

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 982 089**

51 Int. Cl.:

**G01N 27/02** (2006.01)  
**G01N 27/04** (2006.01)  
**C12M 1/34** (2006.01)  
**C12Q 1/00** (2006.01)  
**C12Q 1/02** (2006.01)  
**C12Q 1/04** (2006.01)  
**G01N 33/487** (2006.01)  
**G01N 33/49** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.10.2015** **PCT/US2015/055501**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2016** **WO16064635**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2015** **E 15853221 (8)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2024** **EP 3207362**

54 Título: **Plataforma de detección de reactancia y capacitancia para detectar microorganismos**

30 Prioridad:

**14.10.2014 US 201462063602 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.10.2024**

73 Titular/es:

**BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)**  
**1 Becton Drive MC 110**  
**Franklin Lakes, New Jersey 07417, US**

72 Inventor/es:

**BEATY, PATRICK SHAWN;**  
**BRASCH, MICHAEL A.;**  
**HOSMANE, SUNEIL;**  
**POLLEY, DAVID;**  
**ROSALES, JULIE L. y**  
**SMITH, KERRY LYNN**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 982 089 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

Plataforma de detección de reactancia y capacitancia para detectar microorganismos

## 5 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere al campo de la detección microbiana en muestras clínicas. La invención se refiere en particular a lograr una detección más rápida de la presencia o ausencia de bacterias en una muestra biológica.

10 La capacidad de detectar microorganismos replicantes (bacterias, hongos, virus) es un requisito fundamental en muchas aplicaciones microbiológicas clínicas. En este sentido, se han desarrollado varios métodos directos y/o indirectos para detectar el crecimiento de organismos.

15 Por ejemplo, los métodos de detección indirecta pueden estimar los efectos de subproductos, moléculas, compuestos o reactivos químicos sobre el crecimiento/replicación de los organismos. Es decir, si los subproductos, las moléculas, los compuestos o los reactivos químicos aumentan, disminuyen o se alteran de manera colectiva y acumulativa como resultado del crecimiento/replicación del organismo. Por ejemplo, las cambiantes demandas metabólicas de una población de microorganismos en crecimiento pueden observarse mediante un cambio en la fluorescencia o mediante un cambio colorimétrico de un sensor elastomérico. Si bien estos mecanismos de  
20 detección son bien conocidos, el umbral de detección se supera cuando las concentraciones de organismos alcanzan aproximadamente  $10^9$  unidades formadoras de colonias (UFC) por botella. Esto da como resultado un tiempo típico de detección (TTD) del orden de 8 a 24 horas para muchos patógenos del torrente sanguíneo clínicamente relevantes. En algunos casos, la detección de ciertos organismos puede requerir más de 72 horas.

25 Además, se han desarrollado sistemas de detección eléctrica para detectar microorganismos viables en solución. En general, estas plataformas utilizan mediciones de impedancia como indicador indirecto del crecimiento de microorganismos. Uno de estos sistemas se describe en el documento WO 2013/123189 presentado el 14 de febrero de 2013 y titulado "Sistema de detección bacteriana basado en la impedancia", que se asigna en común con la presente solicitud. Ramirez, N., et al., "Electrochemical impedance spectroscopy: An effective tool for a fast  
30 microbiological diagnosis", Biotecnología Aplicada, vol. 26, núm. 1, págs. 72-78 (febrero de 2009) describe el uso de la espectroscopía de impedancia electroquímica para detectar y cuantificar bacterias patógenas.

35 Mediante la excreción o absorción de productos cargados (por ejemplo, iones, fosfatos, sulfatos, nitratos) o la producción de intermedios metabólicos cargados (por ejemplo, ácido láctico), la composición iónica total de la muestra se altera cuando se produce el crecimiento microbiano. El crecimiento microbiano afecta a la conductividad (o resistividad) general del medio. Este cambio en la conducción (o resistencia) se manifiesta por cambios en la impedancia eléctrica general de la solución a lo largo del tiempo. La impedancia se mide sumergiendo una pluralidad de electrodos en la solución y midiendo la tensión (por ejemplo, CA o CC) y/o la respuesta de corriente. Estos sistemas suelen utilizar el modelado de datos para adaptarse a un marco teórico en torno a los datos de impedancia  
40 sin procesar para extraer información relacionada con el crecimiento de microorganismos.

45 Por ejemplo, algunos sistemas bien conocidos usan una celda de reacción de 10 ml llena de un caldo especializado. La célula de reacción se inocula con muestras microbiológicas industriales y se incuba durante hasta 24 horas. Se introduce en el tubo una forma de onda de entrada de frecuencia fija (10 kHz) y se monitoriza la impedancia. A medida que la composición iónica del medio cambia en respuesta al crecimiento microbiano a lo largo del tiempo, comienzan a acumularse pequeños cambios en la conducción del medio. Cuando la conductividad ha aumentado por encima de un umbral especificado, se devuelve una indicación de que una muestra ha dado positivo en las pruebas de crecimiento microbiano. Sin embargo, los sistemas de este tipo tienen limitaciones técnicas importantes, de modo que el alcance de su aplicación se ha limitado principalmente a aplicaciones microbiológicas industriales.

50 En este sentido, los sistemas de detección eléctrica adolecen de una limitación técnica, ya que se basan en un cambio de conducción o resistencia en el medio de crecimiento debido a la formación y acumulación de subproductos del crecimiento microbiano. En consecuencia, para medios de alta fuerza iónica, cualquier señal generada por la replicación microbiana se enmascara esencialmente hasta que esté presente una concentración muy alta de microorganismos. Además, muchas  
55 aplicaciones que monitorizan un medio altamente complejo (por ejemplo, la sangre) para determinar el crecimiento y la detección de microorganismos no pueden utilizar técnicas de detección estándar basadas en la impedancia.

Una solución propuesta a los problemas con los sistemas de detección de impedancia sugiere usar un subconjunto de la impedancia total para aumentar la sensibilidad a las mediciones indicativas del crecimiento de microorganismos.  
60 En Sengupta et. al., "A micro-scale multi-frequency reactance measurement technique to detect bacterial growth at low bio-particle concentrations", Lab Chip, vol. 6, págs. 682-692 (2006) (en adelante, "Sengupta"), se utilizó una cámara microfluídica de 100  $\mu$ l de volumen como cámara que se controló para detectar una respuesta que indicara la presencia de bacterias. Sengupta et. al. informan de que la respuesta de detección puede mejorarse en relación con una simple medición de la conductividad dieléctrica proporcionando una cámara en forma de canal larga (escala de  
65 cm) y muy fina (<250 micrómetros) que contenga la muestra, con electrodos muy pequeños colocados en ambos extremos. Mediante el uso de frecuencias muy altas (de 100 kHz a 100 MHz), se midió la contribución de capacitancia

de la muestra líquida. Según Sengupta, la capacitancia de la muestra líquida es sensible a los cambios provocados por la presencia y/o el crecimiento de bacterias en la muestra dispuesta en la cámara.

Sin embargo, Sengupta afirma que las fluctuaciones de temperatura fueron el desafío más importante para el uso del método de usar un entorno microfluídico para analizar la presencia de bacterias en una muestra mediante una medición de la conductividad dieléctrica. Además, Sengupta obtiene y mide una nueva muestra para cada punto temporal analítico. Es decir, Sengupta requiere llenar una nueva cámara de microfluidos (o reemplazar la muestra líquida de la cámara de microfluidos con una muestra nueva) antes de realizar una medición posterior. Este enfoque es destructivo, ya que requiere un consumo de aproximadamente 100-200  $\mu$ l de muestra por hora, ya que cada porción previamente muestreada se descarta. El volumen de consumo de muestras a lo largo del tiempo podría representar un serio desafío, especialmente para las muestras con microorganismos de crecimiento lento o metabolismo lento. Además, la obtención de muestras a lo largo del tiempo conlleva problemas inherentes a la eliminación de residuos de riesgo biológico y a la esterilidad.

Otra desventaja de la técnica descrita en Sengupta es la necesidad de realizar el experimento en la escala de volumen de microlitros. Esto prohíbe que la técnica detecte muestras clínicamente relevantes sin las etapas de preparación o submuestreo adecuados. Además, la técnica utiliza datos espectrales sin procesar de una amplia gama de frecuencias (de cientos a miles de kHz) para ajustarse computacionalmente a un modelo de circuito de la "capacitancia" de la solución. Por lo tanto, existe una complejidad matemática en torno al análisis de los datos, lo que puede resultar en hasta un minuto de tiempo de posprocesamiento por consumible.

Finalmente, Sengupta no supera la incompatibilidad inherente de los medios con alto contenido iónico (por ejemplo, la sangre) con la técnica de impedancia descrita. En cambio, Sengupta evita el problema al limitar el número total de iones al reducir el volumen total de la cámara de detección. Por lo tanto, incluso volúmenes ligeramente más altos provocan una gran pérdida de sensibilidad.

Por lo tanto, existe la necesidad de mejorar el uso de mediciones dieléctricas para detectar la presencia o ausencia de microbios en un líquido.

#### Breve resumen de la invención

Según la presente invención, se proporciona un método de detección del crecimiento microbiano basado en la impedancia según las reivindicaciones 1-4 y un sistema correspondiente según las reivindicaciones 5-11. El método y el sistema basados en la impedancia utilizan un subcomponente, es decir, el componente imaginario (reactancia), de la impedancia total para determinar la composición iónica total del medio. En este sentido, el subcomponente de reactancia tiene una sensibilidad mucho mayor tanto al cambio en los componentes iónicos del medio debido al crecimiento de microorganismos (detección indirecta) como a la masa celular cargada de los microorganismos (detección directa). Esto proporciona un enfoque de detección amplio para tratar un espectro amplio y diverso de microorganismos.

También se describe un método de ajuste para permitir la detección de reactancia dentro de volúmenes de fluido que van desde los rangos de microlitros a mililitros. En este sentido, la sensibilidad de frecuencia del sistema puede cambiarse de 1 kHz a cientos de kHz ajustando el valor físico de las resistencias en paralelo a una etapa de entrada capacitiva de un detector amplificador de bloqueo. Esto da como resultado una mayor sensibilidad a los cambios en la composición iónica (para frecuencias de operación entre 1-20 kHz) y de la biomasa microbiana (para frecuencias de operación muy superiores a 20 kHz).

También se describe un método para ajustar la sensibilidad de frecuencia de la muestra objetivo mediante el uso de un circuito de ajuste de resistencia-condensador en puente. Al ajustar los valores del circuito de ajuste resistencia-condensador puente, la detección se vuelve sensible tanto a los cambios en la composición iónica como a la masa del organismo cargado en el espectro de alta frecuencia ( $\gg$  20 kHz). Por lo tanto, el circuito de ajuste resistencia-condensador puente produce un tiempo de detección (TTD) más rápido.

Además, el ajuste de la respuesta de frecuencia dentro del consumible de prueba permite la detección del crecimiento microbiano en volúmenes relativamente grandes (por ejemplo,  $>10$  ml) de muestra. Esto elimina la necesidad de la técnica anterior de submuestrear constantemente. Se obtienen beneficios adicionales al utilizar los datos de reactancia sin procesar, ya que es posible que ya no se requieran cálculos matemáticos complejos después de cada muestra. La complejidad computacional reducida, junto con la utilización de un rango más estrecho de frecuencias, permite tiempos de escaneo más rápidos (de milisegundos a segundos en lugar de segundos a minutos).

También se describe un sistema con mayor sensibilidad al crecimiento de microorganismos. El sistema incluye un circuito electrónico de procesamiento de señales conectado a una celda de prueba (es decir, consumible) a través de dos o más electrodos que penetran completamente en la celda de prueba y están en contacto con el contenido del fluido. El circuito electrónico está configurado para detectar un componente de la impedancia total, específicamente el componente de reactancia "desfasado" o imaginario, que tiene una respuesta sensible al crecimiento del organismo de una manera dependiente de la frecuencia. El componente de reactancia de la impedancia es bien conocido por los expertos en la técnica y no se describe en detalle en el presente documento. En este sentido, el sistema puede detectar cambios tanto en la composición de las moléculas cargadas en la matriz

líquida como en el número de microorganismos basándose en la monitorización de la muestra para detectar cambios en este parámetro. Esto se traduce en una reducción del 5-70 % en el tiempo de detección (TTD).

Otra ventaja obtenida por el sistema y el método descritos en el presente documento es la capacidad de detectar organismos en una pluralidad de formas, volúmenes y formatos de matriz (o medios) consumibles. En este sentido, los electrodos deben estar completamente sumergidos en un cuerpo continuo de muestra líquida. La distancia entre los electrodos se puede ajustar o ajustar para adaptarse a las necesidades del consumible. Además, las entradas de tensión también se pueden ajustar para permitir la detección adecuada del contenido del consumible.

En este sentido, el sistema actual es capaz de detectar los microorganismos presentes en lo que de otro modo se considerarían muestras "sucias" debido a la naturaleza altamente cargada de las paredes celulares de los microorganismos y sus respectivos cambios en la composición iónica de la matriz líquida. Es decir, el sistema actual puede monitorear el crecimiento en una situación de prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos con contaminantes sanguíneos y otros componentes de la muestra que, de otro modo, interrumpirían las estrategias de detección óptica.

### Breve descripción de las figuras

La figura 1 ilustra un ejemplo, que no forma parte de la presente invención, de un aparato para medir la capacitancia dieléctrica de una muestra líquida para determinar la presencia o ausencia de microorganismos en la misma;

la figura 2 ilustra otro ejemplo, que no forma parte de la presente invención, de un aparato para medir la capacitancia dieléctrica de una muestra líquida para determinar la presencia o ausencia de microorganismos en la misma, por lo que la frecuencia de medición del generador de señales se ajusta automáticamente y se mantiene en la frecuencia de cruce por cero.

La figura 3 ilustra una realización, parte de la invención, de un aparato para medir la reactancia de una muestra líquida para determinar la presencia o ausencia de microorganismos en la misma;

las figuras 4 A y 4B ilustran diagramas de bloques del aparato para medir la reactancia de la muestra líquida;

la figura 5 ilustra un gráfico lineal que muestra el tiempo transcurrido hasta la detección de *E. coli* a diferentes frecuencias;

la figura 6 ilustra los tiempos de detección reducidos obtenidos por las realizaciones descritas en el presente documento;

la figura 7 muestra los resultados experimentales de que el tiempo de detección puede mejorarse usando frecuencias más altas;

la figura 8 ilustra un gráfico lineal que muestra el tiempo transcurrido hasta la detección de *A. lwoffii* a altas frecuencias;

la figura 9 ilustra un gráfico lineal que muestra el tiempo transcurrido hasta la detección de *M. luteus* a altas frecuencias.

### Descripción detallada

Según los ejemplos descritos en el presente documento, la presencia o ausencia de crecimiento microbiano se determina usando una medición de subcomponentes de impedancia. La configuración del electrodo y la frecuencia pueden configurarse como se describe en el presente documento para garantizar que incluso pequeños cambios en la carga iónica del entorno de prueba sean detectables para determinar la presencia o ausencia de crecimiento microbiano.

La impedancia es una medida de la oposición eléctrica que un circuito presenta a una corriente cuando se aplica una tensión. Cuando se opera en un circuito de corriente alterna (CA,  $f > 0$ ), la impedancia se compone de resistencia y reactancia. Por el contrario, la impedancia solo se compone de resistencia en un circuito de corriente continua (CC,  $f = 0$ ). Por lo tanto, la impedancia se puede expresar como:

$$Z = Z_0 + j * Z_r(f)$$

donde  $Z$  = impedancia,  $Z_0$  = resistencia,  $j = \sqrt{-1}$ ,  $Z_r$  = reactancia y  $f$  = frecuencia. Por lo tanto, la impedancia es una característica eléctrica de una sustancia que se compone de dos subcomponentes, resistencia y reactancia.

La resistencia es la oposición al paso de una corriente eléctrica a través de un conductor eléctrico (por ejemplo, alambre metálico, solución de agua salada, etc.). La resistencia es un valor escalar y no depende de la frecuencia. En consecuencia, la resistencia tiene una relación inversa con el número total de especies cargadas estáticas (que no evolucionan) (es decir, iones, protones, aminoácidos, péptidos, moléculas pequeñas, etc.) que están contenidas en una muestra dada. Un aumento en las especies cargadas da como resultado una menor resistencia mientras que, a la inversa, una disminución da como resultado una mayor resistencia. Durante la replicación microbiana (comúnmente denominada crecimiento microbiano), el número total de partículas cargadas seguirá cambiando de manera dependiente del organismo. Por ejemplo, a medida que las nuevas células se dividen, los iones se toman

del medio y se incorporan a las células hijas. Por lo tanto, la división celular da como resultado una disminución del número de especies cargadas. Al mismo tiempo, los organismos metabolizan los nutrientes del medio y producen productos cargados que dan como resultado un aumento en el número de especies cargadas.

La reactancia, por otro lado, es la oposición de un elemento del circuito a un cambio de corriente o voltaje eléctrico, debido a la inductancia o capacitancia de ese elemento. La reactancia es similar a la resistencia eléctrica, pero se diferencia en que la reactancia es sensible a la frecuencia de operación. En consecuencia, la reactancia tiene una relación inversa con el número total de componentes capacitivos que están contenidos en una muestra dada. En este sentido, la capacitancia dentro de las muestras biológicas se manifiesta de dos maneras. En primer lugar, las especies cargadas (normalmente moléculas, células no microbianas, etc.) se acumulan en el sitio de la interfaz del electrodo debido a la aplicación de un voltaje (o potencial) de detección. Esto se debe a que las moléculas cargadas de polaridad opuesta son atraídas por el electrodo cuando se aplica un voltaje (por ejemplo, positivo o negativo) a un electrodo en un intento de neutralizar la carga en el electrodo de superficie. Se forma otra capa de moléculas que tienen la carga opuesta en esas moléculas para crear un “efecto de recubrimiento” que resulta en que casi no hay carga neta en la interfaz del electrodo. Este efecto de recubrimiento da como resultado un condensador eléctrico bicapa o bicapa (por ejemplo, un condensador eléctrico de doble capa) que tiene una carga neutra, como un aislante. Por lo tanto, el revestimiento de tipo aislante provoca un efecto capacitivo (es decir, un aislante flanqueado por el medio conductor y el metal del electrodo), denominado capacitancia de interfaz.

La capacitancia de interfaz ( $C_i$ ) es mayor cuando el sistema funciona a bajas frecuencias ( $<15$  kHz). Con respecto a la detección del crecimiento microbiano, la capacitancia de la interfaz cambia cuando hay cambios en la composición iónica del medio debido a aumentos en la masa celular microbiana y los metabolitos asociados. Como tal, la capacitancia de la interfaz es un indicador indirecto del crecimiento de microorganismos.

El otro factor biológico que contribuye a la reactancia es la capacitancia de la célula. En este sentido, las células humanas y no humanas tienen membranas celulares externas cargadas, seguidas de un núcleo de membrana aislante y, finalmente, componentes celulares internos altamente iónicos (por ejemplo, iones). Esto es similar a la capacitancia de la interfaz discutida anteriormente y se denominará capacitancia celular o capacitancia de membrana ( $C_m$ ).

A diferencia de la impedancia, la conductividad es una medida relacionada con la presencia o ausencia de subproductos bacterianos metabólicos (por ejemplo, gases, tal como  $\text{CO}_2$ ). En este sentido, los componentes capacitivos (y los cambios en esos componentes a lo largo del tiempo) discutidos anteriormente reflejan más directamente la presencia o ausencia de microorganismos (por ejemplo, bacterias) en un recipiente de muestra.

El método y el sistema descritos en el presente documento detectan la capacitancia de interfaz ( $C_i$ ) y la capacitancia celular ( $C_m$ ) tal como se manifiestan por los cambios en la reactancia eléctrica mediante el uso de un circuito de ajuste de frecuencia externo. Esto da como resultado una alta sensibilidad de detección tanto a los aumentos en la biomasa de los organismos como a los cambios en el entorno de la muestra inducidos por la actividad metabólica relacionada con los microorganismos. El circuito de ajuste de frecuencia externo es compatible con una pluralidad de volúmenes de medios que van desde un microlitro hasta más de un mililitro. Además, el circuito de ajuste de frecuencia externo permite una monitorización continua sin necesidad de submuestrear y actualizar periódicamente la muestra que se está utilizando.

La figura 1, que no forma parte de la presente invención, es una ilustración detallada que muestra un aparato para detectar el crecimiento microbiano basándose en una medición de la impedancia capacitiva del componente. Se muestra un amplificador de bloqueo que tiene una etapa de salida 210 y una etapa de entrada 235. La etapa de salida 210 incluye un generador de señal interno que puede usarse para alimentar una señal de RF sinusoidal a un electrodo 211 de una cámara de medición de impedancia dieléctrica 220 (no mostrada). El segundo electrodo 212 de dicha cámara está conectado con la etapa de entrada de señal 235 de dicho amplificador de bloqueo. Si bien en las figuras se muestra un amplificador de bloqueo y se describe en los ejemplos del presente documento, un experto en la técnica reconocería que se pueden usar otros dispositivos de medición, tales como un medidor LCR o un analizador de redes, en lugar del amplificador de bloqueo.

Según este ejemplo, el líquido de muestra dentro de dicha cámara 220 (no se muestra) está en contacto directo con los dos electrodos y se puede describir mediante el diagrama de circuito mostrado en el cuadro discontinuo 225. En este sentido,  $C_i$  representa la capacitancia de la interfaz entre los electrodos metálicos y el líquido;  $R_i$  representa la resistencia de la interfaz entre los electrodos metálicos y el líquido;  $R_b$  es la resistencia volumétrica del líquido;  $R_m$  es la resistencia de membrana de los microorganismos; y  $C_m$  es la capacitancia de la membrana.

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

El aparato para detectar el crecimiento microbiano mostrado en la figura 1 incluye una resistencia de adaptación de fuente  $R_s$  (215) y una resistencia de carga de medición  $R_v$  (216). Según la figura 1, la resistencia 215 de adaptación de fuente y la resistencia 216 de carga de medición pueden seleccionarse para una cámara de medición dieléctrica y un líquido determinados, de modo que el espectro de frecuencia del componente desfasado de la señal de medición muestre una característica de cruce por cero que (i) depende del valor de  $C_m$ , y (ii) se establece en una frecuencia convenientemente baja. En ciertos ejemplos, esa frecuencia se establece en un valor igual o inferior a aproximadamente 100 kHz. Esto

permite el uso de amplificadores de bloqueo estándar. Por ejemplo, cuando  $R_s = 500 \Omega$  y  $R_v = 500 \Omega$ , se producen frecuencias de cruce por cero dentro del intervalo de aproximadamente 30 kHz a aproximadamente 100 kHz cuando el medio de muestra líquido es un medio de crecimiento de hemocultivo convencional. Un ejemplo de dichos medios de crecimiento para hemocultivos es un medio Standard Aerobic/F de Becton Dickinson Diagnostics en Sparks, MD.

Según la figura 1, la amplitud de la señal fuera de fase con la etapa de salida 210 del amplificador de bloqueo es inversamente proporcional al valor de impedancia fuera de fase. En otras palabras, el valor de impedancia fuera de fase (por ejemplo, el valor de reactancia) está en su máximo a una frecuencia de cruce por cero de la amplitud de la señal fuera de fase medida. Debe tenerse en cuenta que cambiar las dimensiones de la cámara de medición de la impedancia (alterando así el volumen de la muestra, la relación altura/anchura de la muestra o ambas), o reemplazar el medio de cultivo por otra muestra líquida, probablemente cambiará los valores seleccionados para  $R_s$  y  $R_m$ . Como se ilustra, la etapa 235 de entrada del amplificador de bloqueo proporciona un potencial de referencia. La referencia, tal como se ilustra, es un terreno flotante. Un experto en la técnica apreciará que hay muchas maneras diferentes de proporcionar un potencial de referencia mediante la etapa de entrada, y que la referencia en la figura 1 es meramente ilustrativa y no a modo de limitación.

La figura 2 ilustra un ejemplo alternativo, que no forma parte de la presente invención, de un aparato para medir la capacitancia dieléctrica y la reactancia de una muestra líquida para determinar los cambios en la carga iónica del entorno de prueba usando un ajuste automático de la frecuencia de medición. En este sentido, la salida de señal desfasada 332 de un detector de señal sensible a la fase 330 está conectada a la entrada 335 de un integrador electrónico 340. La salida 345 del integrador 340 está conectada a la entrada de control de frecuencia 305 de un oscilador controlado por voltaje 310 que actúa como generador de señales como en el aparato mostrado en la figura 1. De nuevo,  $C_i$  representa la capacitancia de la interfaz entre los electrodos metálicos y el líquido;  $R_i$  representa la resistencia de la interfaz entre los electrodos metálicos y el líquido;  $R_b$  es la resistencia volumétrica del líquido; y  $C_m$  es la capacitancia volumétrica. Además, la capacitancia volumétrica ( $C_b$ ), como se describe en el documento WO 2013/123189.

En este ejemplo, una señal eléctrica sinusoidal es generada por un oscilador 310 controlado por voltaje ("VCO") y se acopla eléctricamente a un electrodo 311 en contacto con la muestra. Un segundo electrodo 312, también en contacto con la muestra, está conectado eléctricamente a un detector de señal sensible a la fase 330. Como se ha indicado anteriormente, la señal de salida desfasada del detector de señal sensible a la fase está acoplada al integrador 340. Debido a que la salida del integrador 340 está acoplada a la entrada de control de frecuencia del VCO 310, la frecuencia del VCO 310 se ajusta hasta que la amplitud de la señal fuera de fase medida por el detector de señal sensible a la fase esté en cero. Con el tiempo, un aumento en la frecuencia sintonizada a una amplitud de señal desfasada cero indica el crecimiento de microorganismos dentro de la muestra.

En funcionamiento, la tensión de salida del integrador 340 afecta a la frecuencia del oscilador controlado por voltaje. Por ejemplo, si la frecuencia de inicio es inferior a 60 kHz, la amplitud de la señal fuera de fase es positiva. Esto conduce a un voltaje de salida positivo en la salida 345 del integrador y, en consecuencia, a un aumento en la frecuencia del oscilador 310 controlado por voltaje. El aumento de frecuencia continuará hasta que se alcance la frecuencia de cruce por cero (donde la amplitud de la señal fuera de fase es cero). En este momento, cuando la amplitud fuera de fase pasa a ser cero, no se produce ninguna integración adicional. Por lo tanto, la frecuencia del oscilador controlado por voltaje se deja en la frecuencia de cruce por cero, que es de 60,723 kHz según este ejemplo. Si la frecuencia inicial es demasiado alta, la frecuencia real de cruce por cero se aproximará automáticamente desde la frecuencia demasiado alta. La presencia de bacterias podría detectarse registrando la frecuencia de cruce por cero a lo largo del tiempo y detectando un aumento en la frecuencia atribuible al crecimiento microbiano.

La ventaja del aparato ilustrado en la figura 2 es que se puede determinar una frecuencia de cruce por cero con una precisión extremadamente alta. Debido al hecho de que se genera una "señal cero" en la salida del detector de señal sensible a la fase, cualquier desviación en la amplitud del generador de señales o en la ganancia interna del detector de señal sensible a la fase no afectará a la frecuencia de cruce por cero sintonizada automáticamente, que representa la información de salida del sistema.

Volviendo a la figura 3, se muestra una implementación de un sistema 400, que forma parte de la presente invención, para medir la impedancia usando un circuito de ajuste 405 de resistencia puente ( $R_p$ ) y condensador. El sistema de la figura 3 incluye una etapa de salida 410 de un amplificador de bloqueo con un generador de señal interno, un elemento sintonizable de serie variable 415 (es decir, un potenciómetro variable), un consumible 420 que contiene una muestra de líquido, un circuito de ajuste de resistencia-condensador puente (por ejemplo, un segundo potenciómetro variable 405 y un conmutador 425 conectados en serie) y una etapa de entrada 435 del amplificador de bloqueo. En la realización ilustrada, cuando el conmutador está abierto, el sistema funciona a baja frecuencia, y cuando el conmutador está cerrado, el sistema funciona a alta frecuencia.

Como se ha descrito anteriormente, el amplificador de bloqueo con generador de señal interno tiene una resistencia interna típica de  $50 \Omega$ . Además, la etapa 435 de entrada del amplificador de bloqueo tiene una capacitancia típica ( $C_{is}$ ) de 15 pF y una resistencia de entrada típica ( $R_{is}$ ) de  $10 M \Omega$ . En este sentido, el amplificador de bloqueo puede generar la tensión y la frecuencia aplicadas a la muestra líquida. Además, un experto en la técnica reconocería que los dispositivos de medición, tales como un medidor LCR o un analizador de red, pueden usarse sin apartarse del alcance de los ejemplos descritos en el presente documento.

El elemento ajustable de puente variable (Rs) (por ejemplo, un potenciómetro variable) 405 funciona como la resistencia de adaptación de fuente descrita anteriormente. En consecuencia, el elemento ajustable de puente variable (Rs) 405 puede ajustarse a una resistencia (0-10.000  $\Omega$ ) para un consumible 420 (es decir, una cámara de medición) y un líquido de muestra determinados, de modo que el espectro de frecuencia del componente desfasado de la señal de medición muestre una característica de cruce por cero que (i) depende del valor de Cm, y (ii) se coloca a una frecuencia convenientemente baja por debajo de 100 kHz. Esto permite el uso de amplificadores de bloqueo estándar.

El consumible 420 es en gran medida una elección de diseño. En esta realización descrita, el consumible es una botella de plástico o un consumible de plástico similar (no mostrado) con dos aberturas en los laterales espaciadas entre aproximadamente 10 mm y aproximadamente 40 mm. Se coloca un electrodo metalizado (por ejemplo, una pieza cilíndrica de latón galvanizada con oro) en cada abertura y se coloca epoxi (por ejemplo, pegamento) alrededor de la interfaz exterior de plástico/metal para fijar el electrodo en su lugar. Es importante tener en cuenta que el epóxico solo se encuentra en la superficie exterior y no penetra en la zona interior de la botella que contiene la muestra. Es decir, el epoxi no entra en contacto con la muestra.

Un experto en la técnica reconocería que el consumible puede tener una variedad de geometrías y puertos adaptadores para la transferencia estéril de la muestra dentro y fuera de dicho consumible. En este sentido, se pueden usar diferentes consumibles en función de los tipos de muestras del paciente, los volúmenes de muestras a analizar, etc.

Los electrodos metalizados 411, 412 pueden estar hechos de cualquier metal estándar (es decir, de bajo coste) (por ejemplo, cobre, latón, acero, etc.) que tenga un revestimiento conformado (es decir, de un grosor sub-nm a micrómetros) con un metal no corrosivo (por ejemplo, platino, oro, plata) aplicado a los mismos. Este revestimiento conformado de un metal no corrosivo es necesario para ser compatible con matrices de medios/crecimiento con alto contenido (por ejemplo, sangre, orina, esputo). Los ejemplos de técnicas de revestimiento conformado incluyen los procesos de galvanoplastia, pulverización catódica y evaporación. Dichos procesos son bien conocidos por un experto en la materia, y no se describen en detalle en el presente documento. Un experto en la técnica seleccionaría entre las técnicas de revestimiento conformadas convencionales para formar los electrodos descritos en el presente documento.

La configuración del electrodo puede adaptarse a prácticamente cualquier tamaño, geometría y material utilizado en un consumible (es decir, un dispositivo de prueba). Los electrodos (2 o más) pueden configurarse en cualquier formato consumible que se haya provisto de características de tamaño apropiado para recibir los electrodos. En realizaciones alternativas, el consumible puede formarse moldeando por soplado el consumible alrededor de los electrodos. En otros ejemplos, los electrodos pueden extenderse hacia el consumible a través de la tapa del consumible. Este diseño no requiere moldear o pegar los electrodos directamente en el material del consumible. En las realizaciones descritas anteriormente, los electrodos pueden configurarse para formar una trayectoria de conducción entre el mundo exterior y el contenido interior (es decir, el líquido) del consumible.

Los ejemplos de consumibles incluyen viales tradicionales, configuraciones de tubos, cartuchos microfluídicos, etc. Los consumibles adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica y no se describen en detalle en el presente documento.

Los ejemplos de metales adecuados para el electrodo incluyen, pero no se limitan a, plata, oro, zinc, hierro, níquel, aluminio, etc. Además, se podrían usar diferentes recubrimientos metálicos para los electrodos. Además, el espaciado de los electrodos, las configuraciones de los hilos de traza y las dimensiones de los electrodos son en gran medida una cuestión de elección de diseño. El diseño del electrodo depende de una variedad de factores, tales como el medio, el consumible, la muestra, etc. Un experto en la técnica reconocería que se pueden usar una variedad de configuraciones basándose en los ejemplos descritos en el presente documento.

Durante el funcionamiento en aquellas realizaciones en las que los electrodos se colocan dentro del consumible, los electrodos deben sumergirse dentro del líquido de muestra de manera que haya una trayectoria de conducción entre los electrodos. En otras palabras, el mismo cuerpo de líquido que cubre un electrodo también debe cubrir el otro. Además, la presencia de objetos no biológicos dentro de la botella (por ejemplo, epoxi, resina) no debe cubrir los electrodos en una medida que pueda perturbar la trayectoria conductora entre los electrodos, lo que da como resultado datos muy variables y poco fiables.

El sistema está configurado para recibir el consumible (ilustrado esquemáticamente en la figura 3) de manera que se integrará electrónicamente en el sistema 400. Según algunas realizaciones, se puede formar una característica asimétrica en el consumible de manera que el usuario solo pueda insertar el consumible en el instrumento en una orientación predeterminada. Esto garantizará una interconexión adecuada entre el “módulo” consumible y los demás componentes del sistema.

Volviendo a las figuras 4A y 4B, se muestran varias implementaciones del sistema 400 para medir la impedancia en múltiples consumibles. El sistema de las figuras 4A y 4B incluye una etapa de salida 410 de un amplificador de bloqueo, un multiplexor 440, una resistencia de serie variable 415, un consumible 420 con un primer electrodo 411 y un segundo electrodo 412, un agitador 450, un estante 470, una resistencia de puente variable 405, un segundo multiplexor 460, una etapa de entrada

435 del amplificador de bloqueo y un ordenador 500. En la figura 4A, el conmutador 425 está en serie con la resistencia de puente variable 405. Dicha relación entre el conmutador 425 y la resistencia puente 405 también se ilustra en la figura 3. La figura 4B es una configuración alternativa en la que el conmutador 425 es paralelo a la resistencia de puente variable 405.

Según esta realización, los consumibles 420 pueden almacenarse en una plataforma modular 470 basada en estantes. Cada estante 470 puede incluir elementos multiplexores que pueden direccionar hasta 20 consumibles. En consecuencia, puede haber al menos un módulo amplificador de bloqueo de procesamiento digital de señales (DSP) dedicado por estante que será responsable de la adquisición de señales. Por lo tanto, la presente invención contempla una serie de consumibles y conmutadores que permitirán la adquisición de señales para cada consumible de la matriz.

Los circuitos multiplexores 440 y 460 pueden permitir que un ordenador (por ejemplo, 500), una sola placa de detección o un instrumento escaneen una pluralidad de consumibles o subcomponentes de un solo consumible. En aquellas realizaciones en las que un consumible tiene múltiples cámaras con muestra en cada una de las múltiples cámaras, los multiplexores actúan para "conmutar" la conexión (entrada 1+ y salida 1+) del instrumento/circuito de detección a un solo consumible o subcomponente de un consumible. El circuito multiplexor permitiría que relativamente pocos componentes de hardware supervisarán una pluralidad de consumibles. El circuito multiplexor puede tener varias variaciones de funcionamiento, dependiendo del alcance de las configuraciones de multiplexación y consumibles.

En funcionamiento, las mediciones de los consumibles se pueden realizar en serie. Es decir, cada consumible de la matriz puede escanearse de uno en uno. El tiempo de escaneo por consumible puede ser del orden de decenas de segundos. Por lo tanto, cada estante (si está completamente lleno) tardará entre 2-3 minutos en escanearse. El dispositivo informático 500 puede repetir la acción de escaneo cada 10-15 minutos. Cuando la matriz no se está escaneando, puede agitar los consumibles usando el agitador 450 para mezclar y airear completamente el líquido. La agitación se puede realizar mediante desplazamiento vertical, agitación orbital o mediante el uso de barras agitadoras dentro del consumible. El mecanismo de agitación (si es necesario) puede tener una variedad de configuraciones que incluyen mecanismos de agitación horizontal para maximizar la mezcla de la muestra. Un experto en la técnica reconocería que se pueden usar diferentes ejemplos de agitadores a partir de los ejemplos descritos en el presente documento y, por lo tanto, no se analizan con mayor detalle.

La resistencia de puente variable 405 (por ejemplo, el circuito de ajuste resistencia-condensador puente) puede ser un circuito de sintonización externo que conecta físicamente el consumible 420 al instrumento de detección (es decir, la etapa de entrada 435 del amplificador de bloqueo). La resistencia de puente variable 405 puede contener una serie de resistencias variables paralelas (potenciómetros digitales) que permiten la "sintonización y calibración de frecuencia sobre la marcha" de la sensibilidad de frecuencia. En este sentido, la frecuencia de la señal del consumible puede ajustarse entre aproximadamente 1 kHz y aproximadamente 200 MHz. Los parámetros de ajuste (es decir, el rango de frecuencia seleccionado y el voltaje de pico a pico) pueden determinarse por el volumen total del consumible, la metalización del electrodo (por ejemplo, Au, Ag o Pt), el tipo de líquido contenido, etc. Al ajustar la señal consumible a frecuencias bajas y altas, el sistema puede detectar subproductos metabólicos a bajas frecuencias y biomasa de organismos a frecuencias más altas de forma independiente.

Según la presente invención, un conmutador 425 puede conectarse en serie con la serie de resistencias de puente variable 405, tal como se muestra en la figura 4A. En ejemplos alternativos, el conmutador 425 puede conectarse en paralelo con la resistencia de puente variable 405, como se muestra en la figura 4B. Cuando el conmutador está abierto, el sistema puede funcionar a una frecuencia baja (es decir, de 1 a 20 kHz). Como se ha indicado anteriormente, esto permitirá la detección de cambios en la composición del consumible. Cuando el conmutador está cerrado, el sistema puede funcionar a frecuencias más altas (es decir, >> 20 kHz) proporcionando retroalimentación al generador de señales. Como se discutió anteriormente, al operar a frecuencias más altas, el sistema se vuelve sensible tanto a los cambios en la composición iónica del líquido como a la masa del organismo en sí. Al tener la capacidad de ajustar la frecuencia para realizar pruebas tanto en frecuencias altas como bajas, el sistema puede producir un tiempo de detección (TTD) más rápido con volúmenes de muestra más bajos.

La etapa de entrada del amplificador de bloqueo 435 es un equipo especializado que puede extraer una señal con una frecuencia conocida desde un entorno extremadamente ruidoso. Además, un amplificador de bloqueo puede descomponer una señal en subcomponentes principales que son de particular interés. Por ejemplo, un componente de la impedancia total, específicamente el componente de reactancia "desfasado", puede usarse de acuerdo con:

$$Z = \text{Resistencia} + j * \text{Reactancia}$$

$$\text{Impedancia total } |Z| = \sqrt{(\text{Resistencia}^2 + \text{Reactancia}^2)}.$$

En otro ejemplo, los componentes capacitivos (es decir, la capacitancia de interfaz y la capacitancia celular) contribuyen al subcomponente de reactancia total. En consecuencia, el uso de subcomponentes de las señales puede 1) permitir la monitorización continua de cada consumible o subcomponente de un consumible a intervalos específicos (por ejemplo, aproximadamente 10 minutos) durante varios días (por ejemplo, un protocolo de 5 días) y 2) detectar cambios en la composición de las moléculas cargadas y el número de células o componentes biológicos de la muestra.



En este sentido, se puede realizar un análisis de datos una vez que las señales se introducen en la etapa de entrada 435 del amplificador de bloqueo. Según algunas realizaciones, el análisis de datos se realiza en dos etapas para determinar el crecimiento microbiano. En primer lugar, se analizan los datos espectrales sin procesar (es decir, la señal de reactancia detectada frente a la frecuencia) (por ejemplo, pendiente, área bajo la curva, intersección en x, intersección en y, etc.) en cada punto temporal para llegar a un único punto de datos. En segundo lugar, después de obtener una pluralidad de puntos de datos por consumible o subcomponente de un consumible, se aplica un algoritmo generalizado para determinar en qué punto una desviación estadísticamente significativa de los valores de control conocidos indica la presencia de un organismo. Debido a la sensibilidad mejorada al crecimiento microbiano, los ejemplos descritos en el presente documento proporcionan tiempos de detección más rápidos del crecimiento microbiano.

En realizaciones alternativas, se puede usar un único valor de datos extraído de los datos de “reactancia” sin procesar para determinar la presencia o ausencia de crecimiento microbiano. En este sentido, los datos extraídos pueden usar funciones matemáticas para determinar las intercepciones o áreas bajo una curva. Los resultados de estas funciones matemáticas pueden compararse con los valores umbral. Por lo tanto, los cambios acumulados por encima de los valores umbral pueden usarse para diferenciar entre los consumibles que contienen organismos. En consecuencia, el espectro de frecuencia del componente desfasado de la señal de medición muestra una característica de cruce por cero que (i) depende del valor de  $C_m$ , y (ii) se establece en una frecuencia convenientemente baja. La frecuencia se establece en un valor igual o inferior a aproximadamente 100 kHz. Esto permite el uso de dispositivos de medición estándar, tales como los amplificadores de bloqueo descritos en el presente documento, los medidores LCR y/o los analizadores de red.

La invención descrita anteriormente mejora el tiempo de detección (TTD) en un 5-70 % en comparación con los métodos ópticos estándar. Como se describe a continuación, los datos muestran que la detección de varios organismos puede ocurrir con un TTD más rápido cuando se examina con un ajuste de baja frecuencia en comparación con los métodos ópticos tradicionales. Además, los datos indican que la sensibilidad de detección puede mejorarse aún más usando un ajuste de alta frecuencia, lo que resulta en un TTD aún más rápido.

En este sentido, como se ilustra en la figura 5, se llevó a cabo un experimento con un tubo de policarbonato más pequeño que contenía: 10 ml de medio aeróbico estándar BACTEC™, 3 ml de sangre en bolsas, 17 UFC (unidades formadoras de colonias) de organismos de *E. coli* (A25922) y electrodos metálicos con revestimiento de Au (cuerpo de latón) que se extienden hacia el interior del consumible y se sumergen en la mezcla del medio/muestra. Los electrodos del consumible estaban interconectados con los demás componentes del amplificador de bloqueo. La configuración de la resistencia puente para el instrumento se estableció en 187 ohmios, lo que resultó en una sensibilidad espectral en la banda de 40 a 80 kHz.

En comparación con el tubo de control (sin organismo), que se escaneó en paralelo, los TTD mejoraron significativamente para la mayoría de los organismos y medios, como se ilustra en la figura 6. Esto puede indicar una sensibilidad del organismo del orden de  $10^4$ - $10^5$  UFC, que es al menos de 2 a 4 órdenes de magnitud más sensible que los sistemas de medición óptica actuales, que detectan el organismo a aproximadamente  $10^9$  UFC. Estos resultados representan una reducción del 70 % en el tiempo de detección, como se explica con mayor detalle a continuación con respecto a la figura 5. La detección a estos niveles nunca se ha informado y fue completamente inesperada. A modo ilustrativo, se muestran los cambios de frecuencia a lo largo del tiempo para *E. coli* (en comparación con el grupo control). A baja frecuencia, el TTD fue de aproximadamente 10 horas, lo que es hasta un 5-10 % más rápido. A alta frecuencia, el TTD se mejoró a aproximadamente 4 horas, lo que es casi un 70 % más rápido.

Haciendo referencia nuevamente a la figura 6, el experimento descrito anteriormente, cuyos resultados se ilustran en la figura 5, se repitió para la variedad de muestras indicadas en la figura 6. Por ejemplo, con 3 ml de sangre en bolsas y 17 UFC de *S. aureus* (A25923), se detectó el crecimiento en 7-8 horas. A diferencia de las técnicas de detección óptica estándar que detectan el crecimiento de las colonias en aproximadamente 12-14 horas, esto representó una reducción del 42 % en el tiempo de detección.

La figura 6 ilustra los resultados de la realización del experimento con 7 ml de sangre en bolsas y 17 UFC de organismos de *E. coli* (A25922); 7 ml de sangre en bolsas y 17 UFC de *S. aureus* (A25923); 7 ml de sangre en bolsas y 17 UFC de *H. influenzae* (A19418); 7 ml de sangre en bolsas y 17 UFC de *H. faecalis* (A29212); y 7 mL de sangre en bolsas y 17 CFU de *C. glabrata* (A66032).

Por consiguiente, en 7 ml de medio micolítico, el crecimiento de *E. coli* se detectó en aproximadamente 8,5 a 9 horas, lo que representa una mejora en el TTD en comparación con las técnicas de detección óptica estándar para detectar el crecimiento de *E. coli* en medios micolíticos (10-11 horas). El crecimiento de *S. aureus* en medios micolíticos se detectó en aproximadamente 10 horas, lo que representó una mejora del 23 % con respecto a las técnicas de detección óptica estándar. El crecimiento de colonias de *H. influenzae* en medios micolíticos se detectó en aproximadamente 16 horas. Esto representó una mejora del 16 % con respecto al TTD para *H. influenzae* (16 horas) utilizando técnicas de detección óptica estándar. Para las colonias de *H. faecalis* en medios micolíticos, el TTD fue de 11 horas, lo que representa una mejora del 8 % con respecto a un TTD de 11-12 horas utilizando técnicas de detección óptica estándar. El TTD para colonias de *C. glabrata* en medios micolíticos se detectó en aproximadamente 17 horas, lo que representó una mejora del 45 % en el TTD para *C. glabrata* (20-42 horas) utilizando técnicas de detección óptica estándar. La mejora en el TTD para esta muestra en medios aeróbicos estándar con respecto a las técnicas ópticas estándar también se informa en las figuras 5 y 6.

La figura 7 ilustra que el tiempo mejorado de detección logrado para los volúmenes más pequeños descritos anteriormente también se logra para volúmenes más grandes de muestra/medios. Específicamente, se combinaron 40 ml de medio BACTEC estándar y 10 ml de sangre en un frasco BACTEC. La muestra se detectó con 50-60 UFC de *E. coli*. A baja frecuencia, usando el aparato y el método descritos en el presente documento, el TTD fue de 10,5-11 horas, lo que es hasta un 5 % más rápido. A alta frecuencia, el TTD se mejoró a 9,5-10 horas, lo que es hasta un 14 % más rápido.

La figura 5 ilustra el tiempo transcurrido hasta la detección de *E. coli* a diferentes frecuencias. Todos los consumibles se prepararon de la misma manera y la única diferencia fue la presencia o ausencia de organismos y los parámetros eléctricos del circuito externo. En este sentido, el experimento se realizó con cuatro consumibles de 16 ml, cada uno preparado con 10 ml de medio aeróbico estándar y 3 ml de sangre. Dos de los consumibles también tenían 17 unidades formadoras de colonias de *E. coli* añadidas (una para el modo de baja frecuencia y otra para el modo de alta frecuencia). Los electrodos del consumible eran electrodos de oro de 30 mm. Durante el experimento, se aplicó una tensión pico a pico de 500 mV al consumible y el consumible se agitó mediante agitación a una velocidad de 120 rotaciones por minuto.

En el modo de baja frecuencia (por ejemplo, 1.10 kHz), no hubo ninguna desviación en la señal aplicada en el consumible con medios y sangre. En comparación, se detectó una desviación en la frecuencia del consumible con *E. coli* añadida en el modo de baja frecuencia aproximadamente a las 10 horas, como se representa en la figura 5 en el punto de desviación de la señal 510. Esto representa una mejora del 5-10 % en el tiempo de detección con respecto a las técnicas de detección óptica estándar. El TTD histórico de BACTEC para *E. coli* es de aproximadamente 11 horas.

En el modo de alta frecuencia (por ejemplo, 40-80 kHz), la resistencia de puente variable (por ejemplo, 405 en las figuras 4A y 4B) se sintonizó a 500  $\Omega$ . En consecuencia, se detectó una desviación de la señal aplicada en el consumible con *E. coli* alrededor de las cuatro (4) horas, como se representa en la figura 5 en el punto de desviación de la señal 520. Esto representa una mejora del 70 % en el tiempo de detección con respecto a las técnicas de detección óptica estándar. Al igual que en el experimento anterior con *E. coli*, la detección a estos niveles en este período de tiempo nunca se informó y fue completamente inesperada. Si bien el inventor no desea ceñirse a una teoría en particular, se cree que esta característica de detección temprana en el punto de desviación de la señal 520 es atribuible principalmente a la capacitancia celular o a la carga asociada con el potencial de membrana de las células microbianas. A medida que las células continúan replicándose y produciendo subproductos metabólicos, la concentración iónica del medio alcanza un punto de inflexión en el que se produce una segunda característica, como se representa en la figura 5 en el punto 525 de desviación de la señal. Ambas firmas representan un conjunto de características únicas con el potencial de una identificación preliminar del organismo en crecimiento. Por lo tanto, la solicitud actual describe la mejora de la sensibilidad de detección mediante el uso de detección de alta y baja frecuencia para reducir el tiempo de detección.

La figura 8 muestra el tiempo transcurrido hasta la detección de *A. lwoffii* en un modo de alta frecuencia midiendo la tasa de cambio en función del tiempo. La resistencia de puente variable (por ejemplo, 405 en las figuras 4A y 4B) se sintonizó a 200  $\Omega$ . La banda de frecuencia era de 50-60 kHz. Se prepararon dos consumibles de 1 ml (por ejemplo, un control y uno con muestra) con 0,9 ml de medio aeróbico estándar y 0 ml de sangre. Según este experimento, 28 unidades formadoras de colonias de *A. lwoffii* se añadieron a uno de los consumibles. Los consumibles tenían dos electrodos de 15 mm. Durante el experimento, se aplicó una tensión pico a pico de 250 mV al consumible y el consumible se agitó mediante agitación a una velocidad de 100 rotaciones por minuto. Cuando se aplicó una frecuencia alta, se detectó un cambio de velocidad de la frecuencia normal alrededor de 11 horas, como se representa en la figura 8 en el punto 810 de desviación de la señal. Esto representó una reducción del 50 % en los sistemas de detección óptica tradicionales. El TTD histórico de BACTEC para *A. lwoffii* es de aproximadamente 20 horas.

La figura 9 representa los resultados experimentales de la detección de *M. luteus* en un modo de alta frecuencia. La resistencia de puente variable (por ejemplo, 405 en las figuras 4A y 4B) se sintonizó a 200  $\Omega$ . La banda de frecuencia era de 6070 kHz. Se prepararon dos consumibles de 1 ml (por ejemplo, un control y uno con muestra) con 0,9 ml de medio aeróbico estándar y 0 ml de sangre. Uno de los consumibles tenía 21 unidades formadoras de colonias de *M. luteus* añadido a la misma. Los consumibles tenían dos electrodos de 15 mm. Durante el experimento, se aplicó una tensión pico a pico de 250 mV al consumible y el consumible se agitó mediante agitación a una velocidad de 100 rotaciones por minuto. Como se muestra en la figura 9, en el punto 910 de desviación de la señal, se detectó un cambio de velocidad de la frecuencia normal alrededor de 28-30 horas, lo que representa una reducción del 30 % con respecto a los sistemas de detección óptica tradicionales. El TTD histórico de BACTEC para *M. luteus* es de aproximadamente 42 horas.

Los tiempos de detección descritos anteriormente nunca se han informado y fueron completamente inesperados. Por lo tanto, la solicitud actual describe la mejora de la sensibilidad de detección mediante el uso de frecuencias altas y bajas para reducir los tiempos de detección del crecimiento microbiano.

Aunque la invención en el presente documento se ha descrito con referencia a realizaciones particulares, debe entenderse que estas realizaciones son meramente ilustrativas de los principios y las aplicaciones de la presente invención. Por lo tanto, debe entenderse que pueden realizarse numerosas modificaciones en las realizaciones ilustrativas y que pueden diseñarse otras disposiciones sin apartarse del alcance de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

1. Un método basado en impedancia para detectar crecimiento microbiano, comprendiendo el método:

proporcionar un recipiente (220) con al menos dos electrodos (211, 212) dispuestos en el mismo; introducir una muestra para monitorizar el crecimiento microbiano en el recipiente (220), en el que los al menos dos electrodos (211, 212) están sumergidos en la muestra; aplicar una señal eléctrica sinusoidal, cuya frecuencia varía, a un primer electrodo (411) de los al menos dos electrodos; medir repetidamente una amplitud de señal fuera de fase en un segundo electrodo (412) de los al menos dos electrodos

ajustar repetidamente la frecuencia de la señal eléctrica sinusoidal hasta que se alcance una frecuencia de cruce por cero de la amplitud de la señal desfasada; y determinar a partir de un aumento en la frecuencia de cruce por cero a lo largo del tiempo que se ha producido un crecimiento microbiano, **caracterizado por que** el método comprende:

cambiar entre un modo de funcionamiento de alta frecuencia y un modo de funcionamiento de baja frecuencia, en el que la frecuencia de la señal eléctrica sinusoidal está en un intervalo de aproximadamente 40 kHz a aproximadamente 80 kHz en el modo de funcionamiento de alta frecuencia, y en el que la frecuencia de la señal eléctrica sinusoidal está en un intervalo de aproximadamente 1 kHz a aproximadamente 10 kHz en el modo de funcionamiento de baja frecuencia.

2. El método basado en impedancia de la reivindicación 1, que comprende además ajustar la resistencia de una o más resistencias (405) en paralelo con una etapa de entrada capacitiva (235) de un detector amplificador de bloqueo para sintonizar la frecuencia de la señal eléctrica sinusoidal.

3. El método basado en impedancia de la reivindicación 2, en el que la frecuencia de la señal eléctrica sinusoidal se sintoniza con un circuito de ajuste puente entre resistencia-condensador.

4. El método basado en impedancia de la reivindicación 3, en el que el circuito de ajuste resistencia-condensador puente comprende un conmutador (425) en serie o en paralelo con una resistencia en puente (405), en el que el conmutador (425) se abre para cambiar al modo de funcionamiento de baja frecuencia, y en el que el conmutador (425) se cierra para cambiar al modo de funcionamiento de alta frecuencia.

5. Un sistema con sensibilidad a crecimiento microbiano, que comprende;

un circuito electrónico de procesamiento de señales (400) conectado a un recipiente (420) adaptado para recibir una muestra biológica; y dos o más electrodos (411, 412) que penetran en el recipiente (420) y están en contacto con la muestra biológica; en el que el circuito electrónico de procesamiento de señales (400) está configurado para:

aplicar una señal eléctrica sinusoidal, cuya frecuencia varía, a un primer electrodo (411) de los dos o más electrodos; medir repetidamente una amplitud de señal fuera de fase en un segundo electrodo (412) de los dos o más electrodos; y ajustar repetidamente la frecuencia de la señal eléctrica sinusoidal hasta que se alcance una frecuencia de cruce por cero de la amplitud de la señal desfasada, en el que un aumento en la frecuencia de cruce por cero a lo largo del tiempo indica que se ha producido un crecimiento microbiano, y

**caracterizado por que**

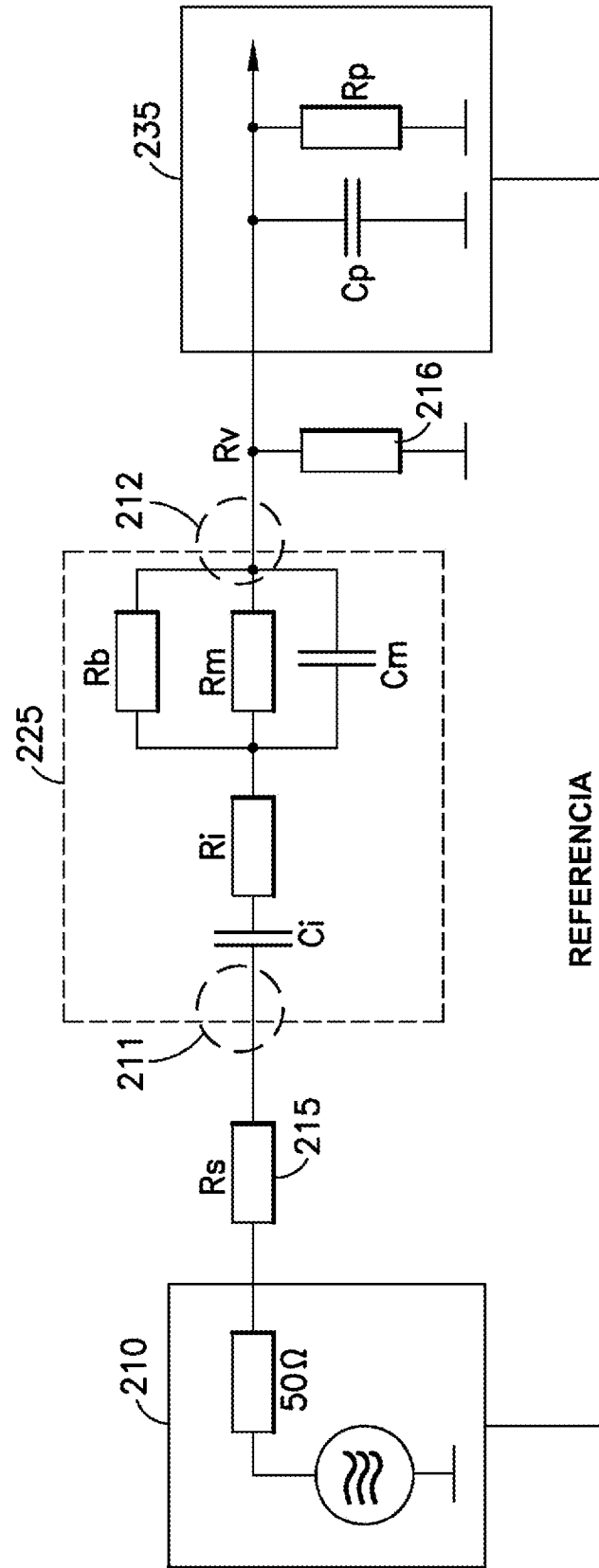
el circuito electrónico de procesamiento de señales (400) está configurado para cambiar entre un modo de funcionamiento de alta frecuencia y un modo de funcionamiento de baja frecuencia, en el que la frecuencia de la señal eléctrica sinusoidal está en un intervalo de aproximadamente 40 kHz a aproximadamente 80 kHz en el modo de funcionamiento de alta frecuencia, y en el que la frecuencia de la señal eléctrica sinusoidal está en un intervalo de aproximadamente 1 kHz a aproximadamente 10 kHz en el modo de funcionamiento de baja frecuencia.

6. El sistema de la reivindicación 5, que comprende además una o más resistencias variables (405) en paralelo con una etapa de entrada (435) de un amplificador de bloqueo.

7. El sistema de la reivindicación 5, que comprende además un circuito de ajuste puente entre resistencia-condensador.

- 5
8. El sistema de la reivindicación 7, en el que el circuito de ajuste resistencia-condensador puente comprende un conmutador (425) en serie o en paralelo con una resistencia puente (405), y en el que el sistema funciona en el modo de baja frecuencia cuando el conmutador (425) está abierto y en el modo de alta frecuencia cuando el conmutador (425) está cerrado.
- 10
9. El sistema de la reivindicación 8, en el que el circuito de ajuste resistencia-condensador puente está en paralelo con una etapa de entrada (435) de un amplificador de bloqueo.
10. El sistema de la reivindicación 8, en el que el circuito de ajuste de resistencia-condensador puente está en paralelo con un primer multiplexor (460).
11. El sistema de la reivindicación 10, en el que el primer multiplexor (460) está en paralelo con una etapa de entrada (435) de un amplificador de bloqueo, y en el que un segundo multiplexor (440) está en paralelo con una etapa de salida (410) del amplificador de bloqueo.

200 ↗



**Figura 1**

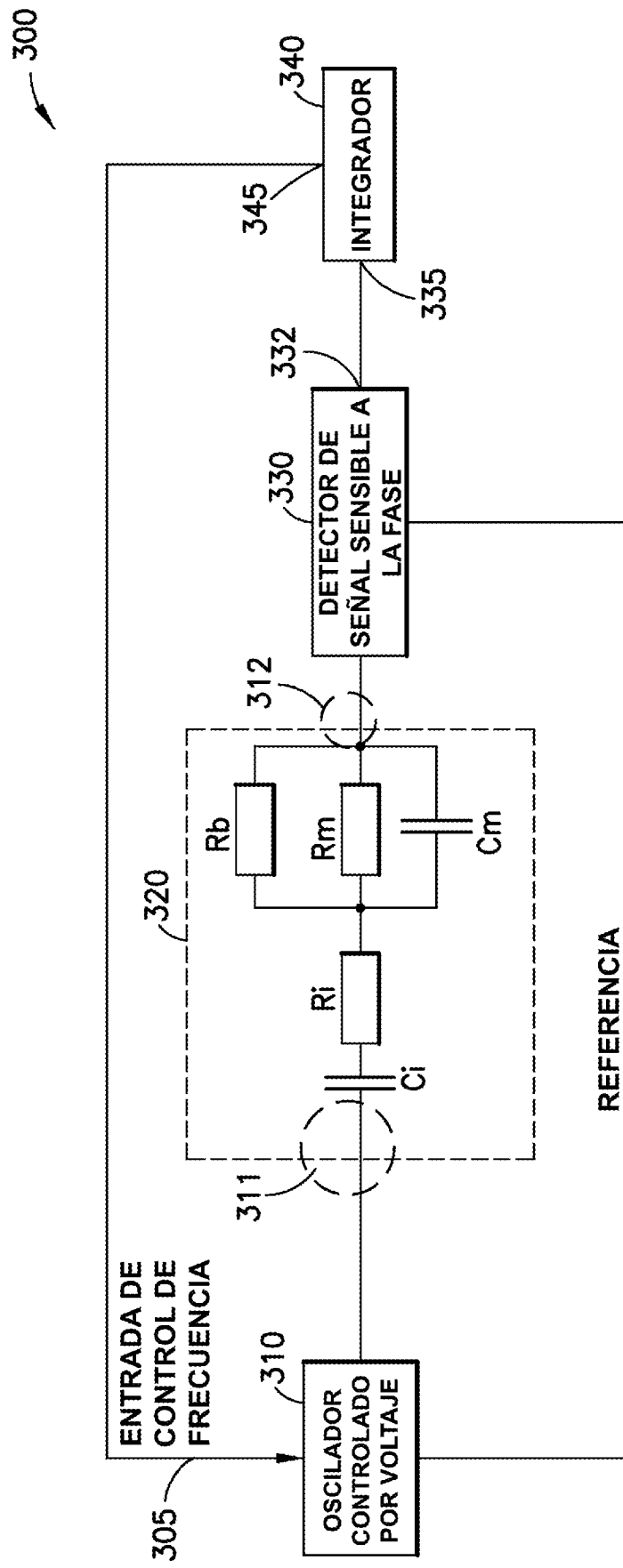


Figura 2

400

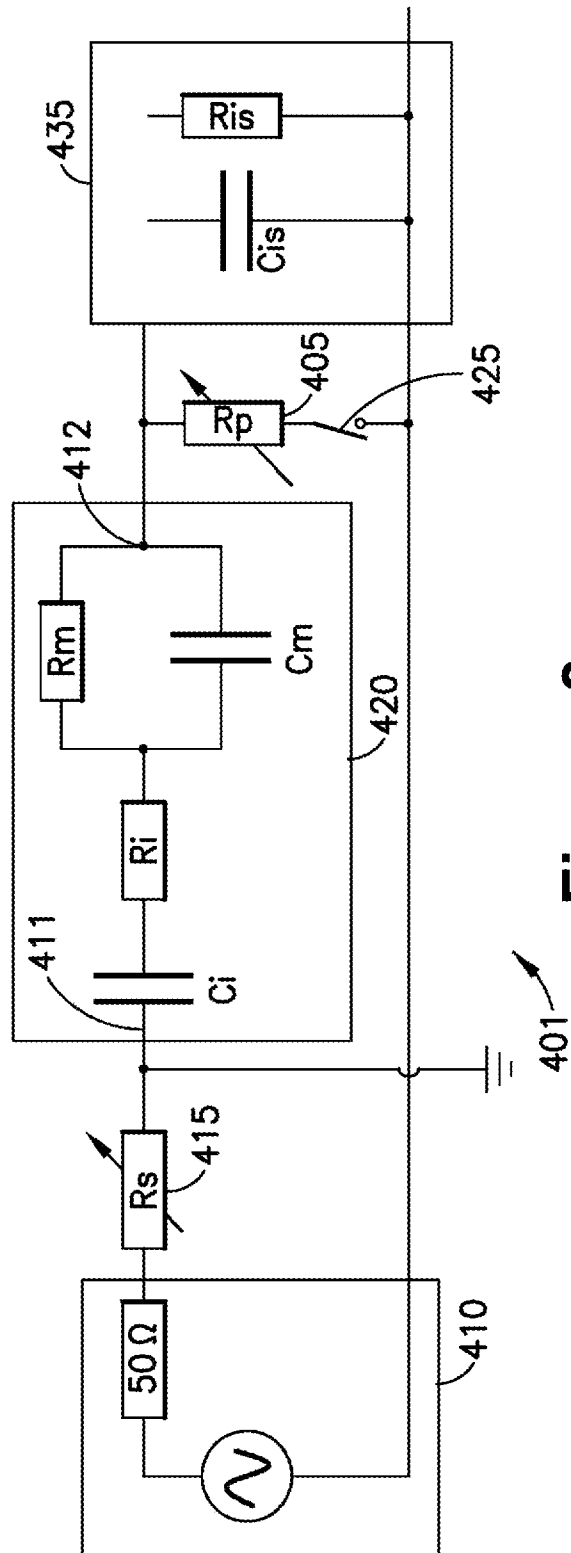
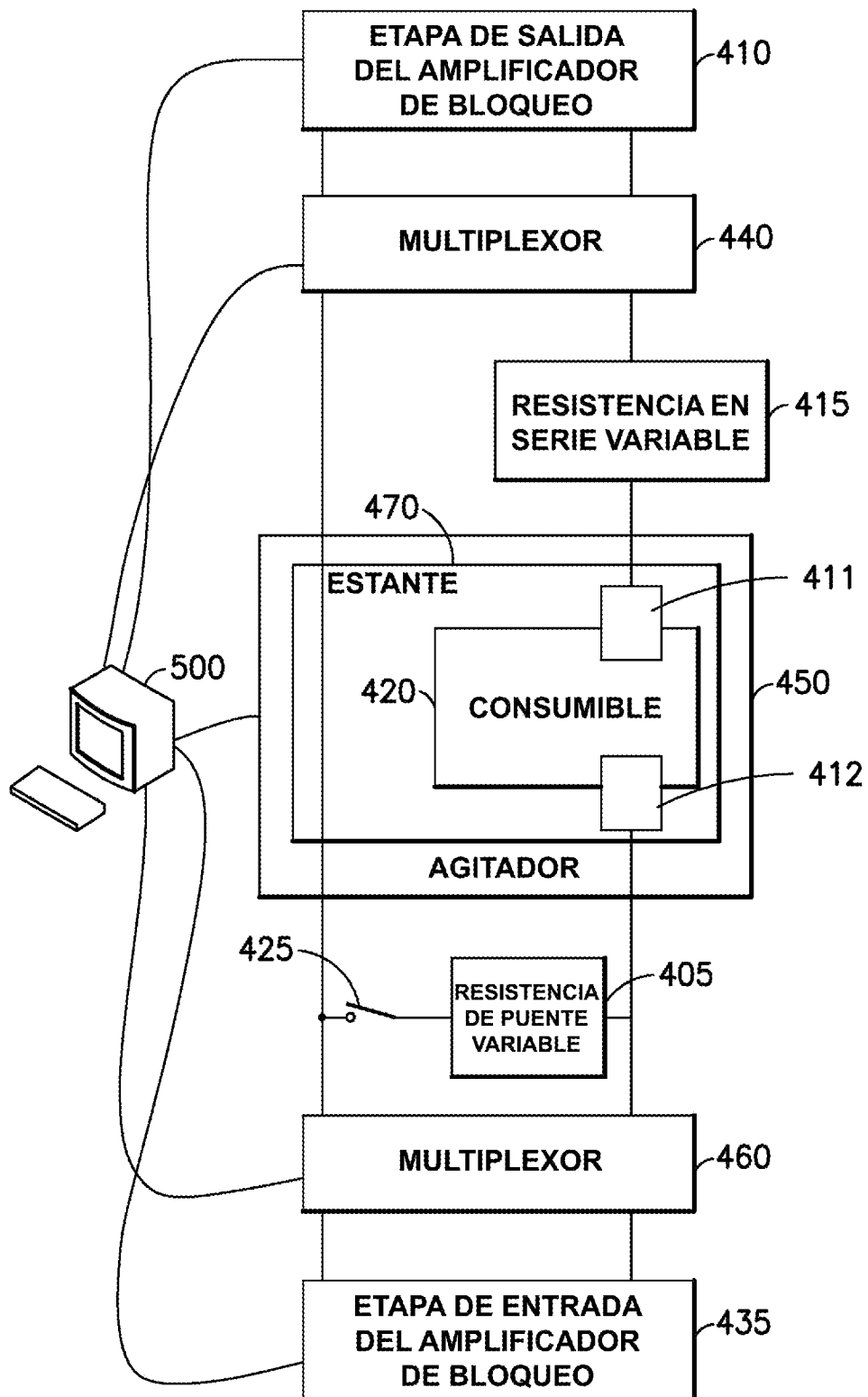
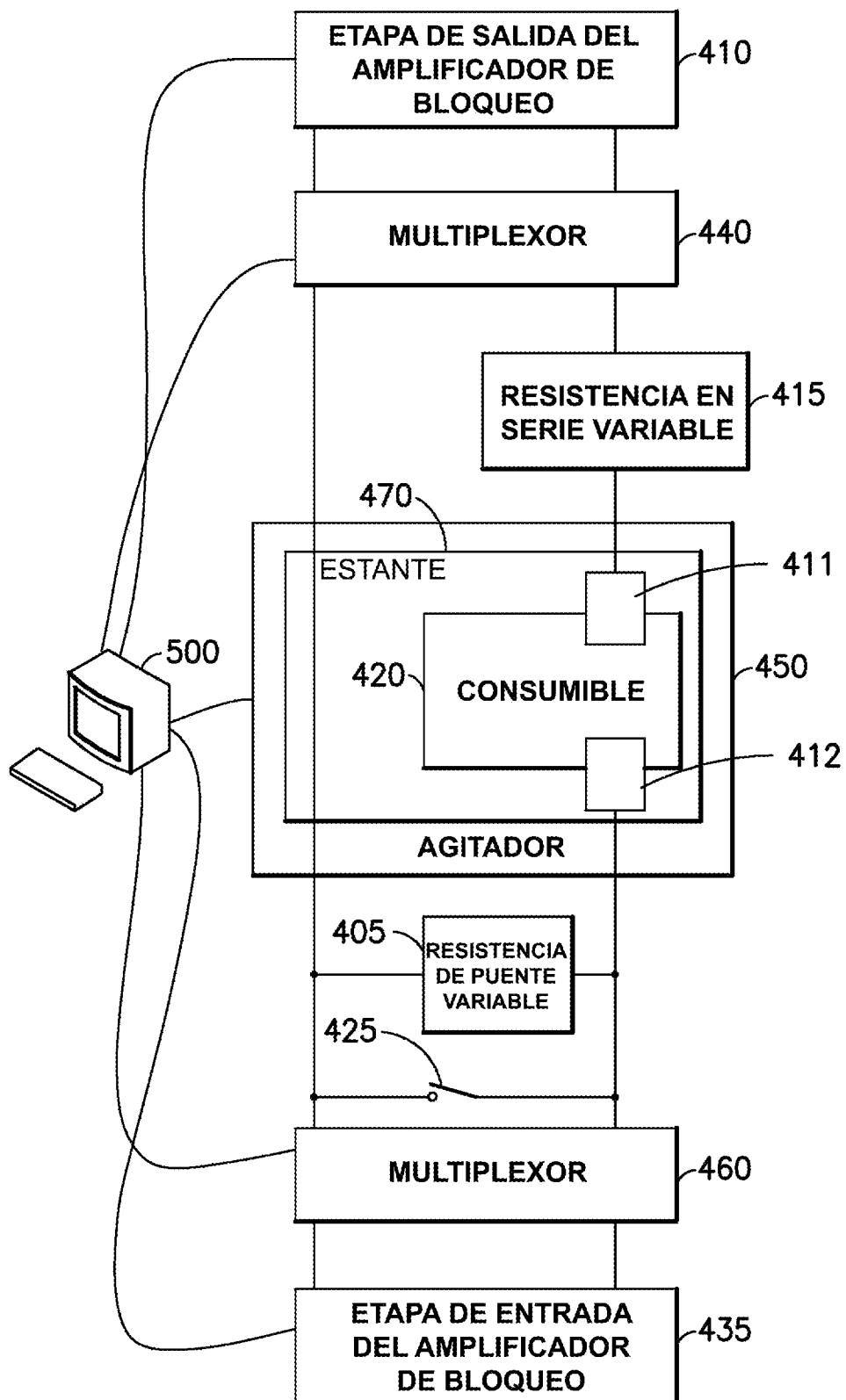


Figura 3

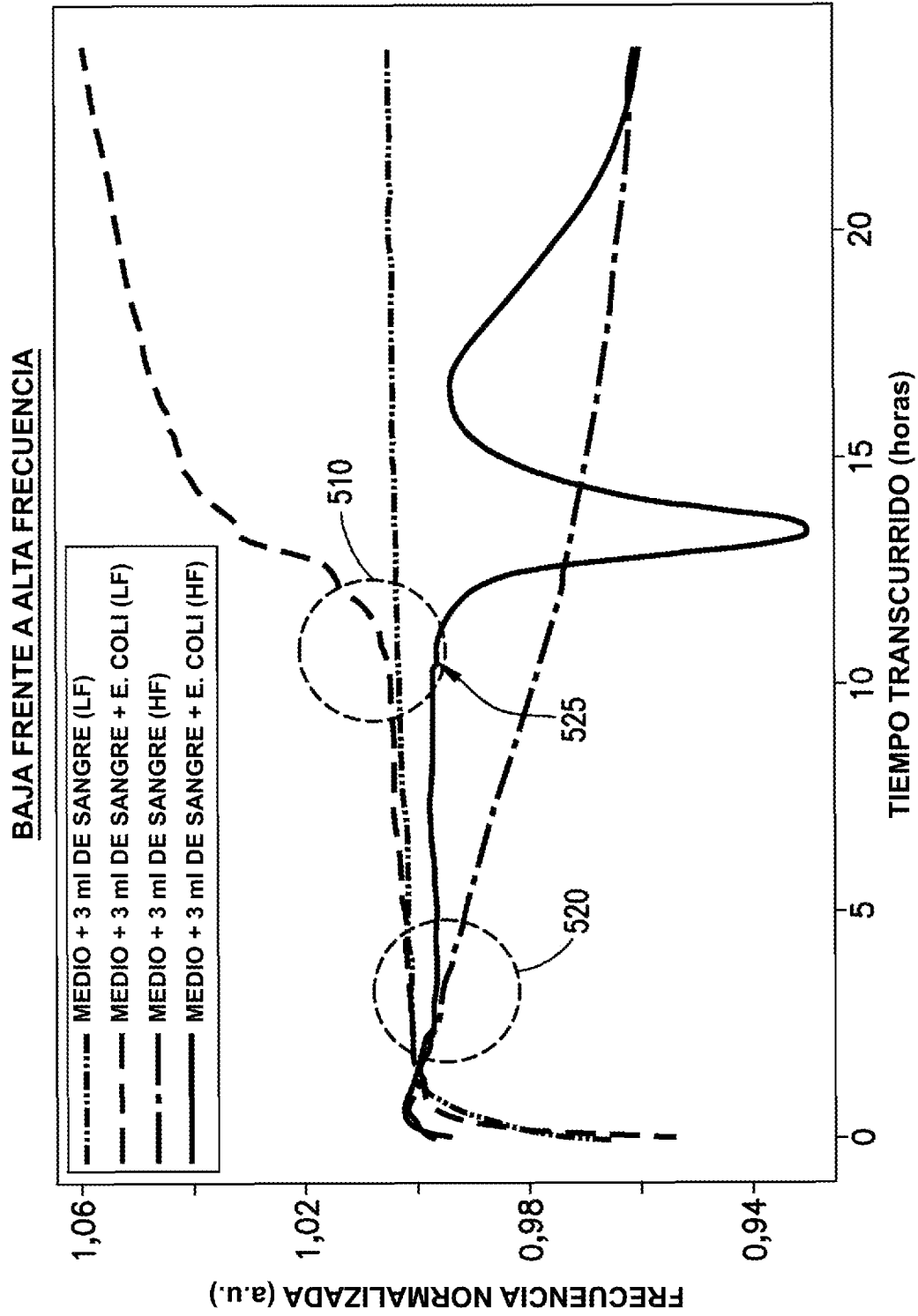


**Figura 4A**





**Figura 4B**



**Figura 5**

MEDIO (ml)	SANGRE (ml)	ORGANISMO	TTD EST. (horas)	TTD BACTEC HISTÓRICO (horas)	% MÁS RÁPIDO
AERÓBICO ESTÁNDAR (11)	EMBOLSADO (3)	A25922-E. COLI	9	10-11	14%
AERÓBICO ESTÁNDAR (11)	EMBOLSADO (3)	A25923-S. AUREUS	7-8	12-14	42%
ML1D MICOLÍTICO (7)	EMBOLSADO (7)	A25922-E. COLI	8,5-9	10-11	14%
ML1D MICOLÍTICO (7)	EMBOLSADO (7)	A25923-S. AUREUS	10	12-14	23%
ML1D MICOLÍTICO (7)	EMBOLSADO (7)	A19418-H. INFLUENZAE	16	17-21	16%
ML1D MICOLÍTICO (7)	EMBOLSAD O (7)	A29212-E. FAECALIS	11	11-12	8%
ML1D MICOLÍTICO (7)	EMBOLSAD O (7)	A66032-C. GLABRATA	17	20-42	45%

Figura 6

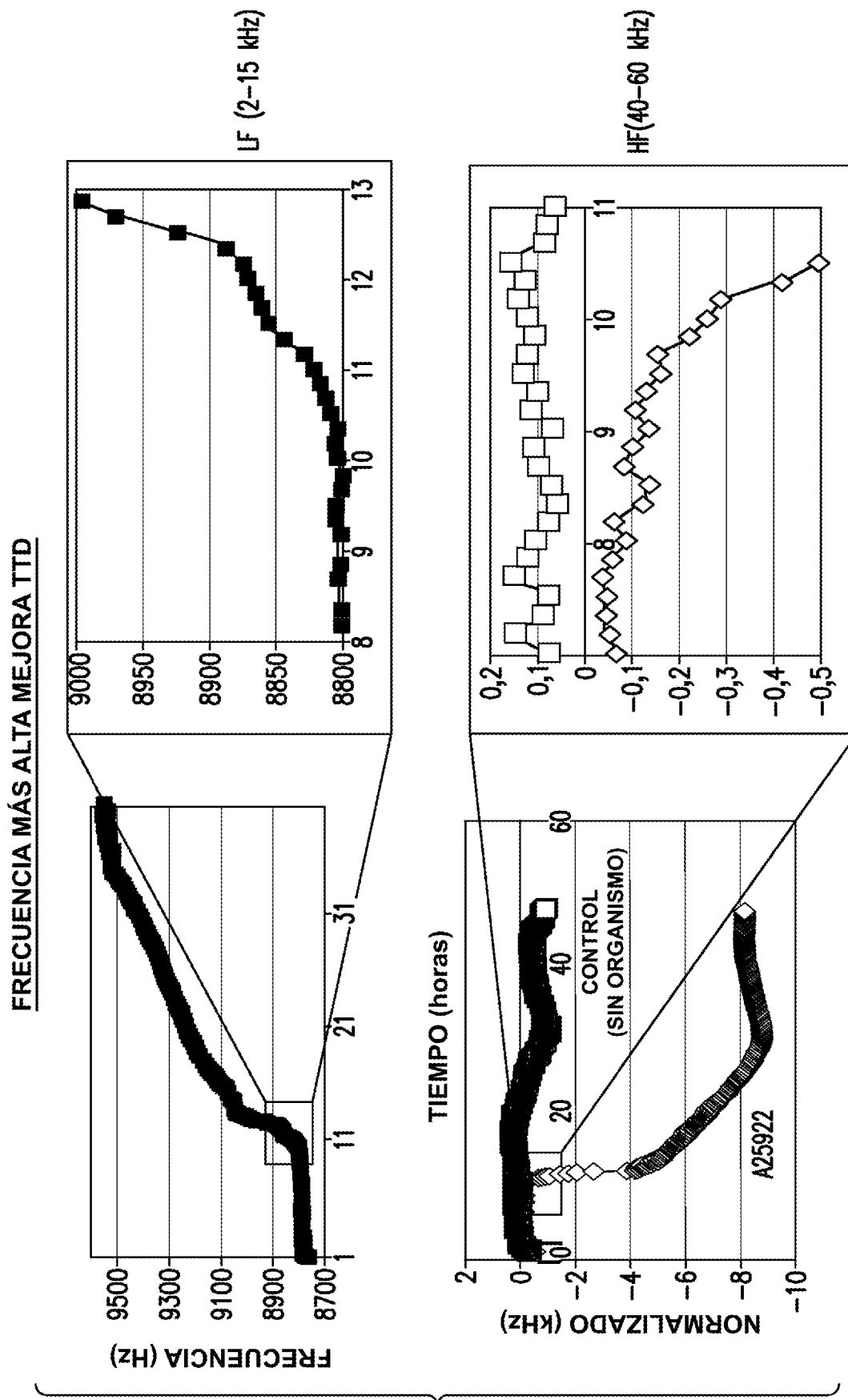
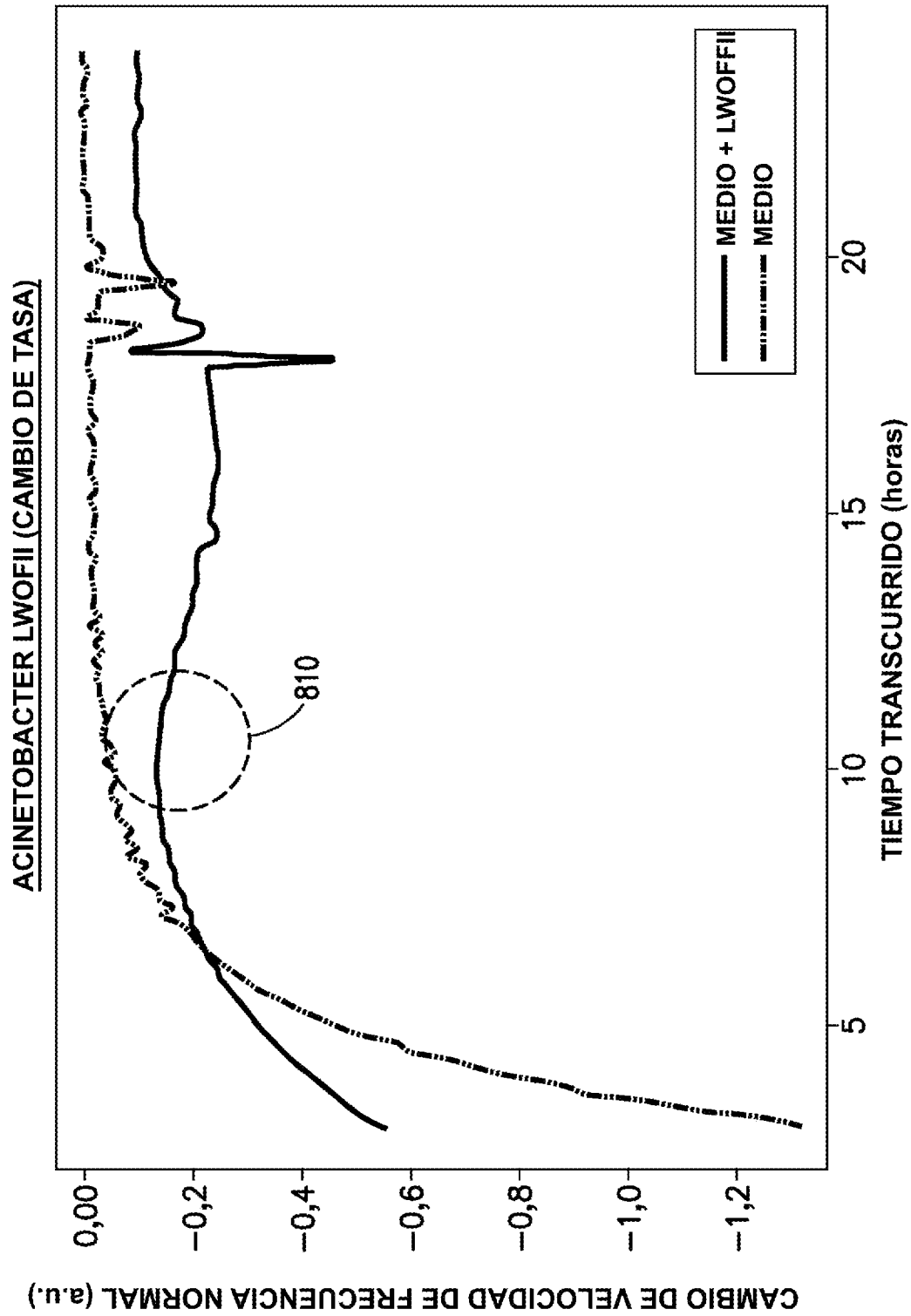
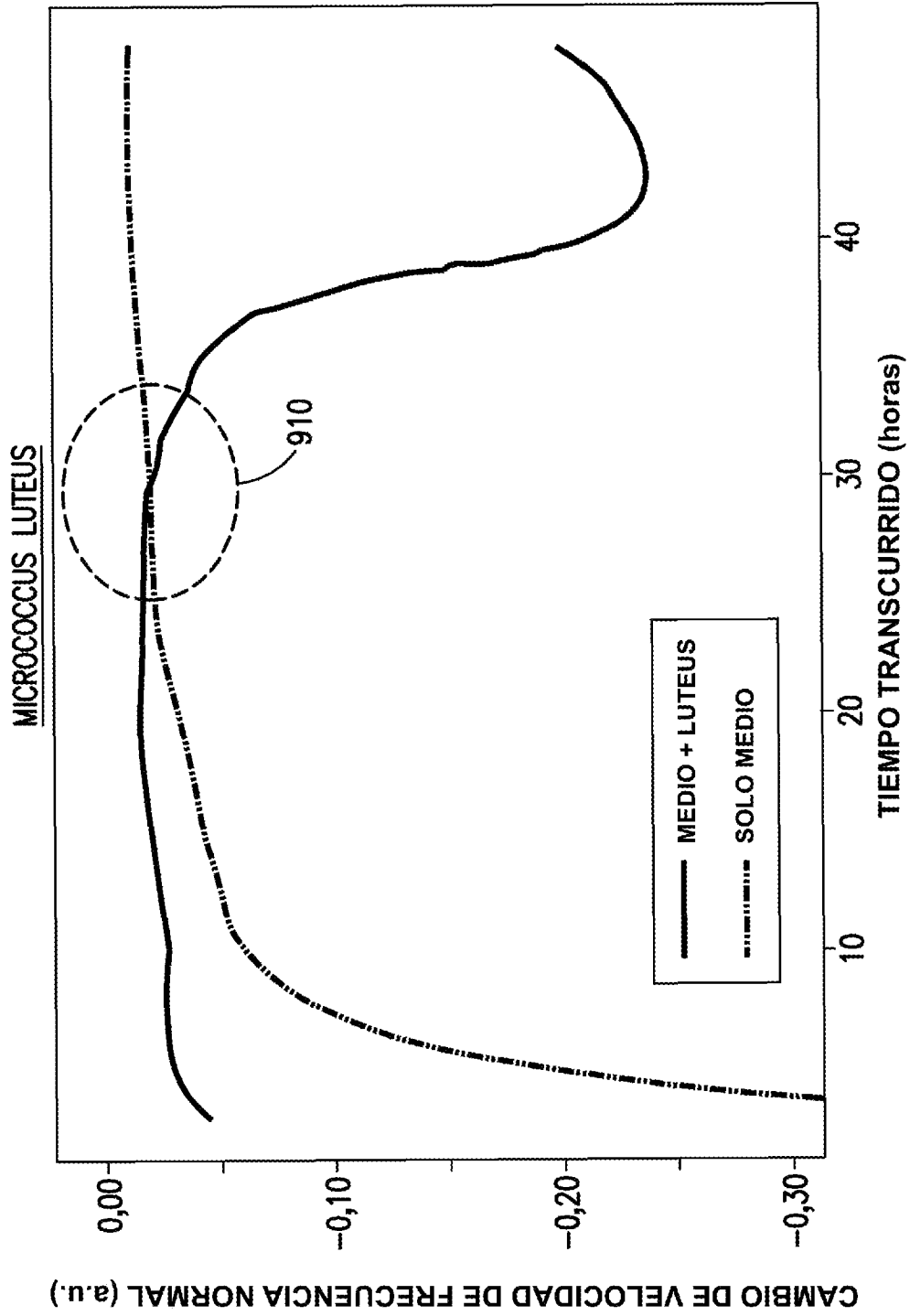


Figura 7



**Figura 8**



**Figura 9**