de resultados automatizadas y se compararon con la predicción realizada por el sistema CSA usando los resultados de la susceptibilidad a los antibióticos y el perfil del plásmido (para las cepas de CRE) como prueba de referencia.

Se calculó la sensibilidad, especificidad y valores de precisión del rendimiento de la prueba puntual y el ensayo Xpert Carba-R en comparación con la prueba de susceptibilidad a fármacos fenotípica para antibióticos carbapenémicos, a intervalos de confianza del 95 % (IC del 95 %). El acuerdo entre las dos pruebas se estimó calculando el coeficiente Kappa usando el software de cálculo del coeficiente Kappa en línea para cuantificar el acuerdo (GraphPad Inc, San Diego, CA, EE. UU.).

Se ha desarrollado software Dataviewer para capturar este cambio dinámico de colores en cada indicador a través de la matriz, así como la tasa de cambio del color de cada indicador con el tiempo que a su vez es una medida eficiente de la velocidad a la que las bacterias en crecimiento liberan los compuestos volátiles en su espacio de cabeza.

Conclusiones (objeto que queda fuera del alcance de las reivindicaciones adjuntas)

Las implementaciones del objeto y las operaciones descritas en esta memoria descriptiva pueden implementarse en circuitos electrónicos digitales, o en software, firmware o hardware informático, incluyendo las estructuras descritas en esta memoria descriptiva y sus equivalentes estructurales, o en combinaciones de uno o más de ellos. Las implementaciones del objeto descrito en esta memoria descriptiva pueden implementarse como uno o más programas informáticos, es decir, uno o más módulos de instrucciones de programa informático, codificados en medio de almacenamiento informático para su ejecución, o para controlar la operación del aparato de procesamiento de datos. Alternativamente o además, las instrucciones del programa pueden codificarse en una señal propagada generada artificialmente, por ejemplo, una señal eléctrica, óptica o electromagnética generada por máquina que se genera para codificar información para la transmisión a un aparato receptor adecuado para su ejecución por un aparato de procesamiento de datos. Un medio de almacenamiento informático puede estar o incluirse en un dispositivo de almacenamiento legible por ordenador, un sustrato de almacenamiento legible por ordenador, una matriz o dispositivo de memoria de acceso aleatorio o en serie, o una combinación de uno o más de ellos. Además, aunque un medio de almacenamiento informático no es una señal propagada, un medio de almacenamiento informático puede ser una fuente o destino de instrucciones de programa informático codificadas en una señal propagada generada artificialmente. El medio de almacenamiento informático también puede estar, o estar incluido en, uno o más componentes o medios físicos separados (por ejemplo, múltiples CD, discos u otros dispositivos de almacenamiento).

Las operaciones de procesamiento de datos descritas en esta memoria descriptiva pueden implementarse como operaciones realizadas por un aparato de procesamiento de datos en datos almacenados en uno o más dispositivos de almacenamiento legibles por ordenador o recibidos de otras fuentes.

El término “aparato de procesamiento de datos” abarca todo tipo de aparatos, dispositivos y máquinas para procesar datos, incluyendo, a modo de ejemplo, un procesador programable, un ordenador, un sistema en un chip, o múltiples, o combinaciones, de los anteriores. El aparato puede incluir circuitos lógicos de propósito especial, por ejemplo, una FPGA (matriz de puertas programables en campo) o un ASIC (circuito integrado de aplicación específica). El aparato también puede incluir, además del hardware, código que crea un entorno de ejecución para el programa informático en cuestión, por ejemplo, código que constituye el firmware del procesador, una pila de protocolos, un sistema de gestión de bases de datos, un sistema operativo, un tiempo de ejecución multiplataforma entorno, una máquina virtual o una combinación de uno o más de ellos. El aparato y el entorno de ejecución pueden realizar diversas infraestructuras de modelos informáticos diferentes, tales como servicios web, infraestructuras de computación distribuida e informática de red.

Un programa informático (también conocido como programa, software, aplicación de software, script o código) puede escribirse en cualquier forma de lenguaje de programación, incluyendo lenguajes compilados o interpretados, lenguajes declarativos o de procedimiento, y puede implementarse en cualquier forma, incluyendo como un programa independiente o como un módulo, componente, subrutina, objeto u otra unidad adecuada para su uso en un entorno informático. Un programa informático puede, pero no es necesario, corresponder a un archivo en un sistema de archivos. Un programa puede almacenarse en una porción de un archivo que contiene otros programas o datos (por ejemplo, uno o más scripts almacenados en un documento de lenguaje de marcado), en un único archivo dedicado al programa en cuestión, o en múltiples archivos coordinados (por ejemplo, archivos que almacenan uno o más módulos, subprogramas o porciones de código). Un programa informático puede implementarse para ejecutarse en un ordenador o en múltiples ordenadores que están ubicados en un sitio o distribuidos en múltiples sitios e interconectados por una red de comunicación.

Los procesos y flujos lógicos descritos en esta memoria descriptiva pueden ser realizados por uno o más procesadores programables que ejecutan uno o más programas informáticos para realizar acciones operando en datos de entrada y generando salida. Los procesos y flujos lógicos también pueden realizarse, y el aparato también puede implementarse como, circuitos lógicos de propósito especial, por ejemplo, una FPGA (matriz de puertas programables en campo) o un ASIC (circuito integrado de aplicación específica).

Los procesadores adecuados para la ejecución de cualquier programa informático descrito en la presente memoria incluyen, a modo de ejemplo, microprocesadores de propósito tanto generales como especiales, y uno o más procesadores de cualquier tipo de ordenador digital. Generalmente, un procesador recibirá instrucciones y datos a partir de una memoria de sólo lectura o una memoria de acceso aleatorio o ambas. Los elementos esenciales de un ordenador son un procesador para realizar acciones de acuerdo con instrucciones y uno o más dispositivos de memoria para almacenar instrucciones y datos. Generalmente, un ordenador también incluirá, o estará operativamente acoplado para recibir datos de o transferir datos a, o ambos, uno o más dispositivos de almacenamiento masivo para almacenar datos, por ejemplo, discos magnéticos, magneto-ópticos o discos ópticos. Sin embargo, un ordenador no necesita tener tales dispositivos. Además, un ordenador puede estar integrado en otro dispositivo, por ejemplo, un teléfono móvil, un asistente digital personal (PDA), un reproductor de audio o vídeo móvil, una consola de juegos, un receptor del Sistema de Posicionamiento Global (GPS) o un dispositivo de almacenamiento portátil (por ejemplo, una unidad flash de bus serie universal (USB), por nombrar solo unos pocos. Los dispositivos adecuados para almacenar instrucciones de programa informático y datos incluyen todas las formas de memoria no volátil, medios y dispositivos de memoria, incluyendo a modo de ejemplo dispositivos de memoria de semiconductores, por ejemplo, EPROM, EEPROM y dispositivos de memoria flash; discos magnéticos, por ejemplo, discos duros internos o discos extraíbles;

discos magneto ópticos; discos CD ROM y DVD-ROM. El procesador y la memoria pueden complementarse por, o incorporarse en, un conjunto de circuitos lógico de propósito especial.

5 Para proporcionar interacción con un usuario, determinadas implementaciones y/o porciones del objeto descrito en esta memoria descriptiva pueden implementarse en un ordenador que tiene un dispositivo de visualización, por ejemplo, un monitor de CRT (tubo de rayos catódicos) o LCD (pantalla de cristal líquido), para visualizar información al usuario y un teclado y un dispositivo de señalización, por ejemplo, un ratón o una bola de seguimiento, por el cual el usuario puede proporcionar entrada al ordenador. También pueden usarse otros tipos de dispositivos para proporcionar interacción con un usuario; por ejemplo, la retroalimentación proporcionada al usuario puede ser cualquier forma de retroalimentación sensorial, por ejemplo, retroalimentación visual, retroalimentación auditiva o retroalimentación táctil; y la entrada del usuario puede recibirse en cualquier forma, incluyendo entrada acústica, de voz o táctil. Además, un ordenador puede interactuar con un usuario enviando documentos a y recibiendo documentos de un dispositivo usado por el usuario; por ejemplo, enviando páginas web a un navegador web en el dispositivo cliente de un usuario en respuesta a solicitudes recibidas del navegador web.

15 Las implementaciones de determinadas partes del objeto descrito en esta memoria descriptiva pueden implementarse en un sistema informático que incluye un componente de extremo posterior, por ejemplo, como un servidor de datos, o que incluye un componente de middleware, por ejemplo, un servidor de aplicación, o que incluye un componente de extremo frontal, por ejemplo, un ordenador cliente que tiene una interfaz gráfica de usuario o un navegador Web a través del cual un usuario puede interactuar con una implementación del objeto descrito en esta memoria descriptiva, o cualquier combinación de uno o más de dichos componentes de extremo posterior, middleware o extremo frontal. Los componentes del sistema pueden estar interconectados por cualquier forma o medio de comunicación de datos digitales, por ejemplo, una red de comunicación. Los ejemplos de redes de comunicación incluyen una red de área local ("LAN") y una red de área amplia ("WAN"), una red inter (por ejemplo, internet) y redes entre pares (por ejemplo, redes entre pares ad hoc).

25 Cualquier sistema informático descrito en la presente memoria puede incluir clientes y servidores. Un cliente y un servidor están generalmente alejados entre sí y normalmente interactúan a través de una red de comunicación. La relación de cliente y servidor surge en virtud de programas informáticos que se ejecutan en los ordenadores respectivos y que tienen una relación cliente-servidor entre sí. En algunas implementaciones, un servidor transmite datos (por ejemplo, una página HTML) a un dispositivo cliente (por ejemplo, con el fin de visualizar datos a y recibir la entrada del usuario desde un usuario que interactúa con el dispositivo cliente). Los datos generados en el dispositivo cliente (por ejemplo, un resultado de la interacción del usuario) pueden recibirse desde el dispositivo cliente en el servidor.

35

REIVINDICACIONES

1. Un método que comprende:
- 5 cultivar una muestra que contiene un microorganismo en un medio y en comunicación gaseosa con una matriz de sensores colorimétrica, exponiendo así sensores en la matriz de sensores colorimétrica a compuestos orgánicos volátiles producidos por el microorganismo;
- 10 determinar si el microorganismo tiene un modo de resistencia a al menos una sustancia basándose en una respuesta de los sensores en la matriz de sensores colorimétrica a los compuestos orgánicos volátiles; y
- 15 determinar el modo de resistencia, en donde el modo de resistencia comprende al menos una de una bomba de flujo de salida, una descomposición enzimática de la al menos una sustancia, una alteración de un sitio al que se une la al menos una sustancia, una alteración de una ruta metabólica, o una modificación de una envoltura celular del microorganismo.
2. El método según la reivindicación 1, en donde el modo de resistencia indica una resistencia a múltiples fármacos.
3. El método según la reivindicación 1, en donde la resistencia es una resistencia a un determinado antibiótico.
- 20 4. El método según la reivindicación 1, en donde el modo de resistencia es una bomba de flujo de salida.
5. El método según la reivindicación 1, que comprende además:
- 25 identificar el microorganismo; y
- determinar una susceptibilidad del microorganismo a la sustancia en el plazo de 64 horas, en el plazo de 48 horas, en el plazo de 36 horas, en el plazo de 24 horas, en el plazo de 12 horas, en el plazo de 10 horas, en el plazo de 8 horas, en el plazo de 6 horas o en el plazo de 4 horas después de identificar el microorganismo.
- 30 6. El método según la reivindicación 1, en donde el modo de resistencia es la descomposición enzimática de la sustancia.
7. El método según la reivindicación 1, en donde el modo de resistencia es la alternancia del sitio al que se une la sustancia.
- 35 8. El procedimiento según la reivindicación 1, en donde el modo de resistencia es la alteración de la ruta metabólica.
9. El método según la reivindicación 1, en donde el modo de resistencia es la modificación de la envoltura celular del microorganismo.
- 40 10. El método según la reivindicación 1, que comprende además recoger el microorganismo a partir de un sustrato antes de cultivar la muestra que contiene el microorganismo.
- 45 11. El método según la reivindicación 1, en donde la muestra es de un mamífero.
12. El método según la reivindicación 11, que comprende además recoger la muestra del mamífero, en donde la muestra comprende un gas, un sólido, un líquido o una combinación de los mismos.
- 50 13. El método según la reivindicación 1, en donde la muestra comprende sangre.
14. El método según la reivindicación 11, que comprende además identificar una sustancia susceptible a la que el microorganismo es susceptible basándose en el modo de resistencia del microorganismo a la al menos una sustancia.
- 55

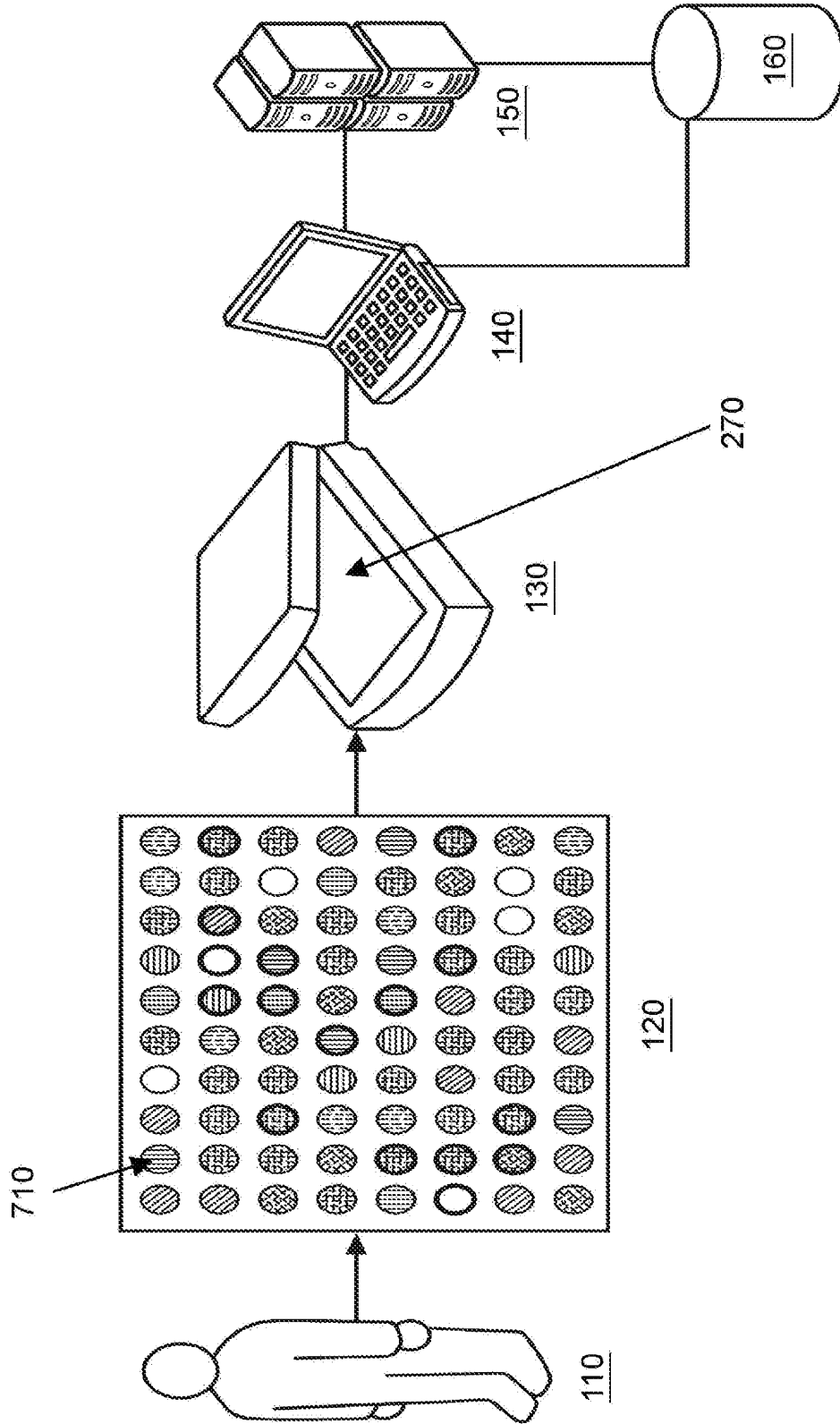


Figura 1

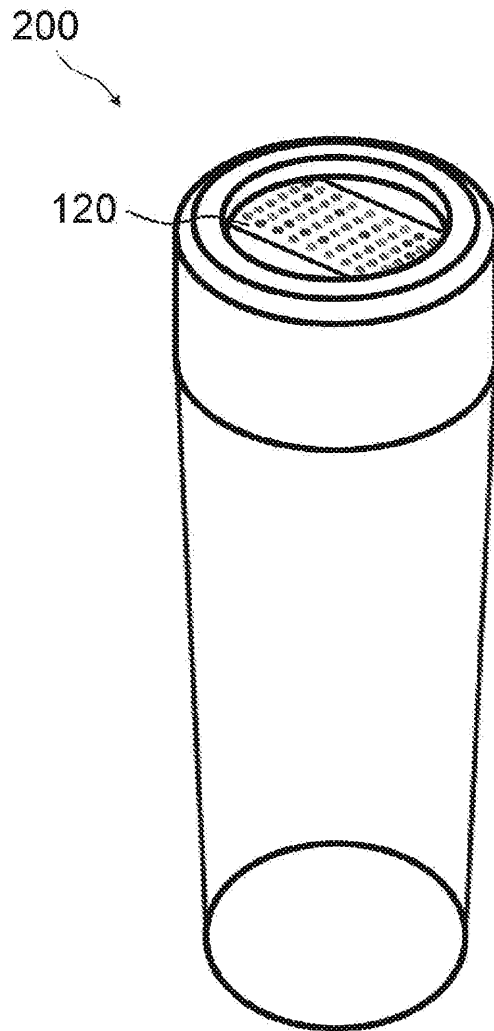


Figura 2

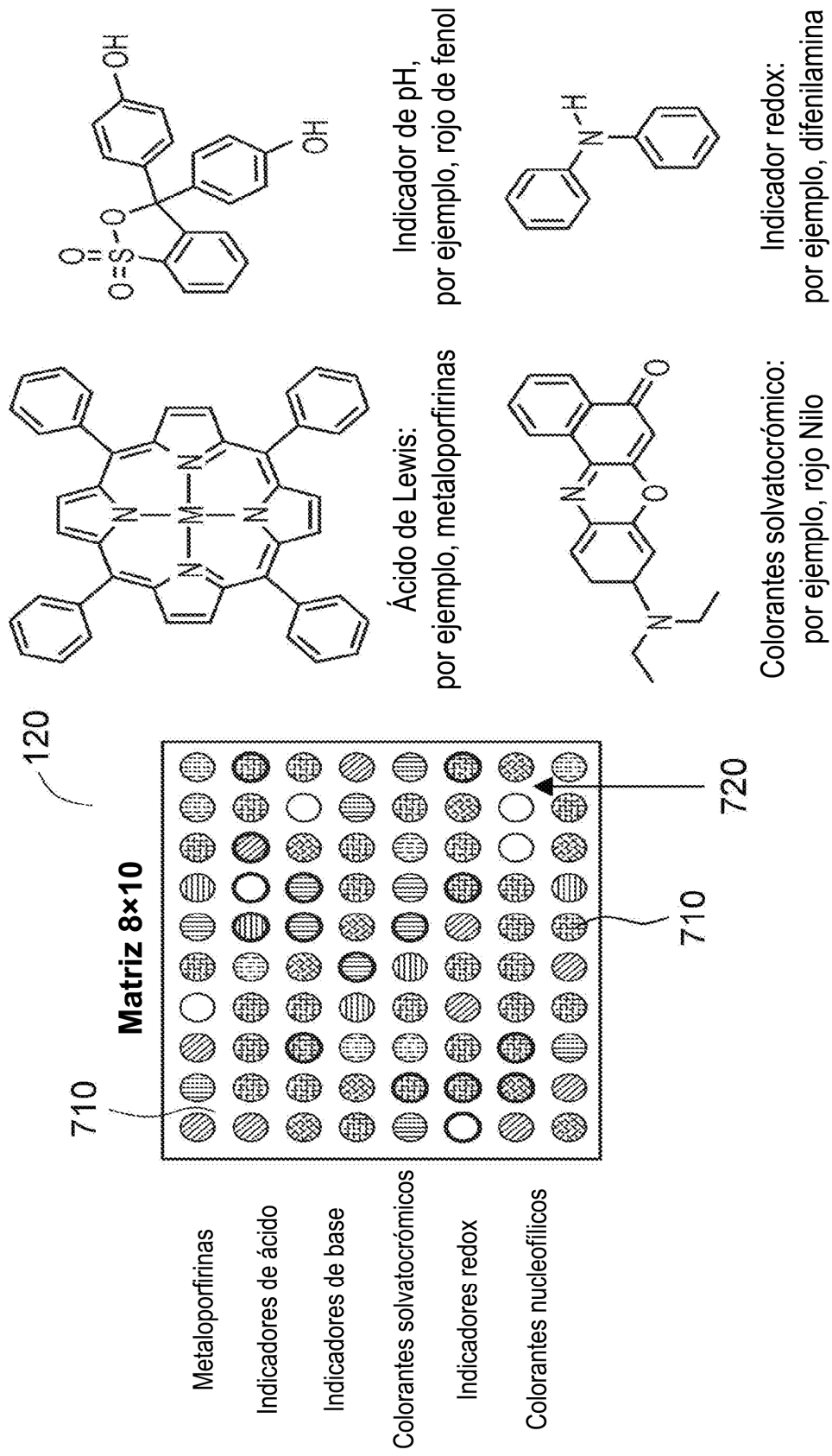


Figura 3

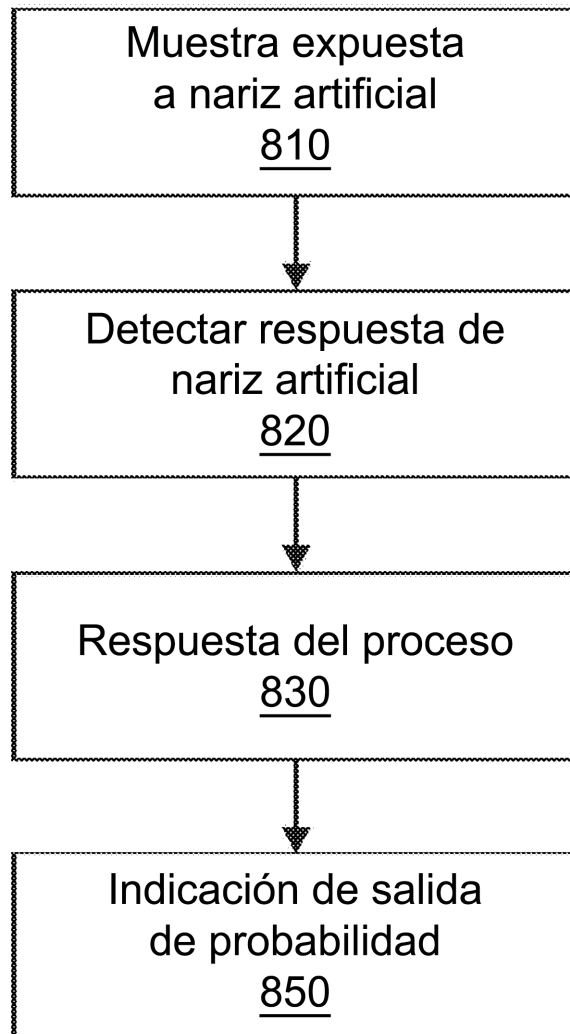


Figura 4

Mapa de diferencias

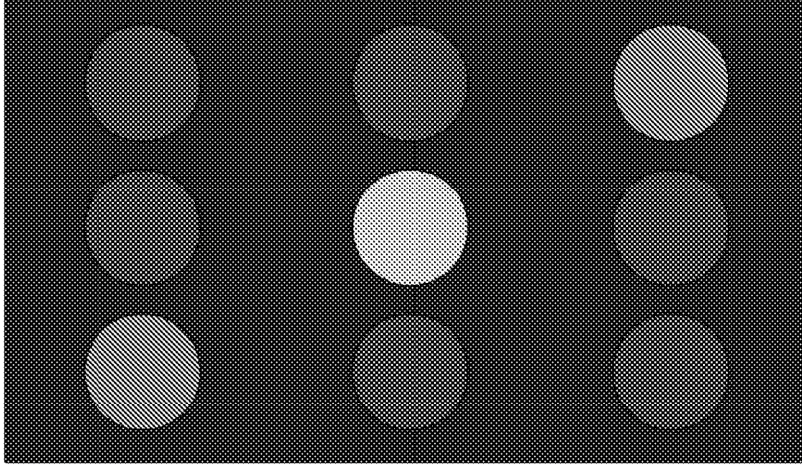


Figura 5C

Después, t_{5h}

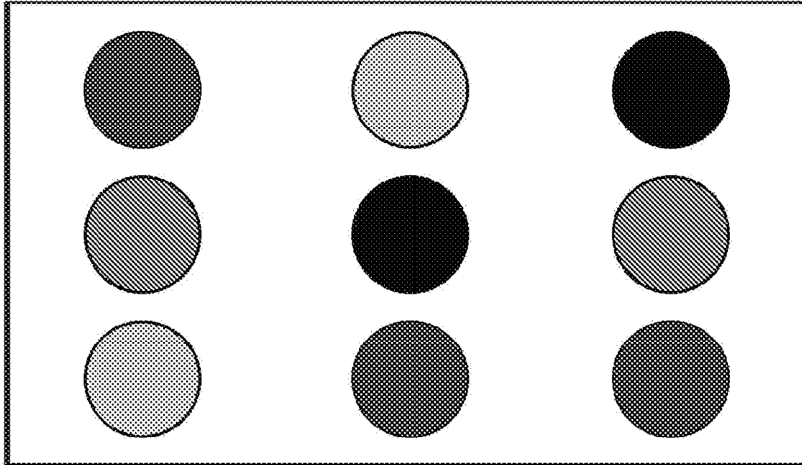


Figura 5B

Inicial, t_0

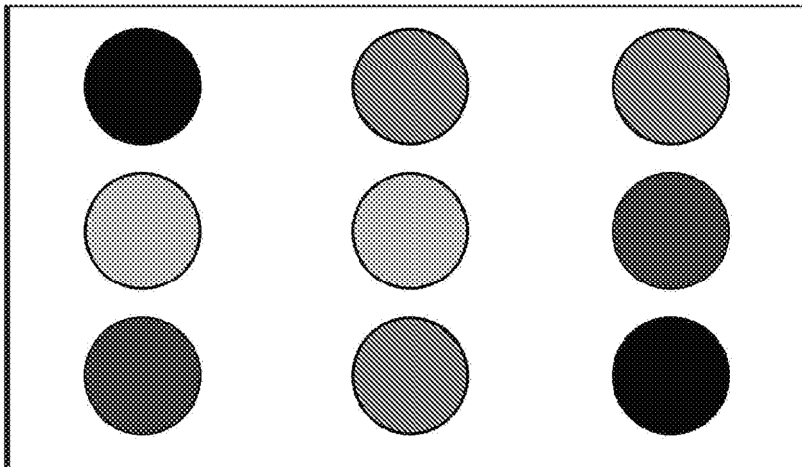


Figura 5A

Figura 5

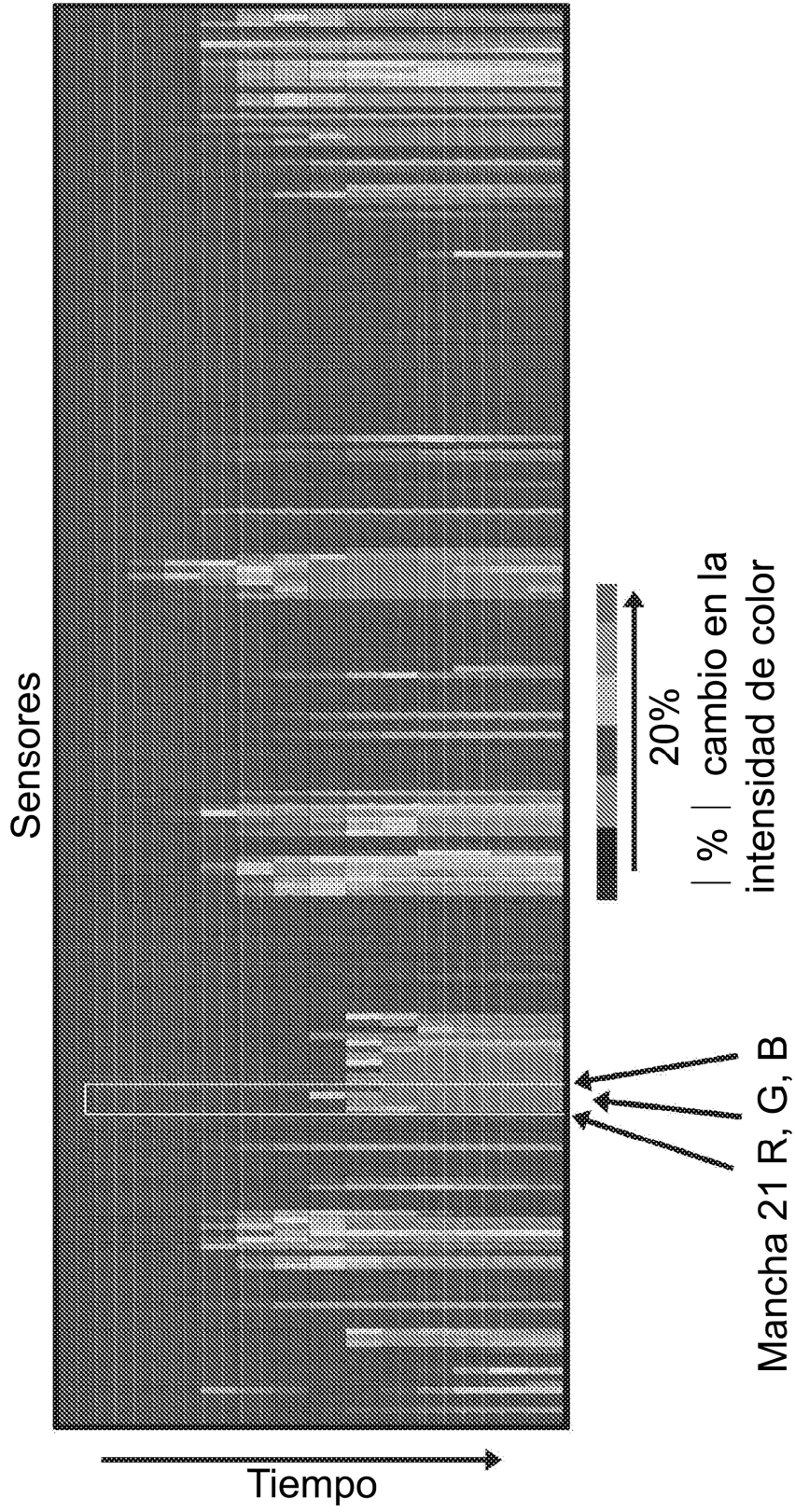


Figura 6

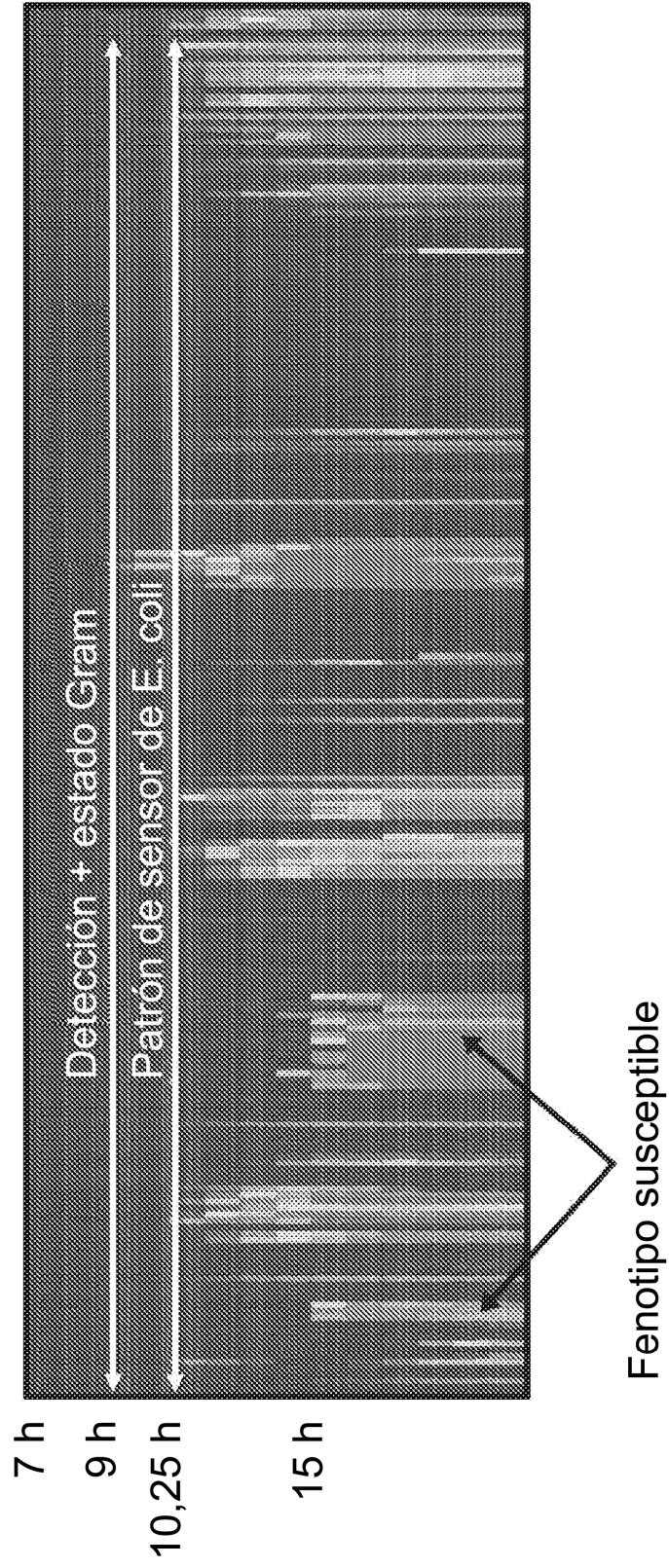


Figura 7

Mapas de calor espaciotemporal de *E. coli* susceptible a carbapenem

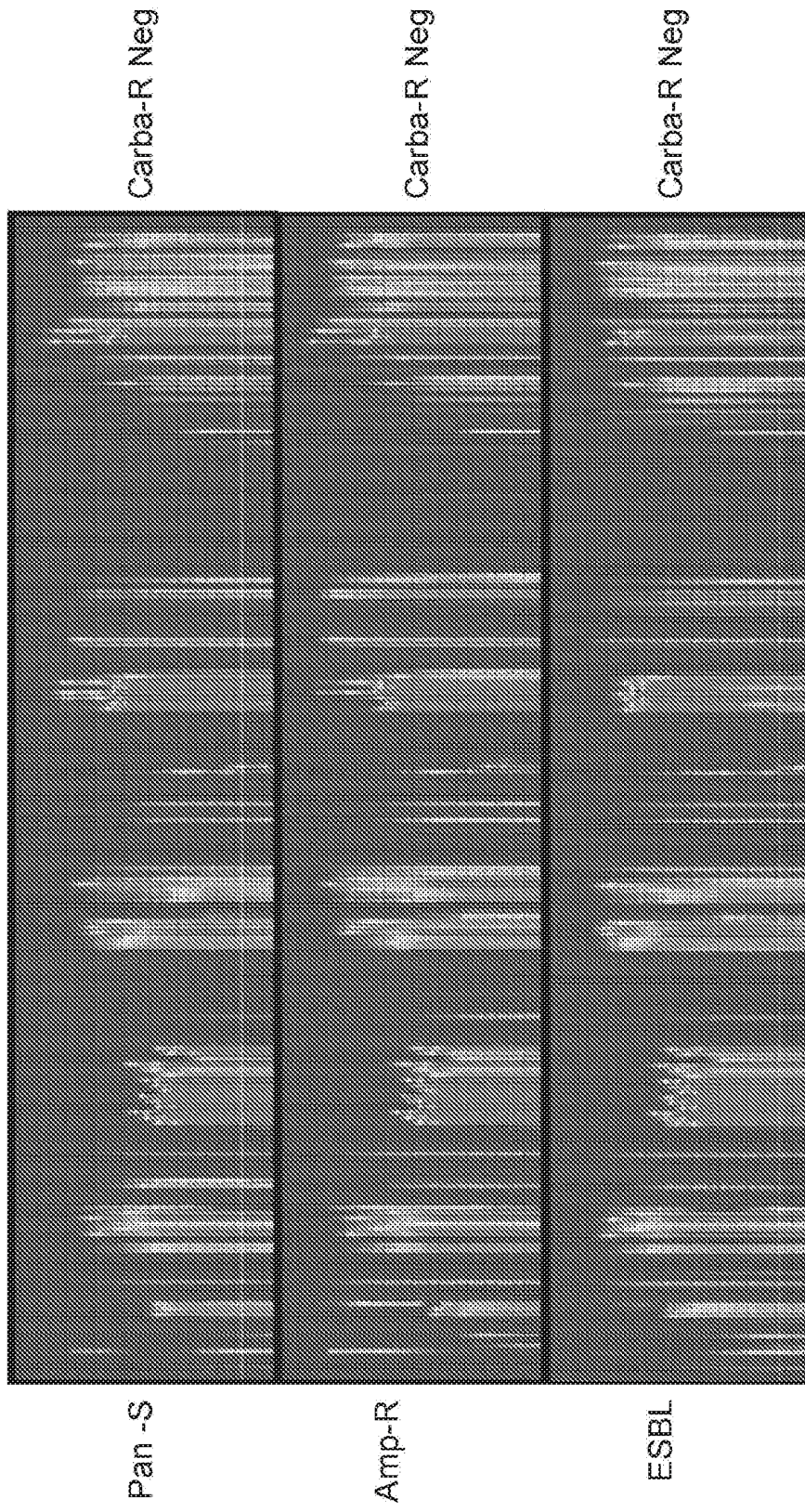


Figura 8

Mapas de calor espaciotemporal de *E. coli* resistente a carbapenem

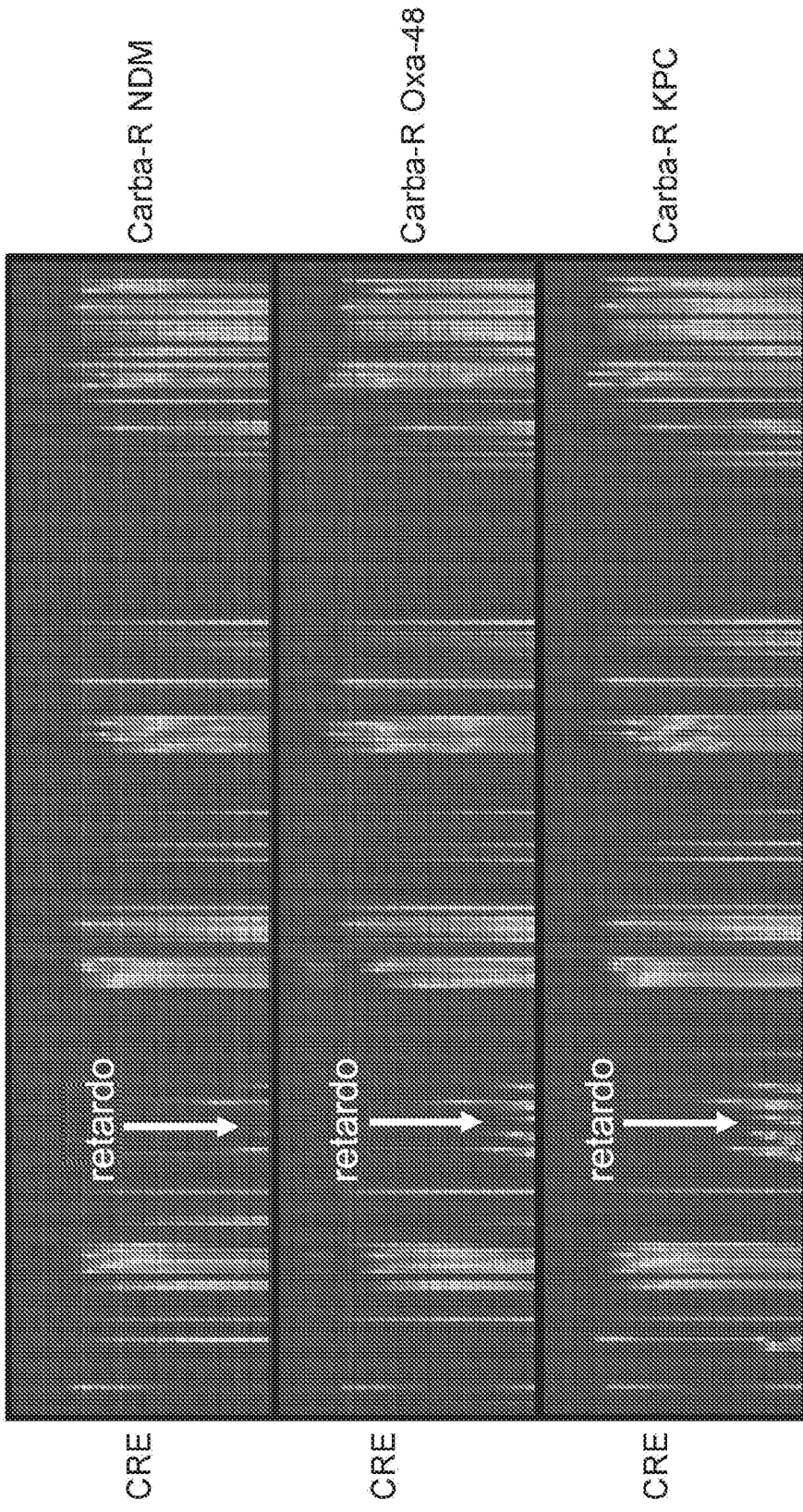


Figura 9

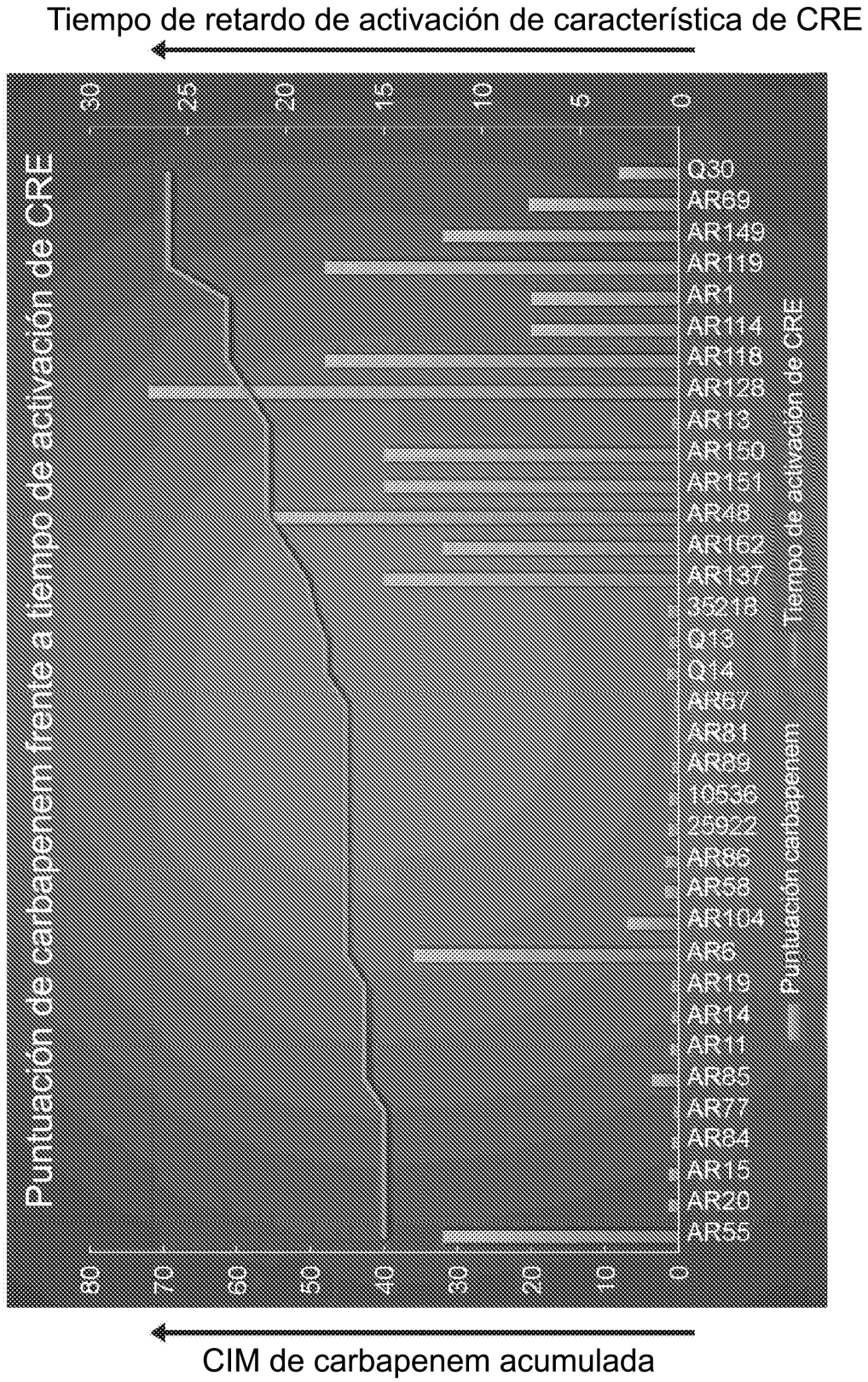


Figura 10

Modelo de regresión predice CIM de carbapenem numérica

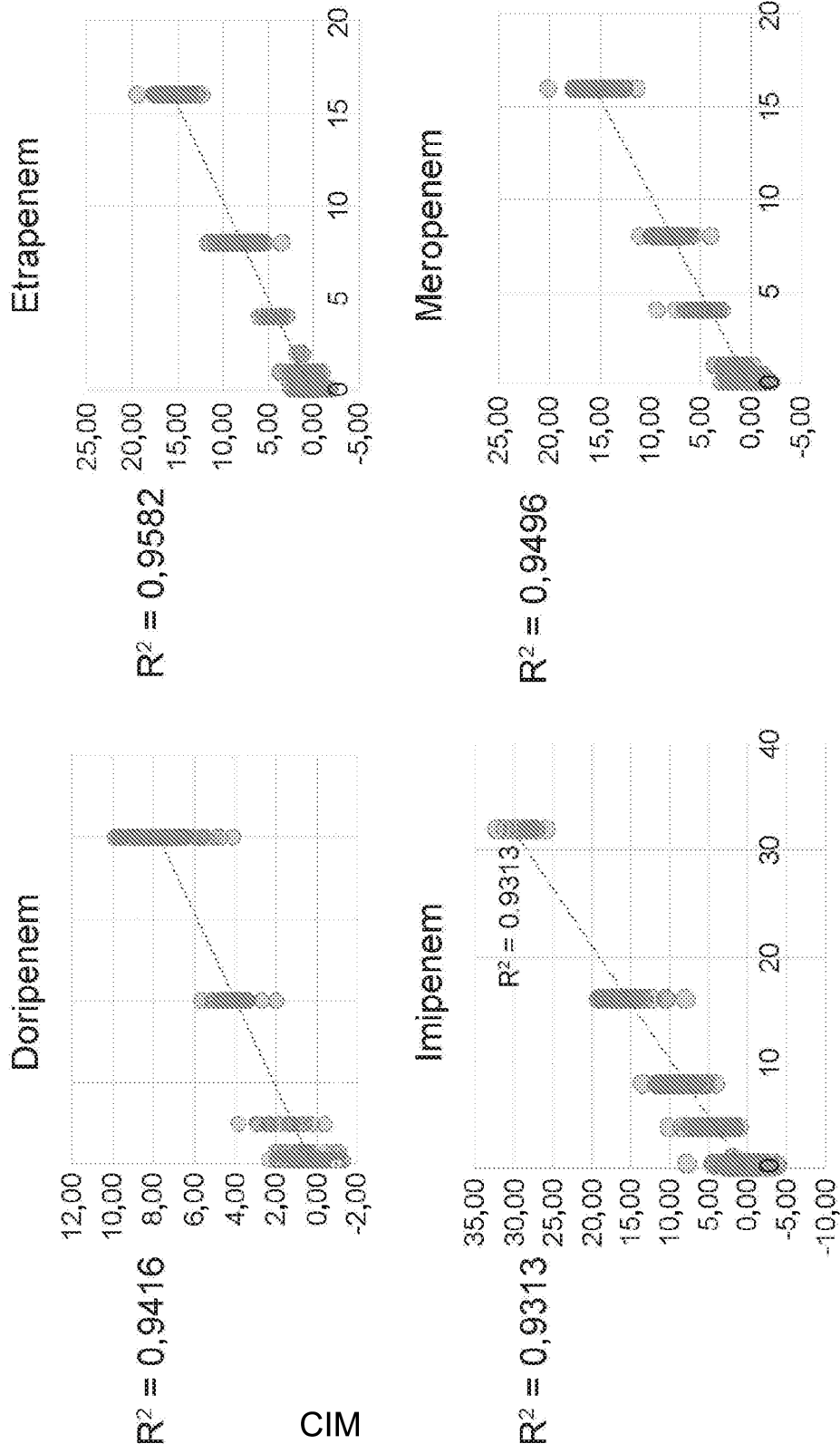


Figura 11

Mapa de calor espaciotemporal de tres cepas MSSA

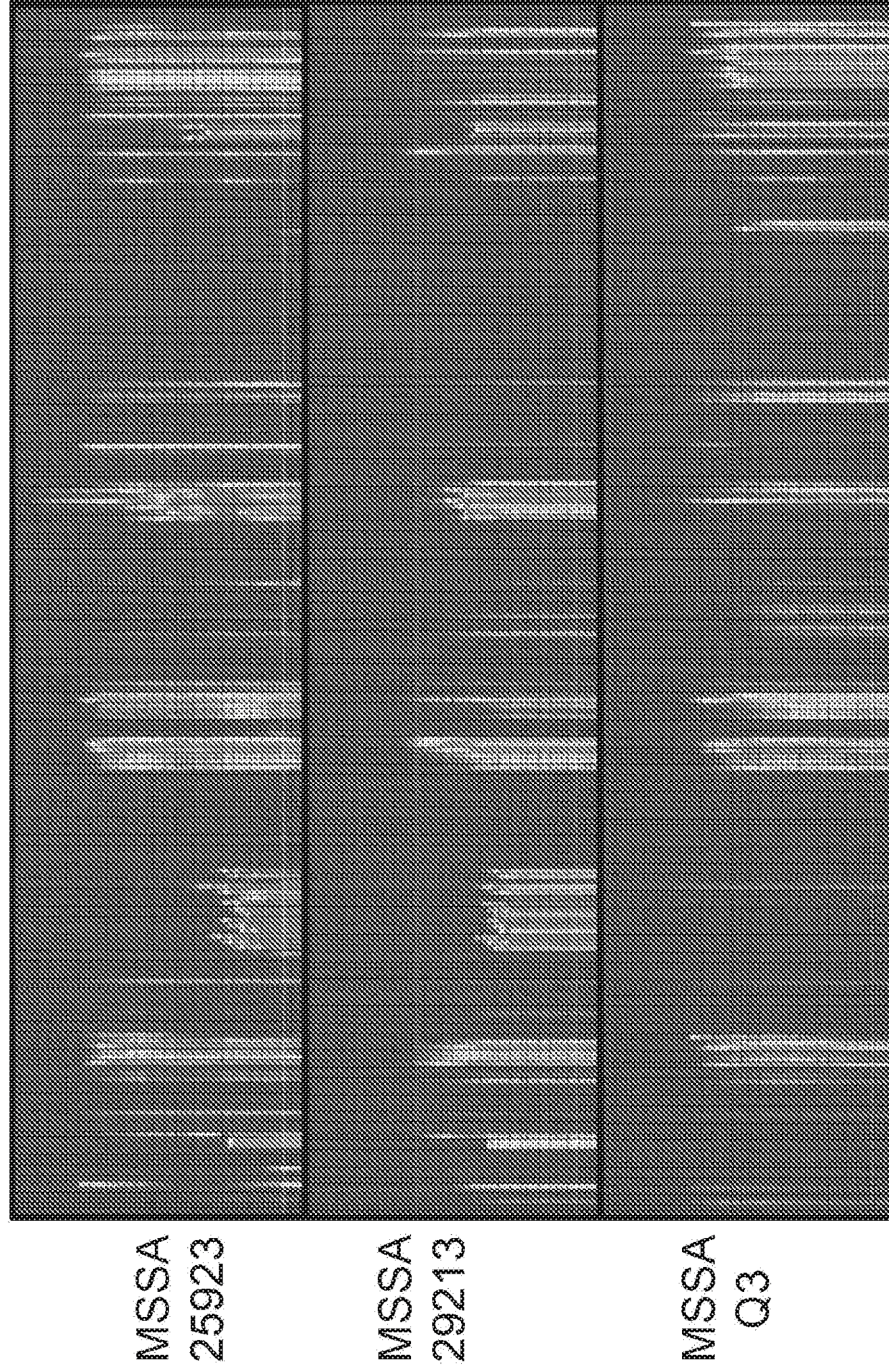


Figura 12

Mapa de calor espaciotemporal de tres cepas MSSA

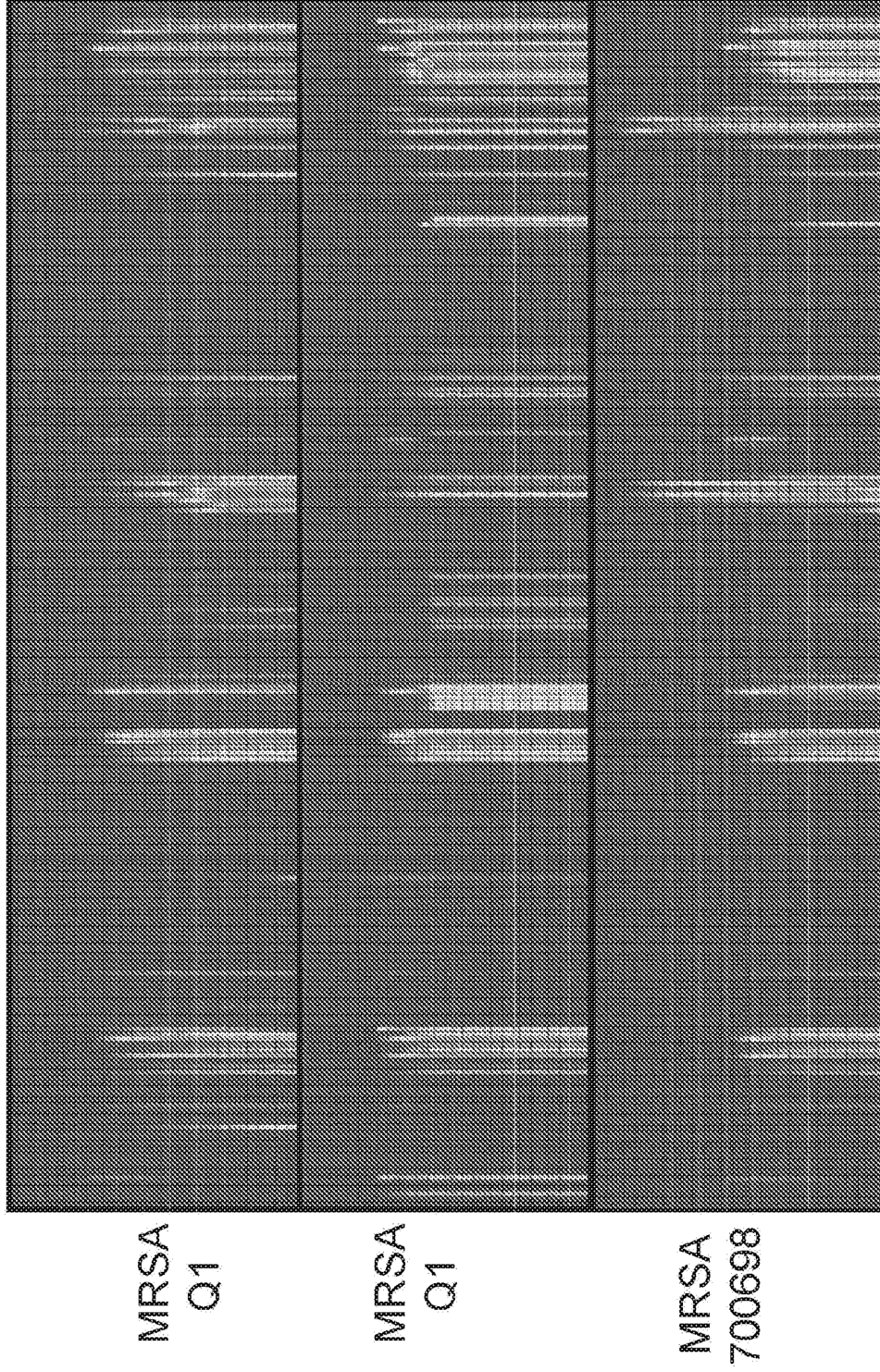
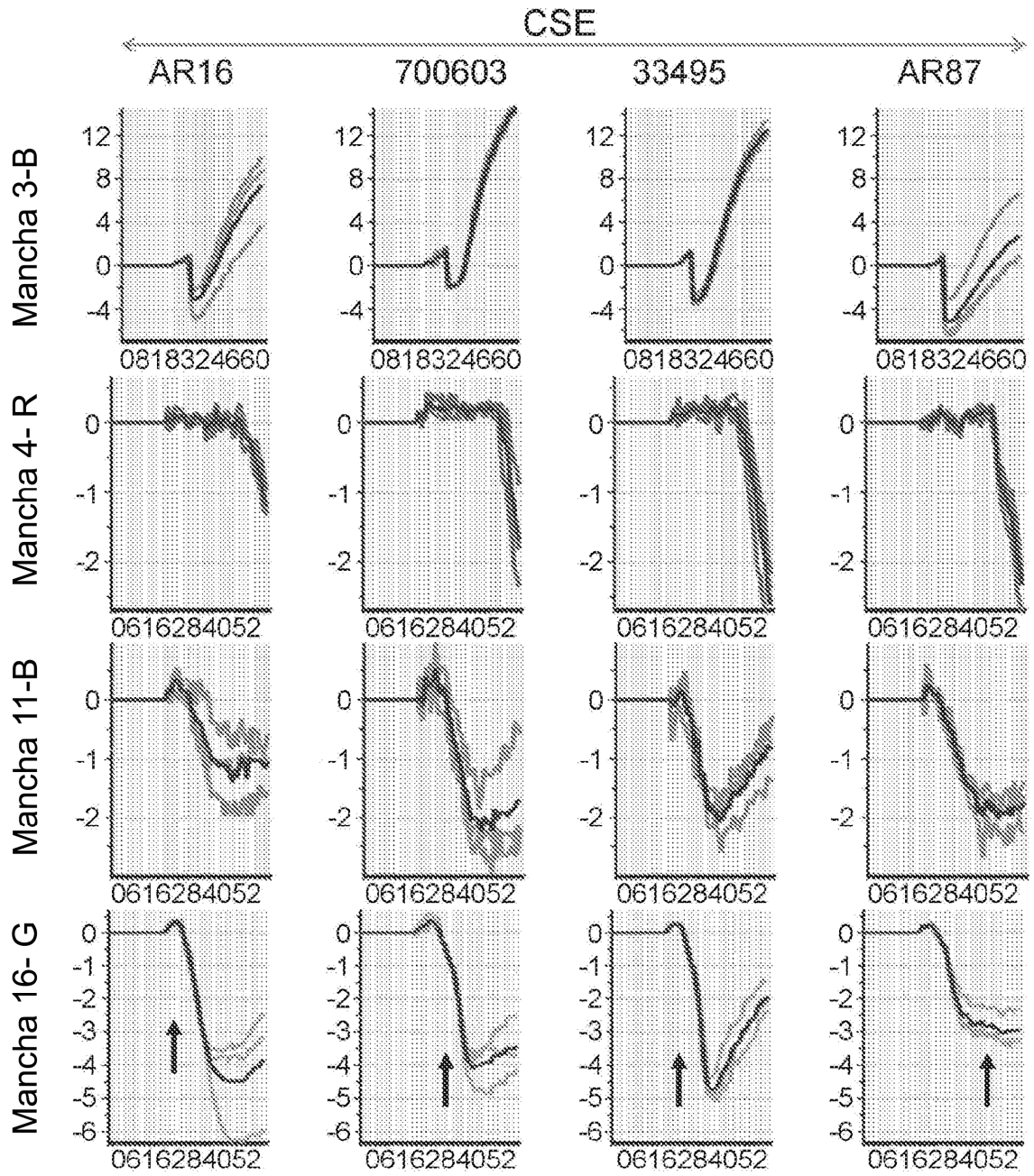
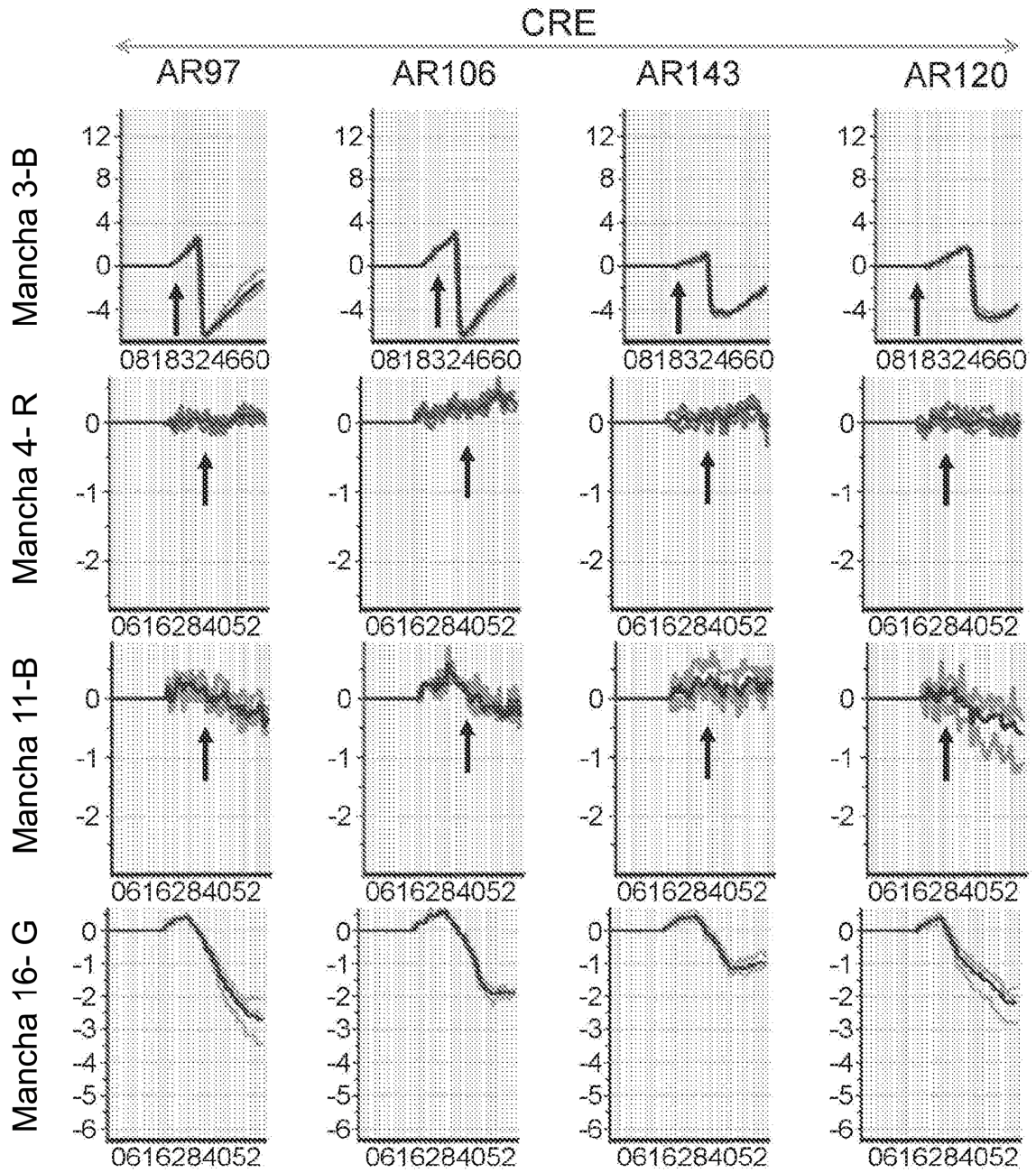


Figura 13



Ref: 7 h
Último: 21 h

Figura 14A



Ref: 7 h
Último: 21 h

Figura 14B

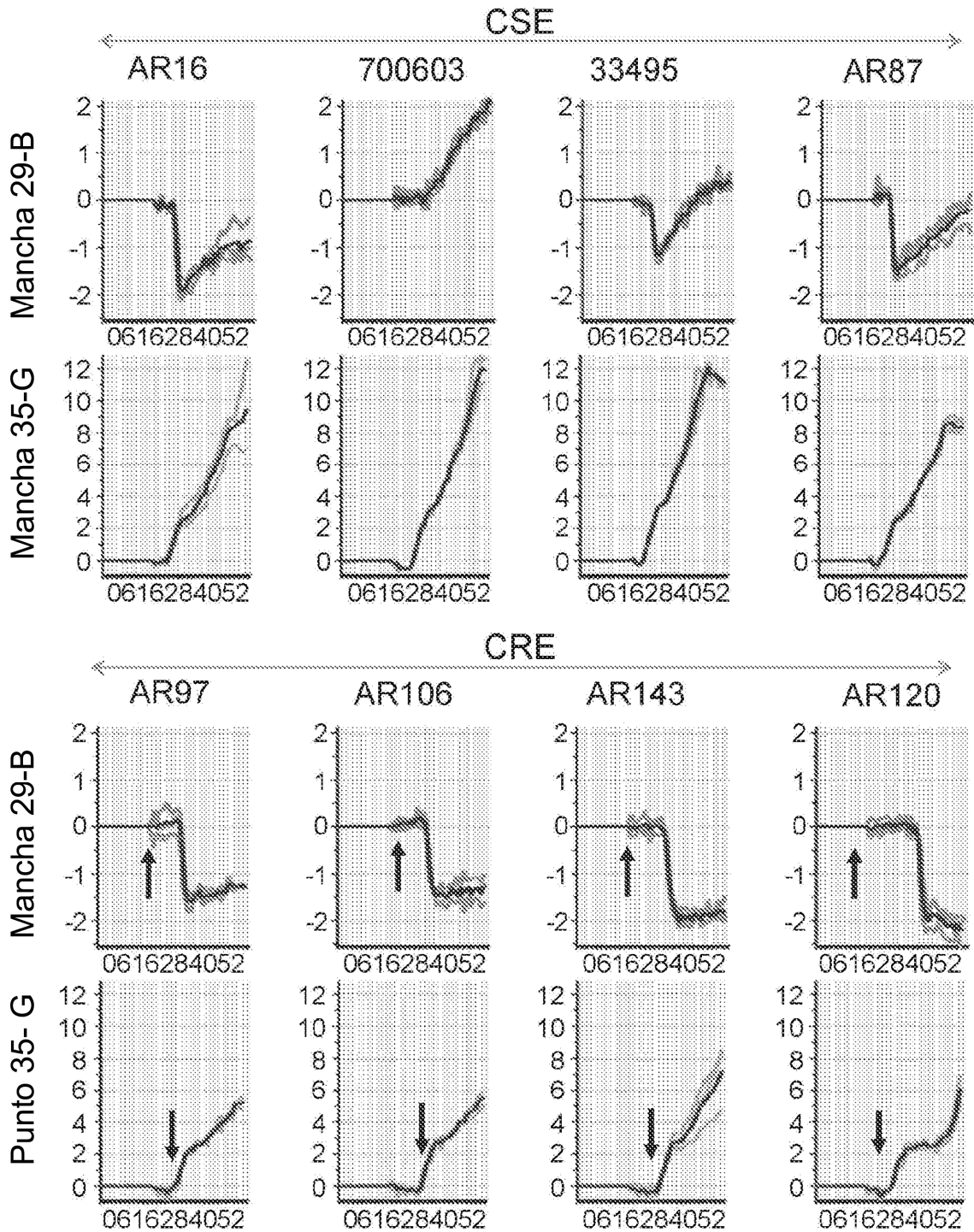


Figura 15