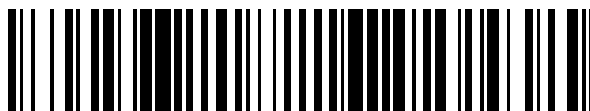


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 025**

51 Int. Cl.:

A61J 1/22

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013** **E 17182180 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020** **EP 3254762**

54 Título: **Métodos, sistemas y dispositivos para detectar e identificar microorganismos en muestras de cultivo microbiológicas**

30 Prioridad:

12.04.2012 US 201261623522 P

03.12.2012 US 201261732650 P

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

10.02.2021

73 Titular/es:

BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)

1 Becton Drive

Franklin Lakes, NJ 07417-1880, US

72 Inventor/es:

WEIDEMAIER, KRISTIN;

CAMPBELL, ROBERT L;

CARRUTHERS, ERIN GOOCH;

CURRY, ADAM C;

DOLAN, KEVIN G;

LIEBMANN-VINSON, ANDREA;

WOODLEY, WENDY DALE;

KURODA, MELODY M H;

LENTZ, AMMON DAVID;

LIVINGSTON, DWIGHT;

LIZZI, MICHAEL JUSTIN;

LOCKHART, ARTIS R;

RITCHEY, ERNIE;

FALLOWS, ERIC A;

GORELICK, DONALD E;

KESSLER, JACK;

LOVETTE, SPENCER;

OJALA, JEFFREY S;

TALMER, MARK A;

BARTKOWIAK, MIROSLAW;

DANHOF, SCOTT N;

KRAMER, GREGORY S;

HAUBERT, THOMAS D;

MARSHALL, MICHAEL L;

PRESCOTT, JAMES A;

SOMERVILLE, RANDY J;

ULRICH, M SCOTT y

SEBBA, DAVID S

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 805 025 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos, sistemas y dispositivos para detectar e identificar microorganismos en muestras de cultivo microbiológicas

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La materia objeto desvelada en el presente documento, se refiere a métodos, a sistemas y a dispositivos para detectar, identificar y cuantificar microorganismos en una muestra de cultivo.

Antecedentes de la invención

15 La capacidad de detectar niveles bajos de microorganismos, incluyendo patógenos, en un cultivo microbiológico en muestras clínicas (por ejemplo, sangre, heces, orina, etc.) ha obtenido importancia significativa en años recientes. De forma similar, el cultivo microbiológico es importante para la salud pública para detectar microorganismos, incluyendo patógenos, en muestras industriales tales como alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos. La capacidad de detectar dichos microorganismos no solamente proporciona técnicas para tratar a los que ya se han expuesto, sino también casos en los que pueda evitarse la exposición, tal como cuando se ensayan muestras alimentarias.

20 Las enfermedades transmitidas por los alimentos influyen significativamente en la sociedad, no solamente con respecto a la salud, sino también con respecto a los costes de los cuidados sanitarios. El CDC ha estimado que cada año aproximadamente 1 de cada 6 americanos (o 48 millones de personas) enferman, 128.000 son hospitalizados y 3.000 mueren de enfermedades transmitidas por los alimentos (véase <http://www.cdc.gov/foodsafety/facts.html>). También se ha estimado que las enfermedades transmitidas por los alimentos contribuyen a 152 mil millones de \$ en gastos relacionados con la salud cada año en los Estados Unidos, particularmente para infecciones bacterianas provocadas por *Campylobacter* spp., *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* y *E. coli* (véase <http://www.producesafetyproject.org/admin/assets/files/Health-Related-Foodborne-Illness-Costs-Report.pdf-1.pdf>).

30 El nivel actual de seguridad alimentaria encontrado en los Estados Unidos es el resultado de regulaciones gubernamentales combinadas con autocontrol de la industria influida por incentivos de mercado, tales como responsabilidad legal, valor de marca, reputación y el deseo de vender más productos alimentarios. En los Estados Unidos, las agencias primarias responsables de la seguridad alimentaria son los Servicios de Seguridad e Inspección Alimentaria (FSIS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), que es responsable de la seguridad de la carne, las aves de corral y los productos de huevos procesados, y la administración de fármacos y alimentos (FDA), que es responsable de prácticamente todos los otros alimentos. En 1996, el FSIS del USDA promulgó la norma de punto de control crítico de análisis de riesgo de reducción de patógenos (PR/HACCP), que, por ejemplo, requiere ensayos de *E. coli* genéricos por los mataderos. Otras regulaciones del FSIS imponen límites cero para dos patógenos letales: *Listeria monocytogenes* en carne lista para consumir y aves y *E. coli* 0157:H7 en ternera picada (véase <http://www.ers.usda.gov/briefing/foodsafety/private.htm>). Recientemente, la Ley de Modernización de la Seguridad Alimentaria fue aprobada por el Congreso, subrayándose la urgencia de esta legislación por brotes continuados de enfermedades transmitidas por los alimentos durante los últimos años desde espinacas a pimientos y cacahuetes.

45 Los ensayos alimentarios pueden realizarse en las muestras alimentarias en sí mismas, bien materiales de productos finales, intermedios o materias primas entrantes. Además, se implementan planes de HACCP (Análisis de Riesgos y Punto de Control Crítico) se implementan para controlar el ambiente de producción para así minimizar el riesgo de introducción de patógenos en la muestra alimentaria. Como parte de muchos planes de HACCP, se obtienen muestras ambientales de superficies, suelos, desagües y equipamiento de procesamiento y después se analizan con respecto a la presencia y ausencia de organismos patógenos. Si se detecta un patógeno, este puede aislarse y someterse a ensayos confirmatorios adicionales.

En la actualidad, todos los ensayos de patógenos alimentarios realizados implican una etapa de cultivo para enriquecer los niveles potencialmente bajos de microorganismos contenidos en una muestra. Después del cultivo de la muestra, se retira una parte y se ensaya con respecto a la presencia de patógenos. Pueden realizarse ensayos de patógenos después del cultivo por inmunoensayos (por ejemplo, plataforma de ELISA automática Vidas® de bioMérieux o ensayos de flujo lateral RapidChek® de SDIX) o mediante ensayos basados en PCR (por ejemplo, sistema BAX® de DuPont Qualicon, sistema iQ-Chek™ de Bio-Rad). Si está presente un patógeno en la muestra de partida, la etapa de cultivo puede aumentar la concentración del patógeno hasta $1,0 \times 10^8$ – $1,0 \times 10^9$ ufc/ml, de modo que abrir la muestra después del cultivo expone tanto al usuario como al ambiente a un riesgo de contaminación. Esta exposición inhibe la realización de ensayos de patógenos en planta por parte de los productores alimentarios, que eligen en su lugar enviar muestras a laboratorios externos para su ensayo. Además, ya que se desconoce qué muestras contienen patógenos y a qué niveles, los protocolos de ensayo de seguridad alimentaria usan tiempos de cultivo largos para asegurar que se da suficiente tiempo para que crezca hasta una concentración detectable el peor caso posible de un patógeno dañado. Como consecuencia, las muestras con mayores cargas patógenas se cultivan más tiempo de lo que puede ser estrictamente necesario, lo que conduce a un retardo en el tiempo hasta los resultados. Existe por lo tanto la

necesidad en el campo de métodos de ensayo de patógenos que minimicen el tiempo hasta obtener resultados y reduzcan el riesgo de exposición de la instalación y el personal a patógenos cultivados.

Están presentes preocupaciones similares con respecto a muestras clínicas tales como sangre. Desde mediados de los 80, junto con la expansión del tamaño de la población de pacientes inmunocomprometidos, la incidencia de septicemia provocada por patógenos oportunistas, tales como levadura, hongos y micobacterias, ha aumentado. La bacteriemia, la presencia de bacterias en el torrente sanguíneo, y la fungemia, la presencia de hongos o levaduras en el torrente sanguíneo, se detectan típicamente recogiendo una muestra de sangre venosa y poniendo la muestra de sangre en un frasco de cultivo sanguíneo que contiene un medio de cultivo adecuado para promover el crecimiento de las bacterias u hongos de interés. Véase en general, Reimer *et al.*, "Update on Detection of Bacteremia and Fungemia," *Clinical Microbiology Reviews* 10(3), 444-465 (1997). La muestra de cultivo sanguíneo puede después incubarse durante un periodo de tiempo y comprobarse intermitentemente con respecto a un indicio de crecimiento bacteriano o fúngico.

Los métodos instrumentales conocidos en la técnica para supervisar el crecimiento bacteriano o fúngico en frascos de cultivo sanguíneo típicamente detectan cambios en la concentración de dióxido de carbono y/u oxígeno en el frasco de cultivo sanguíneo. Estos instrumentos detectan la presencia y ausencia de microorganismos pero no son específicos con respecto al tipo particular de organismo presente. Para una muestra nominalmente estéril tal como sangre, la detección de un microorganismo en la muestra puede ser indicativa de enfermedad grave. Sin embargo, el resultado positivo se considera un resultado parcial o preliminar y típicamente no es procesable. Como el tratamiento óptimo de la enfermedad se basa en la identificación del organismo y la determinación de su susceptibilidad a antibióticos, el personal de laboratorio debe estar disponible para continuar cultivos positivos hasta su identificación completa (ID) y ensayos de susceptibilidad antimicrobiana (ESA). La identificación del organismo requiere acceso de la muestra de cultivo sanguíneo positiva por parte del personal de laboratorio para tratamiento adicional de la muestra.

El tratamiento de la muestra después de un resultado de cultivo sanguíneo positivo, es decir, un resultado que indica la presencia pero no la identidad de un microorganismo, incluye con frecuencia la clasificación del microorganismo en una de dos clases amplias de organismos: Gram positivos o Gram negativos. Los ensayos de cultivos sanguíneos basados en la detección de CO₂ u O₂ durante el proceso de cultivo no puede distinguir entre organismos patógenos, tales como *S. aureus* y contaminantes, tales como *S. epidermidis* ya que estos métodos son sensibles solamente al crecimiento y ausencia de crecimiento. La clasificación e identificación de organismos se realiza después de la detección del crecimiento en una muestra de cultivo sanguíneo. Por ejemplo, están disponibles kits para diferenciar entre especies de *Staphylococcus* y *Streptococcus* y otros organismos. También están disponibles kits para diferenciar entre organismos, tales como *S. aureus* y *S. epidermidis*. Estos kits, sin embargo, requieren retirar al menos una alícuota de una muestra de cultivo sanguíneo del frasco de cultivo sanguíneo y otros procedimientos que pueden exponer potencialmente al operador al patógeno o destruir una parte del cultivo sanguíneo que podría usarse para otros análisis. También requieren típicamente que el personal de laboratorio entrenado esté disponible para realizar los ensayos, lo que conduce potencialmente a un retardo en los resultados clínicos procesables en el caso de que una muestra de cultivo sanguíneo resulta positivo cuando no esté disponible personal de laboratorio para realizar ensayos adicionales (por ejemplo, en hospitales que funcionan en un único turno).

Aunque existen en la actualidad instrumentos para detectar la presencia o ausencia de microorganismos en sangre (por ejemplo, mediante el uso de un sensor de dióxido de carbono u oxígeno), estos instrumentos no son típicamente útiles en muestras no estériles tales como heces o muestras alimentarias. Para muestras tales como, por ejemplo, alimentos, se espera que haya una concentración significativa de microorganismos benignos, y por lo tanto la detección de organismos por sensores de dióxido de carbono u oxígeno no es inherentemente útil. Para una muestra alimentaria, es crítico detectar la presencia de niveles bajos de organismos patógenos en un fondo de microflora benigna alta para evitar la propagación de enfermedades transmitidas por alimentos.

Por lo tanto, existe la necesidad de métodos, sistemas y dispositivos para detectar no solamente la presencia o ausencia de organismos durante la etapa de cultivo de muestras nominalmente estériles, sino también la identificación de los organismos. Para muestras no estériles, tales como heces y alimentos, existe también la necesidad de métodos, sistemas y dispositivos para identificar organismos potencialmente perjudiciales en un cultivo de una manera biocontenida. Dichos métodos, sistemas y dispositivos minimizan la intervención del usuario, minimizando de este modo el tiempo, el personal cualificado, más exposición potencial del personal y el ambiente al patógeno.

El documento US 2003/053938 A1 desvela un ensamblaje de recipiente que proporciona la recogida, el transporte y la dispensación de un espécimen de fluido. El ensamblaje de recipiente incluye un recipiente con forma de copa que tiene un extremo abierto para recoger el espécimen de fluido. Una tapa es fijable al recipiente para cerrar el extremo abierto del mismo. La tapa incluye un receptáculo para proporcionar comunicación con el espécimen de fluido recogido a través de la cubierta y para permitir la extracción de una muestra del mismo. Un miembro de cierre auto-sellante está soportado por la tapa en el receptáculo y sella el receptáculo evitando la fuga de fluido. El dispositivo de extracción puede usarse para extraer una muestra del espécimen de fluido. El dispositivo de extracción es insertable en el receptáculo para permitir tal extracción. Tras la retirada del dispositivo de extracción, el cierre auto-sellante resella el recipiente y evita la fuga de fluido dentro del receptáculo.

Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones. Por lo tanto, el vaso puede ser adecuado para medir una cantidad deseada de muestra para dos ensayos diferentes (por ejemplo, *Salmonella* o *Listeria*) en un único recipiente, facilitando al mismo tiempo la transferencia de la muestra a un vial de detección de una manera biocontenida.

Breve descripción de los dibujos

Habiendo descrito de este modo la materia objeto desvelada en el presente documento en términos generales, se hará ahora referencia a los dibujos adjuntos, que no están dibujados necesariamente a escala, y en los que:

La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra un método para detectar e identificar un microorganismo en una muestra de cultivo.

La Figura 2 es un diagrama esquemático que muestra un vaso de enriquecimiento y un vial de detección para contener y transferir una muestra de cultivo de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 3 es un diagrama esquemático que muestra un método de detección intermitente e identificación de un microorganismo en una muestra de cultivo.

La Figura 4 es un diagrama esquemático que muestra un método de detección en tiempo real e identificación de un microorganismo en una muestra de cultivo.

Las Figuras 5A-5E ilustran diversas vistas de un vaso de enriquecimiento de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 6 es una vista en sección transversal de un vaso de enriquecimiento de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 7 es una vista despiezada de un vaso de enriquecimiento de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 8 es una vista inferior de la tapa para un vaso de enriquecimiento de acuerdo con una realización de la presente invención.

Las Figuras 9A-9C son diversas vistas de una cesta para un vaso de enriquecimiento de acuerdo con una realización de la presente invención.

Las Figuras 10A y 10B ilustran un tapón para un vial de detección de acuerdo con una realización de la presente invención.

Las Figuras 11A y 11B ilustran un tapón para un vial de detección de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 12 es una vista en sección transversal de un tapón que conecta con un vial de detección de acuerdo con una realización de la presente invención.

Las Figuras 13A y 13B son una vista en perspectiva y una vista despiezada de un tapón que conecta con un vial de detección de acuerdo con una realización de la presente invención.

Las Figuras 14A y 14B son una vista en perspectiva y una vista despiezada de un tapón que conecta con un vial de detección de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 15 es una vista en sección transversal de viales de detección que conectan con un vaso de enriquecimiento de acuerdo con una realización de la presente invención.

Las Figuras 16 y 17 son vistas en sección transversal de un vial de detección que conecta con un vaso de enriquecimiento de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 18 es un diagrama esquemático que muestra un complejo de partícula de captura magnética-microorganismo-partícula indicadora SERS-activa dentro de un frasco de cultivo.

La Figura 19 representa una partícula indicadora SERS activa.

La Figura 20 representa una partícula indicadora SERS activa.

La Figura 21 representa una partícula indicadora SERS activa.

La Figura 22 muestra un espectro de SERS representativo de una partícula indicadora SERS activa que tiene asociada con la misma un colorante Raman activo de 4,4'-dipiridilo (DIPY).

La Figura 23 muestra una señal de SERS representativa representada a lo largo del tiempo de cultivo para *Salmonella*.

La Figura 24 representa un sistema para supervisión en tiempo real del crecimiento del microorganismo.

La Figura 25 representa un sistema para supervisión en tiempo real del crecimiento de microorganismos.

Las Figuras 26-29 ilustran diversas vistas de un sistema para supervisión en tiempo real de crecimiento del microorganismo.

La Figura 30 es una vista en perspectiva de una bandeja para contener tubos de muestras.

La Figura 31 ilustra etapas secuenciales para cargar tubos de muestras en una bandeja, cargar la bandeja en un incubador y retirar las bandejas del incubador.

La Figura 32 es una vista en perspectiva de una bandeja para contener tubos de muestras.

Las Figuras 33A-33C son vistas parciales de bandejas para contener tubos de muestras.

La Figura 34 es una vista en perspectiva de un incubador.

Las Figuras 35-39 son diversas vistas en sección transversal del sistema mostrado en las Figuras 26-29.

La Figura 40 es una vista ampliada de una puerta trasera de un incubador.

La Figura 41 es una vista en perspectiva de una plataforma X.

La Figura 42 es una vista en perspectiva de un conjunto de imán, una plataforma X y una plataforma Z.

La Figura 43 es una vista lateral de un conjunto de imán, un conjunto de sedimentación/lectura, una plataforma X, una plataforma Y y una plataforma Z en una posición baja.

La Figura 44 es otra vista en perspectiva del sistema mostrado en las Figuras 26-29.

Las Figuras 45 y 46 son vistas en perspectiva parciales de un conjunto de imán, un conjunto de sedimentación/lectura y una plataforma X.

La Figura 47 es una vista en perspectiva parcial de un conjunto de imán y una plataforma Y.

Las Figuras 48A-48B son vistas en perspectiva de un sistema para supervisión en tiempo real de crecimiento de microorganismos encerrados en un armario.

La Figura 49 ilustra un método para agitar y sedimentar una muestra de cultivo.

La Figura 50 representa un sistema de sedimentación y óptico.

Las Figuras 51 y 52 ilustran disposiciones de imanes alternativas para sedimentar una muestra de cultivo.

La Figura 53 representa una detección múltiple de *S. aureus* y *S. epidermidis*.

La Figura 54 muestra los resultados de un experimento en el que se comparó el tiempo hasta la detección de crecimiento de *E. coli* para muestras de cultivo sanguíneo con y sin los reactivos de SERS HNW.

La Figura 55 muestra una gráfica en la que el crecimiento de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar Typhimurium, denominada en el presente documento como *Salmonella* Typhimurium (u otro nombre de serovar de *Salmonella*), se supervisó en relación con el efecto de sedimentación en el mismo.

La Figura 56 muestra una gráfica que ilustra el efecto de sedimentación en el crecimiento de microorganismos.

La Figura 57 ilustra una imagen de un precomplejo (PC) de perlas magnéticas-SERS en agua después de sedimentación con un imán fijo.

Las Figuras 58A-58B son imágenes de formación de sedimentos de PC en medio secundario de *Salmonella* SDIX usando un imán fijo y diferentes frecuencias.

5 Las Figuras 59A-59B son imágenes de formación de sedimentos de PC en medio secundario de *Salmonella* SDIX usando un imán acoplado y diferentes frecuencias.

La Figura 60 muestra una gráfica en la que se comparó el tiempo hasta la detección de *C. albicans* en sangre usando una detección sencilla de SERS.

10 La Figura 61 muestra una gráfica en la que se comparó el tiempo hasta la detección de *C. albicans* en sangre usando un método de SERS múltiple.

15 La Figura 62 muestra una gráfica en la que se comparó el tiempo hasta la detección de *E. coli* y *S. epidermidis* en sangre usando un método de SERS múltiple.

La Figura 63 ilustra una gráfica de detección en tiempo real de *E. coli* en sangre con medio aeróbico y resinas que absorben antibióticos.

20 La Figura 64 muestra una gráfica de la detección de *E. coli* en sangre para volúmenes de muestras diferentes.

La Figura 65A muestra una curva de SERS con imágenes capturadas a diversos tiempos durante el enriquecimiento secundario de *Salmonella* Typhimurium.

25 La Figura 65B muestra una curva de SERS con imágenes capturadas a diversos tiempos durante el enriquecimiento secundario para una muestra negativa.

La Figura 65C muestra una curva de SERS con imágenes capturadas a diversos tiempos durante el enriquecimiento secundario de *Salmonella* Typhimurium.

30 La Figura 66 muestra curvas de SERS solapantes para diferentes velocidades de agitación durante el enriquecimiento secundario de *Salmonella* Typhimurium.

35 La Figura 67 muestra imágenes de sedimentos para una muestra positiva y una muestra negativa, respectivamente.

Las Figuras 68A-68C ilustran curvas de SERS para la detección en tiempo real de *E. coli* durante el cultivo en muestras alimentarias.

40 La Figura 69 ilustra curvas de SERS para la detección en tiempo real de *Salmonella* Enteritidis durante el cultivo en muestras alimentarias.

La Figura 70 ilustra curvas de SERS para la detección en tiempo real de *Listeria* obtenida por hisopado de acero inoxidable.

45 La Figura 71 muestra un diagrama de flujo de fases para la detección de *Salmonella* Typhimurium usando agitación lineal.

50 La Figura 72 ilustra curvas de SERS solapantes durante el enriquecimiento secundario para *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis y muestras negativas.

La Figura 73 muestra imágenes de sedimentos formados durante el enriquecimiento secundario de *Salmonella* Typhimurium.

55 La Figura 74 muestra curvas de SERS obtenidas de agitación de balanceo y agitación lineal durante el enriquecimiento secundario de *S. Enteritidis* y *S. Kentucky*.

La Figura 75 muestra imágenes de tubos de muestras que contienen *S. aureus* y *S. epidermidis* en plasma de conejo EDTA, con y sin reactivos de SERS.

60 La Figura 76 muestra imágenes de ensayos de aglutinación de látex con *S. aureus* y *S. epidermidis*, con y sin reactivos de SERS.

65 La Figura 77 es una imagen ampliada de tinción de gram de una mezcla de partículas magnéticas y marcadores de SERS.

La Figura 78 es una imagen ampliada de controles con tinción de gram de *S. aureus* y *E. coli* con partículas magnéticas y marcadores de SERS.

5 La Figura 79 muestra imágenes de placas de *S. aureus* CHROMagar sembradas en estrías con un cultivo sanguíneo de *S. aureus* y *S. epidermidis* con reactivos de SERS.

La Figura 80 es una imagen de una placa de agar sembrada en estrías con un cultivo sanguíneo de *E. coli* con discos de ensayo Sensi-disc™.

10 La Figura 81 es una tabla que muestra mediciones de diámetro de zona para *E. coli*, con y sin reactivos.

La Figura 82 es una tabla que muestra un resumen de los resultados de ensayo de susceptibilidad a antibióticos manual usando BD Sensi-discs™ y diversos microorganismos con y sin reactivos de SERS.

15 La Figura 83 muestra imágenes de placas de agar sembradas en estrías con un cultivo sanguíneo de *E. coli* y *C. albicans*, con y sin reactivos, con discos antifúngicos BD Taxo™ superpuestos.

La Figura 84 es una tabla que muestra imágenes de sedimentos formados en medios secundarios de *Salmonella* usando diferentes frecuencias de agitación y tiempos de sedimentación.

20 La Figura 85 es una tabla que muestra el efecto de la frecuencia de agitación en dispersión de sedimentos.

La Figura 86 ilustra un vaso de enriquecimiento de acuerdo con otra realización de la presente invención.

25 La Figura 87 es una vista en sección transversal de una jeringa de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 88 es una vista en sección transversal de una jeringa conectada con un vaso de enriquecimiento de acuerdo con una realización de la presente invención.

30 Las Figuras 89A-89C son vistas en sección transversal ampliadas de una jeringa conectada con un vaso de enriquecimiento de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención.

35 Las Figuras 90A y 90B son vistas en sección transversal ampliadas de una jeringa de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 91 es una vista en sección transversal de una jeringa y una vista en perspectiva de un émbolo de acuerdo con una realización de la presente invención.

40 La Figura 92 es una vista en sección transversal de una jeringa y una vista en perspectiva de un émbolo de acuerdo con otra realización de la presente invención.

Las Figuras 93-95 ilustran estaciones de reconstitución.

45 La Figura 96 es una imagen de nanopartículas de sílice fluorescentes fabricadas.

La Figura 97 muestra una gráfica que representa la intensidad de señal de nanopartículas de sílice fluorescentes fabricadas y marcadores de SERS convencionales.

50 La Figura 98 muestra una gráfica que representa la intensidad de señal a lo largo del tiempo de nanopartículas de sílice fluorescentes fabricadas y marcadores de SERS convencionales para detectar la presencia de *Listeria* en espinacas.

55 La Figura 99 muestra una gráfica que representa la intensidad de señal a lo largo del tiempo de nanopartículas de sílice fluorescentes fabricadas y marcadores de SERS convencionales para detectar la presencia de *Listeria* en col.

La Figura 100 es una vista en perspectiva de un recipiente para un vaso de enriquecimiento de acuerdo con una realización de la presente invención.

60 La Figura 101 es una vista superior de una tapa para un vaso de enriquecimiento de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 102 es una vista inferior de la tapa mostrada en la Figura 101.

65 La Figura 103 es una vista en perspectiva inferior de la tapa mostrada en la Figura 101.

La Figura 104 es una vista lateral de la tapa mostrada en la Figura 101.

La Figura 105 es una vista en sección transversal de la tapa mostrada en la Figura 101.

5 La Figura 106 es una vista lateral de una cesta para un vaso de enriquecimiento de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 107 es una vista superior de la cesta mostrada en la Figura 106.

10 La Figura 108 es una vista inferior de la cesta mostrada en la Figura 106.

La Figura 109 es una vista en perspectiva de la cesta mostrada en la Figura 106.

Descripción detallada de la invención

15 La materia objeto desvelada por la presente se describirá ahora más completamente en lo sucesivo en el presente documento con referencia a los dibujos adjuntos, en los que se muestran algunas, pero no todas, de las realizaciones de la materia objeto desvelada por la presente. Los expertos en la materia a la que pertenece la materia objeto desvelada por la presente serán conscientes de muchas modificaciones y otras realizaciones de la materia objeto desvelada por la presente expuesta en el presente documento teniendo el beneficio de las enseñanzas presentadas en las descripciones anteriores y los dibujos asociados. Por lo tanto, debe entenderse que la materia objeto desvelada por la presente no debe limitarse a las realizaciones específicas desveladas y que se pretende que se incluyan modificaciones y otras realizaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Aunque se emplean términos específicos en el presente documento, estos se usan en un sentido genérico y descriptivo solamente y no para fines de limitación.

Los términos "un", "una", "el" y "la" se refieren a "uno o más" cuando se usan en la presente solicitud, incluyendo las reivindicaciones. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una muestra" incluye una pluralidad de muestras, a no ser que el contexto claramente indique lo contrario (por ejemplo, una pluralidad de muestras) y así sucesivamente.

30 A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, las palabras "comprenden", "comprende" y "comprender" se usan en un sentido no exclusivo, excepto cuando el contexto requiera otra cosa.

35 Como se usa en el presente documento, se entiende que el término "aproximadamente", cuando hace referencia a un valor, abarca un valor específico y variaciones del mismo. Dichas variaciones pueden ser, en algunas realizaciones $\pm 100\%$, en algunas realizaciones $\pm 50\%$, en algunas realizaciones $\pm 20\%$, en algunas realizaciones $\pm 10\%$, en algunas realizaciones $\pm 5\%$, en algunas realizaciones $\pm 1\%$, en algunas realizaciones $\pm 0,5\%$ y en algunas realizaciones $\pm 0,1\%$ de la cantidad específica, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar los métodos desvelados o emplear las composiciones desveladas.

40 Además, cuando se proporciona una cantidad, concentración u otro valor o parámetro como un intervalo, intervalo preferido o una lista de valores superiores preferibles y valores inferiores preferibles, debe entenderse que esta desvela específicamente todos los intervalos formados a partir de cualquier par de cualquier límite del intervalo superior o valor preferido y cualquier límite de intervalo inferior o valor preferido, independientemente de si los intervalos se desvelan por separado. Cuando se enumera en el presente documento un intervalo de valores numéricos, a no ser que se indique de otro modo, se pretende que el intervalo incluya los puntos finales del mismo, y todos los números enteros y fracciones dentro del intervalo. No se pretende que el alcance de la materia objeto desvelada en el presente documento se limite a los valores específicos enumerados cuando se define un intervalo.

50 La presente divulgación desvela sistemas y métodos que utilizan partículas indicadoras (por ejemplo, partículas indicadoras activas en dispersión de Raman potenciada en superficie (SERS)), para detectar y/o identificar uno o más microorganismos en una muestra de cultivo bacteriano por un ensayo sin lavado homogéneo (HNW). Más específicamente, se desvelan técnicas para supervisar la concentración de microorganismos en "tiempo real" a medida que aumenta el nivel de microorganismos a lo largo del tiempo dentro de una muestra. Las partículas indicadoras tienen asociadas con las mismas uno o más miembros de unión específicos que tienen una afinidad por el o los microorganismos que se ensayan. Cuando se pone en contacto con una muestra de cultivo microbiológico que contiene uno o más microorganismos de interés, puede formarse un complejo, denominado en general en el presente documento complejo de partícula indicadora-microorganismo, entre el o los microorganismos de interés y la partícula indicadora con un miembro de unión específica asociado. El complejo de partícula indicadora-microorganismo puede capturarse por una partícula de captura magnética y concentrarse para formar un sedimento en un área localizada (es decir, una "zona de medición") para detección midiendo la señal (por ejemplo, espectro de SERS) y/o una inspección visual de una imagen del sedimento. No se pretende que el término "sedimento", como se usa en el presente documento, sea limitante y en una disposición, se refiere a una colección de una pluralidad de partículas indicadoras y partículas de captura magnética localizadas en un área localizada facilitada por la aplicación de un campo magnético, en el que el sedimento es detectable usando medios visuales, ópticos u otros adecuados. El sedimento también puede incluir microorganismos capturados entre medias, si están presentes, y otros componentes y/o microorganismos

pueden unirse de forma no específica con las partículas magnéticas. El sedimento puede formarse temporalmente ya que el sedimento puede dispersarse tras la retirada del campo magnético como se analiza en más detalle posteriormente.

5 Además, diversas disposiciones de la invención se refieren a la capacidad de realizar el ensayo de HNW repetidas veces dentro de la misma muestra de cultivo microbiológico, formando, dispersando y reformando el sedimento a lo largo del tiempo. Esto permite que la concentración de un analito particular se supervise en tiempo real dentro de una muestra de cultivo microbiológico y es particularmente valioso cuando la concentración de microorganismos cambia a lo largo del tiempo, por ejemplo en respuesta a crecimiento bacteriano. Más particularmente, las disposiciones de la invención se refieren a la capacidad para realizar el ensayo de HNW dentro de un vaso de cultivo microbiológico, detectando e identificando de este modo simultáneamente un microorganismo a medida que crece. Además, la técnica puede usarse junto con otros métodos para supervisar la muestra de cultivo (tal como sensor de gases o análisis de imágenes).

15 De acuerdo con una disposición, se realiza un cultivo microbiológico de la muestra en un vaso que también contiene los reactivos de HNW. El vaso de cultivo se inserta en un instrumento que permite la incubación a una temperatura controlada y contiene dispositivos ópticos (por ejemplo, óptica de Raman, un láser de Raman y un espectrómetro). A intervalos temporales regulares durante el cultivo, se aplica un campo magnético, y la señal de SERS se lee desde el sedimento magnético. El sedimento se dispersa entre lecturas para permitir interacciones continuadas de los reactivos con la muestra. A medida que aumenta la concentración del organismo diana durante el proceso de enriquecimiento, se realiza detección e identificación del microorganismo por la tecnología de SERS en cuanto la concentración del microorganismo alcanza el umbral de detección de la tecnología. La capacidad de supervisar continuamente la señal de SERS durante el cultivo asegura que se use el mínimo tiempo de cultivo requerido y que el instrumento pueda alertar automáticamente al usuario cuando se detecte e identifique un microorganismo.

25 Una disposición adicional usa una cámara para supervisar la formación y el tamaño de un sedimento durante un ensayo de HNW que contiene partículas indicadoras conjugadas y perlas magnéticas y el patógeno diana dentro de un vaso de cultivo. Las imágenes muestran que el tamaño del sedimento aumenta, y en algunos casos el sedimento desaparece, de la vista de cámara a medida que progresa el ensayo de HNW. El crecimiento del tamaño del sedimento y/o la desaparición del sedimento es un indicio de la presencia del patógeno diana. Las imágenes capturadas durante el análisis de muestras que contienen partículas indicadoras conjugadas y perlas magnéticas sin patógeno no muestran ningún cambio en el tamaño del sedimento y ninguna desaparición del sedimento. Este método de detección puede usarse solo o junto con otro método de detección.

35 I. Consideraciones generales para la detección e identificación de microorganismos en una muestra de cultivo microbiológico

Como se usa en el presente documento, la expresión "muestra de cultivo microbiológico" se refiere a una composición que comprende una muestra "clínica" o una muestra "industrial" con el potencial de contener microorganismos que se disponen en, se mezclan con o se combinan de otro modo con un medio de cultivo, por ejemplo, un caldo de cultivo de sangre, capaz de dar soporte al crecimiento de uno o más microorganismos que se sospecha que están presentes en la muestra. Más particularmente, las disposiciones de la materia objeto desvelada por la presente proporcionan métodos, sistemas y dispositivos para detectar microorganismos en una muestra de cultivo microbiológico que comprenden un medio capaz de dar soporte al crecimiento del microorganismo en una muestra clínica, tal como sangre, heces, orina o líquido cefalorraquídeo, o en una muestra de producto industrial, tal como alimento, hisopos ambientales o esponjas, agua, productos cosméticos, productos de higiene, productos farmacéuticos u otros productos que se pretende que sean usados o consumidos por animales o seres humanos.

La detección y/o identificación de microorganismos en muestras de cultivo microbiológico, especialmente con métodos ópticos o espectrométricos, puede presentar muchos retos debido a la complejidad de la matriz de muestras. Las muestras clínicas, particularmente las de sangre o heces, son ópticamente absorbentes, haciendo difícil detectar señales ópticas o espectrales sin etapas de lavado o lisis para retirar los componentes de interferencia óptica de las muestras originales. Las muestras industriales, tales como, por ejemplo, muestras alimentarias o cosméticas, pueden ser ópticamente absorbentes, requiriendo de nuevo etapas de lavado o lisis para retirar interferentes ópticos en la muestra original. Aunque se ha indicado la aplicación de SERS para detectar células de mamífero y microorganismos y la aplicación de diagnóstico de partículas indicadoras SERS activas para detectar una diversidad de analitos en presencia de muestras de sangre y alimentos, no se ha indicado la aplicación de partículas indicadoras SERS activas para supervisar concentraciones de bacterias y hongos en "tiempo real" a medida que las concentraciones cambian debido al crecimiento del microorganismo. Como se usa en el presente documento, no se pretende que "tiempo real" sea limitante y puede referirse a supervisión de la muestra de cultivo continuamente o en incrementos de tiempo predeterminados. Por ejemplo, la muestra de cultivo puede ensayarse repetidas veces en incrementos de tiempo predeterminados (por ejemplo, cada 30 minutos, 1 hora, etc.) durante un periodo de incubación predeterminado sin abrir el tubo de muestras manteniendo de este modo la biocontención de la muestra. No se pretende que "biocontención", como se usa en el presente documento, sea limitante y puede referirse a que la muestra de cultivo está en un sistema cerrado de modo que el ambiente circundante fuera del recipiente en el que se confina la muestra de cultivo no se expone a los microorganismos que se cultivan.

Además, los métodos desvelados por la presente permiten el uso diagnóstico de partículas indicadoras en cultivos microbiológicos de una manera que no inhiba el crecimiento del microorganismo que se detecta.

- 5 Los métodos actuales de detección de la presencia o ausencia de patógenos durante el crecimiento microbiológico, por ejemplo armarios de cultivo de sangre, no detectan específicamente organismos, sino un producto no específico del metabolismo (por ejemplo, dióxido de carbono). Por lo tanto, estos sensores pueden potencialmente activarse falsamente por dióxido de carbono producido por otros procesos, tales como oxidación, degradación y respiración de las células de cultivo sanguíneo (por ejemplo, células de mamífero) que son flora normal en una muestra sanguínea.
- 10 Esta señal "de fondo sanguíneo" significativa es una fuente de ruido importante que complica los algoritmos de positividad y reduce la sensibilidad analítica general. La señal generada a partir de un acontecimiento de unión específico, como se describe en los métodos desvelados por la presente, serán un claro indicador de que un patógeno está presente y probablemente no se interprete erróneamente.
- 15 Las diversas disposiciones de la presente invención permiten el crecimiento continuo, la detección e identificación todos dentro de la geometría de un único vial. La tecnología de SERS HNW permite un sistema de cultivo capaz de proporcionar alertas constantes (24 horas/7 días a la semana) en muestras positivas para crecimiento junto con información de identificación adicional (por ejemplo, información o identificación de tinción de gram). A diferencia de los sistemas de cultivo sanguíneo actualmente en el mercado que detectan la ausencia o presencia de crecimiento, el
- 20 ensayo de SERS HNW puede proporcionar identificación del microorganismo o la clase de microorganismos. Pueden seleccionarse anticuerpos conjugados con la SERS y partículas magnéticas para identificar específicamente bacterias gram positivas frente a gram negativas. Resulta importante que las capacidades de multiplexación inherentes de la tecnología de SERS son claves para el cultivo sanguíneo y las aplicaciones industriales.
- 25 Los sensores basados en gas existentes tales como los usados en armarios de cultivo sanguíneo son inadecuados para detectar la presencia de microorganismos patógenos en muestras (por ejemplo, heces, alimentos o muestras ambientales) en las que hay un alto nivel esperado de microorganismos benignos de fondo. No existe en la actualidad ningún método conocido para detección de patógenos en tiempo real dentro de un alimento o una muestra ambiental, debido a que estos tipos de muestras típicamente tienen microorganismos de fondo (benignos) que también crecen
- 30 durante el cultivo, de modo que un sensor basado en el crecimiento no puede distinguir entre el crecimiento de los organismos de fondo y crecimiento del patógeno diana.

- Además, los métodos existentes para identificación de microorganismos requieren una combinación de etapas de preparación y/o lavado de muestras para retirar componentes de interferencia, minimizar la señal de fondo y/o generar una muestra que sea ópticamente transparente. Debido a los requisitos de preparación y lavado de muestras, estos métodos no pueden aplicarse dentro de un cultivo continuo.
- 35

- El ensayo de SERS-HNW supera los problemas de la necesidad de etapas de lavado generando una señal de Raman que puede leerse en una muestra sucia o no aislada. También permite la detección e identificación múltiples en matrices de complejo, haciéndolo de este modo adecuado para la detección múltiple de infecciones del torrente sanguíneo o patógenos alimentarios. Estos atributos del ensayo de HNW se han desvelado previamente. Sin embargo, en todas las divulgaciones previas conocidas, el ensayo de HNW se aplicó una única vez a una única muestra, es decir, se formó un sedimento y se leyó para generar la "respuesta" (identificación + detección). No ha habido ningún indicio de que la realización del ensayo de HNW sea compatible con los requisitos específicos de supervisión en
- 40 tiempo real en cultivo, específicamente:
- 45

- La necesidad de mantener la viabilidad del cultivo (la formación del complejo con el microorganismo no puede inhibir el crecimiento);
- 50 - La capacidad de dispersar de forma fiable y reproducible el sedimento magnético una vez que se ha formado para permitir que la SERS y los reactivos magnéticos continúen interactuando con la muestra;
- La capacidad de la señal del ensayo de SERS HNW para aumentar y reducirse a lo largo del tiempo en respuesta a cambios continuos en la concentración diana; y
- 55 - La capacidad de realizar el ensayo HNW en volúmenes grandes tales como los usados típicamente en cultivo sanguíneo y aplicaciones industriales, ya que se habría esperado inicialmente que los requisitos de volumen de reactivo tuvieran costes prohibitivos y/o que no se podría formar un sedimento que fuera representativo del volumen completo. (Se esperaría que cualquier campo magnético de tamaño razonable solamente atrajera partículas magnéticas del microambiente local).
- 60

- Puede usarse un ensayo de HNW de acuerdo con una disposición para detectar patógenos tales como *E. coli*, *Listeria*, *Salmonella*, etc. que crecen en muestras alimentarias o ambientales. Ya que la presencia de incluso un único organismo dañado es significativa, las muestras se cultivan típicamente para recuperar y hacer crecer selectivamente al patógeno hasta un nivel detectable. Debido a que la muestra inicial puede tener un intervalo de concentraciones de patógeno, los diversos niveles de daño al patógeno y/o microorganismos de fondo competidores altamente variables,
- 65

el tiempo de cultivo requerido hasta alcanzar el límite de detección para cualquier método analítico dado puede variar ampliamente. Por esta razón, los protocolos de detección se formulan típicamente para escenarios "en el peor de los casos", es decir la duración del tiempo de cultivo se elige para asegurar que el patógeno dañado individual crece hasta un nivel detectable. Después se realiza detección e identificación del patógeno (por ejemplo, mediante inmunoensayo o PCR) al finalizar el cultivo. Ya que la carga inicial de patógeno en cualquier muestra dada no puede conocerse a priori, todas las muestras se someten a este protocolo de cultivo largo para asegurar que no falta ningún patógeno. Sin embargo, es probable que muchas muestras hubieran producido detección e identificación positiva después de protocolos de cultivo más cortos, proporcionando una notificación más temprana al experimentador de que hay un problema con la muestra. La combinación del ensayo de HNW basado en SERS con el cultivo permite la supervisión en tiempo real de la carga del patógeno en la muestra a lo largo del cultivo, proporcionando la ventaja significativa de que se detectan muestras con mayores cargas patógenas tan pronto como sea posible en el protocolo de cultivo.

II. Sistemas, métodos y dispositivos para la identificación de microorganismos en una muestra de cultivo microbiológico

Las disposiciones de la presente invención se dirigen a métodos, sistemas y dispositivos para detectar e identificar microorganismos en una muestra de cultivo. En referencia a la Figura 1, el proceso incluye en general proporcionar una pluralidad de partículas indicadoras, miembros de unión y partículas de captura magnética en un vaso y añadir una muestra que potencialmente incluye uno o más microorganismos. El vaso también puede incluir medio de cultivo o crecimiento para ayudar en la selectividad o crecimiento adicional de microorganismos. La muestra se incuba después y se agita durante un periodo de tiempo predeterminado. En los puntos temporales seleccionados o en un programa predeterminado durante el transcurso de la incubación, se aplica un campo magnético al vaso para formar un sedimento. El sedimento se explora después con una fuente de luz para producir una señal detectable (por ejemplo, un espectro de SERS) que se detecta y analiza. El sedimento puede después dispersarse y el proceso repetirse en el siguiente punto temporal determinado.

La Figura 2 muestra una disposición de la metodología y los dispositivos que pueden usarse para detectar e identificar microorganismos en una muestra de cultivo. A este respecto, la Figura 2 ilustra que se obtiene un volumen deseado de una muestra ambiental (por ejemplo, aproximadamente 1 l o menos), una muestra alimentaria (por ejemplo, aproximadamente 25 g a 375 g que da como resultado un volumen de aproximadamente 250 ml a 3 l) o una muestra clínica (por ejemplo, de aproximadamente 100 ml o menos) y se coloca en un vaso de enriquecimiento. En este caso, el vaso de enriquecimiento se configura para facilitar el análisis de ensayos de *Salmonella* o *Listeria*. El vaso de enriquecimiento se incuba durante un periodo de tiempo predeterminado, después de lo cual se transfiere una cantidad predeterminada de muestra a un vial de detección de una manera biocontenida, que se explicará en más detalle posteriormente. El vial de detección se coloca después en un sistema de SERS en tiempo real para incubación adicional y análisis automático usando tecnología SERS, que también se analiza en más detalle posteriormente.

De acuerdo con una disposición, el sistema de SERS se configura para acomodar una pluralidad de viales de detección y de este modo proporcionar un sistema de alto rendimiento. El sistema de SERS también puede configurarse para facilitar un análisis automático de una pluralidad de ensayos diferentes. Por ejemplo, el sistema de SERS puede incluir zonas dedicadas para manipulación y análisis de cada ensayo.

Los sistemas y métodos de acuerdo con las disposiciones proporcionan supervisión en tiempo real del crecimiento de microorganismos en muestras de cultivo microbiológico. La Figura 3 muestra una disposición de la supervisión intermitente del crecimiento de microorganismos o una disposición de punto final. En esta disposición, se añaden reactivos de SERS HNW 1 al vaso 2 donde se realiza el cultivo. El medio 3 y la muestra 4 se añaden al vaso 2 y el vaso 2 se coloca en un incubador 5 de modo que se permite el crecimiento del microorganismo (por ejemplo bacterias, levadura o células). En puntos temporales seleccionados por el usuario (bien durante el cultivo o bien al final de un periodo de cultivo) el vaso se retira del incubador 5 y se coloca en un lector de SERS 6, que (después de la mezcla apropiada de la muestra) forma un sedimento magnético y lee la señal de Raman. El vaso puede después reinsertarse en el incubador 5 para permitir tiempo de crecimiento adicional, si no se detecta la señal de Raman.

La Figura 4 muestra una disposición alternativa en la que la señal de SERS se supervisa de forma continua durante el crecimiento bacteriano. En esta disposición, el incubador y lector de SERS se integran en un único instrumento 7 que, en puntos temporales prescritos, forma el sedimento magnético, lee la señal de SERS y dispersa los reactivos sin necesidad de intervención del usuario.

A. Vaso de enriquecimiento y vial de detección

Los frascos de cultivo microbiológico, tubos, jeringas, viales, vasos y similares (por ejemplo, vasos de enriquecimiento y viales de detección) adecuados para su uso con los métodos, sistemas y dispositivos desvelados por la presente pueden, en algunas realizaciones, estar hechos de vidrio o plástico. En algunas aplicaciones, es deseable un plástico multicapa para controlar la permeabilidad a gases. En las realizaciones en las que el vaso de cultivo microbiológico está hecho de plástico multicapa, el frasco puede moldearse por inyección o soplado y tener capas internas y externas de poliéster, polipropileno, polietileno, cloruro de polivinilo, policarbonato, polietilentereftalato (PET), copolímero de olefina cíclico (COC) o cualquier copolímero o mezcla del mismo separado por una capa intermedia de nailon, alcohol de etilvinilo (EVOH), alcohol de polietilenvinilo o copolímeros o mezclas de los mismos. Sin embargo, se entiende

que el vaso puede no ser multicapa en otras realizaciones y formarse usando técnicas similares, (por ejemplo, moldeo por inyección o soplado). En algunas aplicaciones, los componentes del vaso pueden tratarse con recubrimiento de superficie o métodos químicos para combatir las interacciones vaso/muestra o propiedades físicas. En algunas realizaciones, el vaso puede ser transparente a la radiación visible, aunque, en realizaciones particulares, no se requiere dicha transparencia. Adicionalmente, en algunas realizaciones, los vasos desvelados por la presente pueden ser adaptables para esterilización. Además, en algunas realizaciones, el vaso es adecuado para cultivo aerobio o anaerobio. En una realización, el vaso es permeable a gases. Además, el vaso puede incluir un grosor de pared constante a lo largo de su longitud que puede potenciar la sedimentación y el análisis óptico.

Las Figuras 5A-5E y 7 representan un vaso de enriquecimiento 50 de acuerdo con una realización de la presente invención. Opcionalmente, el vaso de enriquecimiento 50 puede contener medio de cultivo seco o líquido. El vaso de enriquecimiento incluye en general una tapa 52, una cesta 54, conjuntos de agujas 56 y un recipiente 58. La tapa 52 se conecta con la cesta 54 y se configura para conectarse con y sellar el recipiente 58 en una conexión hermética, tal como usando un ajuste roscado o por presión. En un ejemplo, la tapa 52 puede roscarse en el recipiente 58 pero incluiría uno o más elementos de separación para evitar que se desenrosque la tapa sin desconectarse adicionalmente del elemento de separación (por ejemplo, presionar hacia abajo y rotar la tapa para su retirada). Por lo tanto, la tapa 52, los conjuntos de agujas 56 y la cesta 54 pueden acoplarse entre sí para poder conectar y desconectar del recipiente 58 como una unidad. Por ejemplo, la tapa 52 y la cesta 54 pueden acoplarse entre sí por presión o usando otras técnicas adecuadas tales como adhesivos, sellado por calor o pasadores. A este respecto, la Figura 9C ilustra que la cesta 54 puede incluir orificios de pasadores 60 para conectar con pasadores 62 para fijar la tapa y la cesta entre sí (véase también Figura 5A). La Figura 8 muestra el fondo de la tapa que incluye una pluralidad de agujeros 65 que se alinean con agujeros respectivos 60 en la cesta (véase Figura 9C) para recibir los pasadores 62 a través de ellos. De forma similar, los conjuntos de agujas 56 pueden unirse a la tapa 52 usando técnicas de fijación similares, tales como un ajuste por presión, conexión enroscada o adhesivos. El recipiente 58 se configura para contener una cantidad deseada de una muestra en el mismo y, por lo tanto, puede ser de diversos tamaños y formas según sea necesario. Por ejemplo, las Figuras 5A-5C, 7 y 100 ilustran formas ejemplares de un recipiente 58. En una realización, la cesta 54 y el recipiente 58 pueden ser transparentes o translúcidos para facilitar la visibilidad dentro del recipiente y, en particular, la visibilidad de la muestra dentro de los depósitos 64, 66. Además, la Figura 100 ilustra que el recipiente 58 puede incluir una o más líneas de volumen 59 para visualizar la cantidad de muestra contenida en el recipiente. La Figura 7 también ilustra que el vaso 50 puede incluir una junta 68 u otro miembro de sellado usado para asegurar una conexión hermética entre la tapa 52 y el recipiente 58.

El vaso de enriquecimiento 50 incluye un par de conjuntos de agujas 56 y depósitos 64, 66. Sin embargo, se entiende que puede haber uno o más conjuntos de agujas 56 y depósitos 64, 66 en realizaciones alternativas. En la realización ilustrada, un conjunto de aguja 56 y depósito 64 o 66 se configura para uso con un tipo de ensayo particular (por ejemplo, *Salmonella* o *Listeria*). Debido a que se cultivan diferentes microorganismos usando diferentes medios y tamaños de muestras, el vaso de enriquecimiento facilita el uso de una única cesta para diferentes ensayos.

La cesta 54 se muestra en más detalle en las Figuras 9A-9C. La cesta 54 incluye un par de depósitos 64, 66, con cada depósito configurado para contener un volumen de muestra predeterminado. Como se muestra, los depósitos 64, 66 se separan del fondo del recipiente 58, en el que este espacio se configura para contener una muestra deseada. A este respecto, el primer depósito 66 se configura para contener un volumen mayor que el segundo depósito 64. En una realización específica, el primer depósito 66 se configura para contener aproximadamente 5 ml y el segundo depósito 64 se configura para contener aproximadamente 100 µl. Como se muestra, los depósitos 64, 66 pueden moldearse para facilitar la medición de la muestra así como alineamiento con un conjunto de aguja respectivo 56. Por ejemplo, las Figuras 5A-5C y 6 ilustran que cada aguja 70 se inserta dentro de un depósito 64, 66 y hasta la posición más baja del mismo para asegurar que se retira sustancialmente toda la muestra medida. Por lo tanto, la longitud de la aguja 70 puede ajustarse dependiendo del tamaño del depósito, ya que la aguja que se extiende dentro del primer depósito 66 es más larga que la aguja que se extiende dentro del segundo depósito 64. La forma del depósito 64, 66 puede ser cualquier forma que sea adecuada para conservar la cantidad deseada de muestra. Por ejemplo, las Figuras 5A, 5B, 5C, 5E y 9B muestran que el segundo depósito 64 tiene una forma en general cónica, mientras que el primer depósito 66 tiene superficies que se extienden a lo largo de la aguja y se estrechan hacia la base de la aguja.

La Figura 9C en particular ilustra que la cesta 54 incluye varios agujeros 72, 74 definidos por la misma. Típicamente, la cantidad de muestra en el recipiente 58 estaría por debajo de los agujeros 72 cuando el recipiente esté en una posición vertical, pero estaría al menos por debajo de la entrada a cada depósito 64, 66 de modo que pueda medirse un volumen deseado. Los agujeros 72 pueden definirse dentro de la cesta adyacente a los depósitos, mientras que los agujeros 74 pueden definirse mediante una superficie superior 76 de la cesta adyacente a una parte 78 que conecta con la tapa. Los agujeros 72 localizados adyacentes a los depósitos 64, 66 se configuran para drenar el exceso de muestra dentro de un depósito respectivo. Concretamente, cuando el vaso de enriquecimiento 50 se inclina desde una posición horizontal erguida para llenar uno de los depósitos 64, 66, la devolución del vaso a la posición erguida da como resultado que el depósito rebose de muestra y el exceso de muestra se drenará posteriormente a través de los agujeros 72. Como tal, un volumen deseado se mide de una manera repetible dentro de cada depósito 64, 66. Los agujeros 74 definidos en la superficie superior 76 de la cesta 54 pueden usarse para permitir que la muestra entre en los depósitos 64, 66 evitando también al mismo tiempo que se transfieran partículas no deseadas en la muestra a los depósitos. Se entiende que la cesta 54 puede modificarse dependiendo de la cantidad de muestra para medir y el tipo

de muestra, tal como modificando el tamaño y la profundidad del depósito 64, 66, así como el tamaño y la profundidad de los agujeros. A este respecto, la Figura 9C ilustra que los agujeros 72, 74 pueden estrecharse en diferentes direcciones entre sí para ayudar a drenar, siendo la entrada a los agujeros 72 adyacentes al depósito mayor que la entrada a los agujeros 74 en la superficie superior 76 de la cesta. La entrada de agujero más pequeño puede usarse para filtrar la entrada de cualquier partícula no deseable a los depósitos. Además, las Figuras 106-109 ilustran una realización en la que la cesta 54 incluye los agujeros 72, 74 que son de aproximadamente el mismo tamaño. Además, la cesta 54 también puede incluir un nervio 75 u otra superficie elevada que se configura para ayudar a drenar el fluido a través de la cesta. En particular, el nervio 75 puede estar en el centro de la cesta 54 para facilitar el vertido durante la filtración y el drenaje ofreciendo una superficie capaz de drenar el exceso de fluido por encima de la cesta con diferentes características de drenaje que el resto de agujeros en la superficie superior 76 de la cesta. Las Figuras 106 y 108 ilustran una realización en la que una superficie de fondo de los depósitos 64, 66 puede incluir una o más protuberancias 119 que ayudan a drenar disipando el fluido del depósito y permitiendo que se incorporen múltiples agujeros de drenaje 72.

Como se muestra en la Figura 9B, cada depósito 64, 66 se separa de una superficie superior 76 de la cesta con un espacio de cabeza respectivo 80, 82. Los espacios de cabeza 80, 82 permiten que la muestra entre fácilmente en un depósito respectivo 64, 66 cuando se inclina el recipiente. Por lo tanto, cuando el recipiente 58 está inclinado, la muestra entra a través de los agujeros 74 definidos en la superficie superior 76 de la cesta 54, en el espacio de cabeza 80 u 82, y entran en el depósito 64 o 66. Cuando el recipiente 58 se devuelve a una posición erguida, el depósito 64 o 66 rebosa debido a un exceso de muestra localizado en el espacio de cabeza 80 u 82, en el que el exceso de muestra se drena después a través de los agujeros 72 definidos adyacentes al depósito y se devuelve al recipiente. Como se muestra en la Figura 9B, los agujeros 72 definidos adyacentes a los depósitos 64, 66 se localizan debajo de la apertura que conduce al depósito para facilitar el drenaje y medir la cantidad de muestra deseada.

Cada depósito 64, 66 se alinea con un conjunto de aguja 56 respectivo como se muestra en las Figuras 5A-5C y 6. En una realización la tapa 52 incluye una parte 78 que conecta con la tapa, en la que la parte que conecta con la tapa se configura para acoplar la cesta 54 y la tapa entre sí como se ha analizado anteriormente. La parte 78 que conecta con la tapa y la cesta 54 tienen un diámetro externo más pequeño que el diámetro interno de la apertura del recipiente 58 para configurarlo para insertar dentro del recipiente. La parte 78 que conecta con la tapa también puede incluir aperturas para recibir conjuntos de aguja 56 respectivos que se extienden a los depósitos 64, 66. Las agujas 70 se localizan dentro de la parte 78 que conecta con la tapa de modo que las agujas se configuran para conectar con un vial de detección como se analiza en más detalle posteriormente. A este respecto, la parte 78 que conecta con la tapa incluye una superficie cónica o ahusada 105 frente a una apertura respectiva 102, 104 que se configura para recibir y conectar con un conjunto de aguja 56. Las agujas 70 se extienden adicionalmente a través de aperturas respectivas definidas en el fondo de la superficie cónica 105 al espacio de cabeza 80, 82 y dentro de un depósito respectivo 64, 66 (véase Figuras 5A-5C y 6). La Figura 6 ilustra que cada conjunto de aguja 56 puede conectar con la parte 78 que conecta con la tapa de modo que las agujas 70 se extiendan próximas a los depósitos 64, 66. La Figura 6 ilustra que la tapa 52 también puede incluir un respiradero 86 definido en el mismo para permitir que escape cualquier producto secundario gaseoso, no peligroso, del recipiente para evitar que se acumule la presión durante el cultivo. Las Figuras 102-103 y 105 ilustran una realización alternativa en la que un poste de ventilación 125 se extiende desde una superficie inferior de la tapa 52. El poste de ventilación 125 define una apertura a través de ella para recibir y conectar con un filtro para filtrar cualquier producto secundario gaseoso que salga del recipiente 58. El poste de ventilación 125 se alinea con el respiradero 86. A este respecto, el poste de ventilación 125 se configura para dirigir productos secundarios gaseosos, no peligrosos, a través de la apertura en el poste de ventilación y a través del respiradero 86 definido en una superficie superior de la tapa 52.

Las Figuras 102-103 y 105 también ilustran que la tapa 52 puede incluir además un poste de conexión 127 que se extiende hacia afuera desde una superficie inferior de la tapa. El poste de conexión 127 se configura para alinearse con y conectar con un poste de conexión correspondiente 129 que se extiende hacia afuera desde una superficie superior de la cesta 54, como se muestra en las Figuras 106, 107 y 109. Como se ilustra, el poste de conexión 127 tiene un diámetro menor que el poste de conexión 129, aunque los tamaños relativos de los postes pueden invertirse si se desea. Además, la parte de conexión 78 mostrada en las Figuras 103-105 se configura para conectar una parte de conexión correspondiente 121 definida en una superficie superior de la cesta 54 (véase Figuras 106, 107 y 109). En particular, puede modificarse el tamaño de la parte de conexión 78 y esta puede configurarse para superponerse sobre y rodear la parte de conexión 121. La periferia externa de la superficie de conexión 121 puede definir una pluralidad de nervios 123. Cuando las superficies de conexión 78 y 121 se conectan entre sí (por ejemplo, deslizando y/o rotando una con respecto a la otra), los nervios pueden configurarse para comprimir los nervios 123. La compresión puede ser suficiente para crear un ajuste de fricción entre la tapa 52 y la cesta 54. En una realización, los nervios 123 pueden aplastarse o deformarse de otro modo para crear un ajuste de fricción.

Cada conjunto de aguja 56 se configura para conectar con un vial de detección respectivo 100. El vial de detección 100 puede incluir una configuración de tapón particular para acoplarse con una apertura respectiva 102, 104 definida en la tapa 52. Por lo tanto, cada tapón puede asociarse con un tipo específico de muestra de modo que el riesgo de usar el medio erróneo para un microorganismo se minimiza. Por ejemplo, la tapa 52 puede incluir una apertura en forma de cerradura 104 que solamente permite acoplar el tapón del vial de detección cuando el tapón se orienta para conectar con las ranuras 110 (véase Figura 6). La Figura 101 muestra una realización alternativa de una tapa 52 en

la que las ranuras 110 se definen a lo largo de la longitud de la apertura 104, incluyendo a lo largo de la superficie cónica 105. Las ranuras 110 pueden definirse en la superficie interna de la apertura, como se muestra en la Figura 6, o tanto en la superficie interna como en la externa de la apertura como se muestra en las Figuras 101-103.

Las Figuras 10A y 10B ilustran una realización ejemplar de un tapón 106 adecuado para su uso con un vial de detección. A este respecto, el tapón 106 incluye una pluralidad de nervios 108 que se configuran para conectar con ranuras respectivas 110 definidas en la apertura 104 de la tapa 52 (véase Figura 5D). Por lo tanto, para que el tapón 106 se inserte dentro de la apertura 104, los nervios 108 necesitarían alinearse radialmente dentro de las ranuras 110. Además, el tapón 106 incluye una pluralidad de elementos de conexión 112 que se configuran para conectar el vial de detección 100 en un ajuste por presión. La conexión por presión puede minimizar la ovalización del vial de detección 100, así como desplazamiento del tapón 106 durante la manipulación. Se entiende que el tapón 106 y el vial de detección 100 pueden fijarse juntos usando otras técnicas adecuadas, tales como una conexión de tapón/manguito enroscado o plegado, adhesivos, soldado ultrasónico y/o sellado por calor. La Figura 13A ilustra el tapón 106 conectado con un vial de detección 100, de acuerdo con una realización de la presente invención.

Como se ha mencionado anteriormente, el tapón 106 puede tener diferentes configuraciones para diferentes ensayos de modo que se elimina el riesgo de usar el vial de detección incorrecto 100. Por ejemplo, las Figuras 11A y 11B ilustran una configuración de tapón alternativo 114, mientras que la Figura 14A muestra el tapón 114 conectado con un vial de detección 100. Como se ilustra, cada tapón 106, 114 puede incluir una pluralidad de nervios 108 y elementos de conexión 112. El tapón 114 puede configurarse para ser recibido dentro de una apertura respectiva 102, aunque no es necesario que la apertura incluya ranuras correspondientes. Por lo tanto, el tapón 114 puede ser recibido dentro de la apertura 102 independientemente de su orientación radial, pero el tapón 114 no podría insertarse dentro de la apertura 104. Por lo tanto, los nervios 108 del tapón 106 pueden evitar el acceso a la apertura 102 en la tapa 52 al igual que el diámetro externo del tapón 114 puede evitar el acceso a la apertura 104.

Las Figuras 12, 13B y 14B ilustran elementos adicionales del vial de detección 100 y el tapón 114 de acuerdo con una realización de la presente invención. Concretamente, el tapón 114 incluye un obturador 116 y una almohadilla absorbente 118 dispuesta entre el tapón y el obturador. La almohadilla absorbente 118 puede usarse para absorber cualquier muestra que salga del vial de detección 100 después de transferir la muestra del vaso de enriquecimiento 50 al vial de detección minimizando de este modo la exposición al técnico o ambiente. El tapón 114 también puede tener un reposadedos 117 para evitar el contacto accidental de una almohadilla potencialmente húmeda. Además, el obturador 116 puede ser de cualquier material adecuado que esté configurado para crear una conexión hermética con el vial de detección 100 (es decir, líquido y gas), así como para ser perforado por una aguja para volver a sellar con una conexión hermética después de ser perforado por una aguja y para conectar con el vial de detección. Por ejemplo, el obturador 116 puede ser una goma adecuada o un material elastomérico. La Figura 12 también ilustra la conexión entre los elementos de conexión 112 y la protrusión 115 del vial de detección 100. Por lo tanto, los tapones 106, 114 pueden conectar con el vial de detección 100 en un ajuste por presión, que evitaría la retirada o el desplazamiento no intencionados del tapón. La forma de la protrusión 115 puede ser cualquier forma que permita un ajuste por presión retentivo con los elementos de conexión 112.

Los viales de detección 100 pueden incluir los reactivos y opcionalmente un medio, tal como por ejemplo un medio de cultivo específico, dependiendo del microorganismo que se ensaye en la muestra. Los reactivos y medios pueden estar presentes en el vial de detección en un formato seco (por ejemplo, deshidratado) o en un formato húmedo (por ejemplo, hidratado). Por ejemplo, los medios y el reactivo pueden secarse. Los viales de detección 100 también pueden contener un vacío cuando el obturador 116 se conecta con los mismos. Por lo tanto, cuando el vial de detección 100 se inserta dentro de una apertura 102, 104 respectiva en la tapa 52, el obturador 116 y la almohadilla absorbente 118 se perforan por la aguja 70, y la muestra dentro del depósito 64 o 66 se saca a través de la aguja y al vial de detección (véase Figuras 15-17). En un ejemplo, la parte de la aguja 70 que se extiende a la apertura 102 o 104 puede incluir un manguito protector 120 que se configura para comprimirse a medida que el vial de detección 100 se empuja hacia abajo y en conexión con la aguja. Cuando el manguito protector 120 se comprime, la aguja 70 se expone y penetra en el obturador 116, permitiendo que el vacío extraiga la parte de la muestra contenida dentro del depósito 64 o 66. Después de completar la transferencia de fluido y retirada del vial de detección 100, el manguito protector 120 vuelve a su forma original cubriendo la aguja 70. Como tal, la transferencia de la muestra entre el vaso de enriquecimiento 50 y el vial de detección 100 se produce de una manera biocontenida. El vacío dentro de cada vial de detección 100 puede ser cualquier cantidad suficiente para extraer una cantidad deseada de muestra del depósito (por ejemplo, 8-10 ml de capacidad de extracción para una muestra de 5 ml). Cualquier exceso de vacío adicional en el vial de detección 100 se extrae por aire después del fluido del depósito 64 o 66.

El vial de detección 100 puede proporcionarse con reactivos, con o sin medio de cultivo o crecimiento, obturador 116, almohadilla 118 y tapón 106 o 114 con vacío o sin vacío, dependiendo del usuario final (por ejemplo, uso externo frente a uso interno). En este sentido, el vial de detección 100 puede ensamblarse solamente con el obturador 116 para retención de reactivos solamente, mientras que el tapón 106 o 114 se proporciona por separado para usuarios que necesitan acceder al interior del vial de detección. Como alternativa, el vial de detección 100 puede preensamblarse con una combinación de obturador 116, almohadilla 118 y tapón 106, 114 como se muestra en la Figura 12. Además, la cantidad de medio y reactivo se determina por el vial de detección 100, no el volumen de enriquecimiento inicial, de acuerdo con una realización.

Como tal, la configuración del vaso de enriquecimiento 50 y el vial de detección 100 permite que la muestra se contenga y transfiera de una manera biocontenida, limitando de este modo la exposición al técnico o a la instalación. El vaso de enriquecimiento 50 también facilita la medición precisa de un volumen deseado de muestra, configurándose al mismo tiempo también para acomodar una pluralidad de tipos de muestras. Por ejemplo, esto puede ser particularmente útil para *Salmonella* y *Listeria*, donde se utilizan diferentes ensayos, medios y cantidades de muestra. El vaso de enriquecimiento 50 y vial de detección 100 también se configuran para reducir el riesgo de que se use el vial incorrecto para ensayar incorporando elementos de acoplamiento entre el vaso de enriquecimiento y el vial de detección.

Las Figuras 86 y 88 ilustran otra realización de un vaso de enriquecimiento 125. Como antes, el vaso 125 incluye una tapa 126 conectada con un recipiente 128 de una manera hermética. Como se muestra, el vaso de enriquecimiento 125 incluye un soporte de jeringa longitudinal 130 que se extiende desde la tapa 126 al recipiente 128. El soporte de jeringa 130 puede unirse a la tapa 126 o puede ser parte integral de la misma. El soporte de jeringa 130 incluye una apertura 132 configurada para recibir una jeringa 134 en la misma, y tiene en general una forma en relación de acoplamiento con la jeringa 134. En la base del soporte de jeringa 130 se conecta un conjunto de aguja que incluye un eje 133 y una aguja 135, en el que el eje está conectado con un soporte de jeringa, y la aguja se extiende dentro del recipiente 128 y se configura para extraer muestras a través de la misma. La aguja 135 puede incluir una cubierta comprimible 141 que se extiende sobre la parte de la aguja dentro de la jeringa 134. Como se ha analizado anteriormente también, la tapa 126 puede incluir un orificio 131 para permitir que escapen productos secundarios gaseosos no peligrosos del recipiente.

La Figura 87 ilustra una realización de una jeringa 134 que incluye en general un asa 136, una varilla de émbolo 137 acoplada al asa, un tapón 138, un émbolo 139 acoplado al extremo de la varilla de émbolo, un tabique 40 y un sello 146. La Figura 87 ilustra además que la jeringa 134 se configura para conectar con la apertura 132, tal como con una interfaz de bloqueo por giro 142, para soportar la fuerza de tracción aplicada cuando se extrae la muestra del recipiente 128. Por lo tanto, el émbolo 137 puede desplazarse longitudinalmente dentro de la jeringa 134. El tabique 140 se configura para ser perforado por una aguja y volver a sellarse tras la retirada de la aguja. En otras realizaciones, el tabique 140 también incluye una almohadilla absorbente y un elemento de guarda para evitar la contaminación del usuario debido a cualquier fluido que pueda escapar a través del tabique. El sello 146 se conecta con la jeringa 134 y el tapón 138 para crear una conexión hermética. La jeringa 134 puede incluir también un primer orificio mayor 149 dispuesto dentro de la apertura 132 y una región de cuello 157 que incluye un segundo orificio más pequeño 151. Como se muestra en las Figuras 87 y 88, una extensión 153 se extiende desde la región de cuello 157 y el orificio mayor 149 de modo que una parte del orificio más pequeño 151 se extiende dentro del orificio mayor 149. Puede haber una o más ranuras o aperturas 155 definidas entre la extensión 153 y la base de la región del cuello 157, como se analiza en más detalle posteriormente.

Las Figuras 89A-89C ilustran la progresión de una posición de partida, una parada "blanda" y una parada "dura" cuando se retira la muestra del recipiente 128 y a la jeringa 134. Como se muestra en la Figura 89A, cuando la jeringa 134 conecta con el soporte de jeringa 130, el émbolo 139 se sitúa adyacente a la aguja 135 en la posición de partida y se configura para comprimir la cubierta 141 para permitir la comunicación fluida entre el recipiente 128 y la jeringa 134 a través de la aguja. La Figura 88 ilustra además que la aguja 135 se configura para penetrar el tabique 140 cuando la jeringa 134 conecta con el soporte de jeringa 130. A medida que la varilla de émbolo 137 se extrae hacia fuera desde la jeringa 134, se extrae una parte 144 de la muestra a través de la jeringa 135 y al orificio 151, y un elemento de conexión 145 en la varilla de émbolo conecta con el sello 146 para detener la extracción adicional del mismo. De esta manera, la muestra se extrae a una velocidad deseada por lo que el fluido es capaz de alcanzar al vacío de modo que se evite extraer demasiada poca muestra.

En la Figura 89C, la varilla de émbolo 137 se extrae adicionalmente de la jeringa 134, por lo que un segundo elemento de conexión 147 en la varilla de émbolo 137 conecta con el sello 146 para evitar la extracción adicional de la varilla de émbolo. Además, el primer elemento de conexión 145 se conecta dentro de un bolsillo 148 definido en el sello 146 que evita que la varilla de émbolo 137 se desplace adicionalmente fuera de la jeringa 134. Como se muestra en la Figura 89C, el émbolo 139 puede disponerse dentro de la extensión 153 de la jeringa 134 de modo que no pueda extraerse más vacío debido a que la varilla de émbolo 137 y el émbolo 139 se sitúan de modo que el orificio 151 ya no esté cerrado. Es decir, cuando el émbolo 139 ya no cubre las aberturas 155, los orificios 149 y 151 están en comunicación fluida entre sí de modo que ya no se extrae un vacío. Además, la conexión de la varilla de émbolo 137 y el sello 146 evita que la varilla de émbolo se extraiga en la jeringa 134, mientras que también evita que un usuario extraiga adicionalmente el émbolo y se arriesgue a exposición a la muestra.

Las Figuras 90A y 90B ilustran otra realización de una varilla de émbolo 137. La varilla de émbolo 137 incluye nervios longitudinales 159 que están configurados para deslizarse dentro de ranuras definidas dentro del tapón 138. Además, la Figura 90B muestra que el émbolo 137 puede girarse para desconectar los nervios 159 de las ranuras y conectar con el tapón 138 para evitar que el émbolo vuelva a la jeringa 134.

Las Figuras 91 y 92 ilustran varillas de émbolo alternativas y émbolos que pueden usarse para extraer diferentes volúmenes del recipiente 128. A este respecto, la Figura 91 corresponde a la descrita en relación con las Figuras 87,

88 y 89A-C. Por lo tanto, el émbolo 139 es adecuado para extraer volúmenes más pequeños al orificio menor 151 (por ejemplo, aproximadamente 125 µl). En consecuencia, el tamaño del émbolo y la longitud de la varilla de émbolo pueden variarse según sea necesario. En otra realización, la Figura 92 muestra un émbolo 161 adecuado para extraer una muestra al orificio mayor 149 (por ejemplo, aproximadamente 5 ml). Por lo tanto, la jeringa 134 es adecuada para su uso con diferentes émbolos para extraer diferentes volúmenes de muestra, que es útil cuando se ensaya con respecto a diferentes microorganismos (por ejemplo, *Listeria* y *Salmonella*). Además, el usuario puede recibir la jeringa 134 y el émbolo/la varilla de émbolo preensamblados, o el usuario puede añadir reactivos, líquido de reconstitución, etc. y después ensamblar el émbolo/varilla de émbolo con la jeringa.

Un método para la detección e identificación de uno o más microorganismos en una muestra de cultivo microbiológico de acuerdo con una disposición puede realizarse en un vaso de cultivo microbiológico. Un vaso de cultivo microbiológico puede tener dispuestas en el mismo una o más partículas indicadoras y una o más partículas de captura magnética teniendo cada una asociadas con las mismas uno o más miembros de unión, por ejemplo, un anticuerpo, que tiene una afinidad por el o los microorganismos que se ensayan. Las partículas indicadoras y partículas de captura magnética pueden disponerse en el vaso de cultivo microbiológico antes de, simultáneamente con o después de disponer en el mismo una muestra clínica o industrial que se sospecha que contiene el o los microorganismos que se ensayan. El medio de crecimiento de cultivo puede disponerse en el vaso de cultivo microbiológico antes de, simultáneamente con o después de la adición de la muestra clínica o industrial. Una vez que se han introducido las partículas indicadoras, partículas de captura magnética, el medio de cultivo y la muestra clínica o industrial en el vaso de cultivo, el vaso de cultivo se agita después continuamente o de forma intermitente para mezclar las partículas indicadoras y las partículas de captura magnética con la muestra combinada y el medio de cultivo. En disposiciones preferidas descritas en el presente documento, el perfil de agitación (por ejemplo, velocidad y/o desplazamiento) puede variarse en diferentes estadios del cultivo o el ciclo de lectura. Cuando están presentes en la muestra clínica o industrial, el o los microorganismos que se ensayan pueden unirse con el o los miembros de unión asociados con las partículas indicadoras y partículas de captura magnética para formar un complejo de partícula de captura magnética-microorganismo-partícula indicadora.

Cuando la partícula indicadora es SERS activa, la Figura 18 muestra un ejemplo de un complejo de partícula de captura magnética-microorganismo-partícula indicadora SERS activa dentro de un vaso de cultivo 2. La partícula indicadora SERS activa 10, tiene asociados con la misma uno o más miembros de unión específica 11 que tienen una afinidad por uno o más microorganismos 12 que se ensayan. Una partícula de captura magnética 13 también tiene asociados con la misma uno o más miembros de unión específica 14 que tienen una afinidad por el o los microorganismos 12 que se ensayan. Las partículas de captura magnética 13 pueden unirse con uno o más microorganismos 12, que también pueden unirse con partícula SERS activa 10, para formar el complejo de partícula de captura magnética-microorganismo-partícula SERS activa, que también se denomina en el presente documento complejo de tipo sándwich, en el que el microorganismo se une simultáneamente con más de un miembro de unión específica. En este complejo de tipo sándwich particular, al menos un miembro de unión específica 14 está unido con una partícula de captura magnética 13 y al menos otro miembro de unión específica 11 está unido con una partícula indicadora SERS activa 10. Por lo tanto, el microorganismo 12 está "intercalado" entre la partícula de captura magnética 13 y la partícula indicadora SERS activa 10.

Se aplica un campo magnético a la muestra mediante un imán 15 para atraer las partículas de captura magnética 13 para localizar los complejos de partícula de captura magnética-microorganismo-partícula indicadora SERS activa en un sedimento dentro de la zona de medición 9 dentro del vaso de cultivo 2 para detectar la señal de SERS. La radiación de la fuente de luz 16 puede después dirigirse al sedimento y la señal de SERS puede detectarse por detector de Raman 17. Se usan fuente de luz 16 y detector 17 para inducir y medir, respectivamente, la identificación de Raman producida por la partícula indicadora SERS activa 10. La localización de los complejos de partícula de captura magnética-microorganismo-partícula indicadora SERS activa proporciona una señal de SERS, cuya intensidad refleja la concentración del microorganismo, localizando las partículas indicadoras SERS activas que se unen con partículas magnéticas en la zona de detección, segregándolas de este modo de las partículas indicadoras SERS activas no unidas que permanecen en solución.

En algunas disposiciones, la zona de medición puede estar localizada a lo largo de una superficie interna de un frasco o vaso de cultivo microbiológico. Por ejemplo, con respecto a un frasco, la zona de medición puede localizarse a lo largo de una superficie interna dentro de o adyacente al cuello del frasco; una superficie interna que comprende la sección media del frasco; o una superficie interna a lo largo de la base del frasco adyacente a, por ejemplo, un sensor separado, por ejemplo, un sensor basado en fluorescencia o un sensor basado en colorimetría, o en disposiciones en las que no está presente un sensor separado, junto con una superficie interna de la base, es decir, el fondo, del frasco de cultivo microbiológico. En una realización disposición, la zona de medición se localiza a lo largo de una superficie interna generalmente en la sección media del frasco o vaso de cultivo. Por lo tanto, la zona de medición puede localizarse en o más cerca del centro del frasco o vaso que los extremos del frasco o vaso (por ejemplo, dentro del 50 % intermedio del vaso).

La detección y/o identificación del o los microorganismos de interés se consigue solamente cuando el microorganismo o los microorganismos se unen en el sedimento como parte de un complejo de miembro de unión-microorganismo-partícula indicadora. Es decir, no se genera ninguna señal cuando el o los microorganismos no están presentes en la

muestra de cultivo microbiológico o, si están presentes, el microorganismo no tiene un epítipo reconocido por el miembro de unión asociado con la partícula indicadora. En dichas circunstancias, las partículas indicadoras no están sustancialmente presentes en la zona de medición.

5 Si no se observa ninguna señal de SERS significativa tras la aplicación de un campo magnético y la exploración óptica del sedimento, las partículas magnéticas extraídas al sedimento pueden dispersarse de nuevo en solución para continuar interactuando con la muestra. Si está presente un microorganismo por debajo del límite de detección de la tecnología, entonces la concentración de microorganismo puede aumentarse a lo largo del tiempo a medida que crece el microorganismo en el medio de cultivo de modo que la señal de SERS se detecta en última instancia en la zona de medición tras la aplicación futura del campo magnético. En esencia, se forma un sedimento magnético, se explora ópticamente, se dispersa, se permite que interactúe con la muestra y después se vuelve a formar a una frecuencia específica hasta que se observa una señal a partir del complejo de miembro de unión-microorganismo-partícula indicadora o se determina que la muestra es negativa para el microorganismo de interés. La agitación del vaso de cultivo en diversos estadios a lo largo de este proceso puede desempeñar un papel crítico. La agitación cumple una diversidad de fines. En primer lugar, asegura la mezcla de las partículas magnéticas y de SERS con la muestra y el medio de cultivo lo que permite la formación de complejos de miembro de unión-microorganismo-partícula indicadora. En segundo lugar, permite la dispersión de las partículas magnéticas de nuevo en solución una vez que el sedimento se ha formado. En tercer lugar, en una disposición preferida, se puede realizar agitación mientras se aplica el campo magnético. La agitación durante la aplicación del campo magnético lleva fluido de diversos puntos espaciales dentro del vaso de cultivo a la región del campo magnético localizado, asegurando que se recojan partículas magnéticas de regiones de la muestra fuera del campo magnético localizado. Finalmente, en muestras que contienen partículas (por ejemplo resinas, carbón o carbonato cálcico), la agitación antes de y durante la sedimentación puede limitar el número de estas partículas que sedimentan en la región de detección e interfieren con la señal óptica. Diferentes perfiles y velocidad de agitación pueden ser óptimos para cada una de estas funciones diferentes.

25 Por ejemplo, pueden usarse diferentes velocidades de agitación (es decir, frecuencia) y "alcance" (es decir, desplazamiento del vial a lo largo de un eje) en diferentes fases de un ciclo de medición. En una disposición ejemplar, un ciclo de medición puede incluir mezclado, dispersión presedimentación, sedimentación, lectura y dispersión, teniendo cada fase una velocidad de agitación y alcance particulares. A este respecto, el mezclado incluye la fase en la que se realiza agitación durante la incubación, mientras que la dispersión presedimentación se realiza después de mezclar y antes de sedimentar. La sedimentación se realiza después de la dispersión presedimentación y se sigue de la fase de lectura. La fase de lectura corresponde a la exploración de los viales por la cabeza de lectura, mientras que la fase de dispersión se proporciona para que el sedimento se redisperse dentro del vial. Puede haber o no retardos entre fases. En una disposición, la velocidad de agitación y alcance para las fases pueden variar de aproximadamente 0 a 3 Hz y de aproximadamente 0 a 100 mm, respectivamente. Por ejemplo, las siguientes velocidades de agitación y alcances pueden usarse de acuerdo con disposición: mezclado - aproximadamente 0,5 a 1,5 Hz y 25 a 75 mm; dispersión presedimentación - aproximadamente 1 a 2 Hz y 25 a 75 mm; sedimentación - aproximadamente 0,5 a 2 Hz y 25 a 75 mm; lectura - 0 Hz y 0 mm; y dispersión - aproximadamente 1 a 2 Hz y aproximadamente 25 a 75 mm. Además, el periodo de tiempo particular para cada fase también puede variarse. Por ejemplo, la fase de mezclado puede ser significativamente más larga (por ejemplo, de aproximadamente 5 a 60 minutos) que las fases de dispersión presedimentación, sedimentación, lectura y dispersión (por ejemplo, de aproximadamente 5 a 120 segundos por fase).

La Figura 23 muestra un ejemplo de la intensidad de señal de SERS dependiente del tiempo de complejos de miembro de unión-microorganismo-partícula indicadora capturados por partículas de captura magnética para *Salmonella*. En general, el comienzo de la pendiente ascendente de la señal de SERS puede ser indicativo de la presencia del microorganismo. A este respecto, después de aproximadamente 6 horas de tiempo de cultivo, la presencia de microorganismo puede indicarse, mientras que el pico a las aproximadamente 9 horas indica una mayor concentración de microorganismos. Sin embargo, como se muestra también en la Figura 23, en la pendiente descendente de la señal de SERS, los microorganismos pueden seguir presentes, tal como a aproximadamente 12 horas. En este caso, la pendiente descendente también puede significar la presencia de un microorganismo, que puede proporcionar un medio útil para identificar la positividad en ciertos casos, tal como cuando está presente un gran número de microorganismos al comienzo de la incubación. Como tal, bien una pendiente ascendente o bien una pendiente descendente en la señal de SERS puede ser indicativa de la presencia de un microorganismo en la muestra de cultivo. A este respecto, pueden tomarse lecturas periódicamente a lo largo del tiempo durante el período de incubación para identificar dichos cambios en la señal de SERS.

B. Partículas indicadoras

Las "partículas indicadoras", como se usa en el presente documento, puede ser cualquier partícula que sea capaz de producir una señal que pueda detectarse directamente en la muestra de cultivo sin retirar la muestra, tal como para realizar etapas de lavado. Por ejemplo, las partículas indicadoras pueden producir cualquier señal óptica (por ejemplo, fluorescencia o Raman o una imagen óptica) cuando se exploran (por ejemplo, con una fuente de luz). Los ejemplos de partículas indicadoras incluyen partículas SERS activas, puntos cuánticos, fluoróforos de infrarrojo cercano o partículas fluorescentes de infrarrojo cercano.

La "dispersión de Raman potenciada en superficie" o "SERS" se refiere al fenómeno que se produce cuando la señal

de dispersión de Raman o la intensidad es potenciada cuando se adsorbe una molécula Raman activa en o en proximidad estrecha a, por ejemplo, aproximadamente 50 Å de la superficie de ciertos metales (por ejemplo, oro o plata). En dichas circunstancias, la intensidad de la señal de Raman que surge de la molécula Raman activa puede potenciarse. "Dispersión de Raman de resonancia potenciada en superficie" o "SERRS" se refiere a una señal de SERS aumentada que se produce cuando la molécula indicadora en proximidad estrecha a una superficie de nanopartícula SERS activa está en resonancia con la longitud de onda de excitación. "Dispersión de Raman" se refiere en general a la dispersión inelástica de un fotón que incide en una molécula. Los fotones que se dispersan de forma inelástica tienen una frecuencia óptica (ν_i), que es diferente de la frecuencia de la luz incidente (ν_0). La diferencia de energía (ΔE) entre la luz incidente y la luz dispersada inelásticamente puede representarse como $(\Delta E) = h|\nu_0 - \nu_i|$, en la que h es la constante de Planck, y corresponde a energías que son absorbidas por la molécula. La radiación incidente puede ser de cualquier frecuencia ν_0 , pero típicamente es radiación monocromática de la región espectral visible o de infrarrojo cercano. La diferencia absoluta $|\nu_0 - \nu_i|$ es una frecuencia infrarroja, por ejemplo, vibracional. La frecuencia ν_1 de la radiación "con dispersión de Raman" puede ser mayor o menor que ν_0 , pero la cantidad de luz con frecuencia $\nu_1 < \nu_0$ (radiación de Stokes) es mayor que con la frecuencia $\nu_1 > \nu_0$ (radiación anti Stokes).

Como se usa en el presente documento, el término "radiación" se refiere a energía en forma de radiación electromagnética que puede inducir dispersión de Raman potenciada en superficie en una muestra que se ensaya, por ejemplo, una muestra que comprende una nanopartícula SERS activa que tiene una o más moléculas indicadoras SERS activas asociadas con las mismas. Más particularmente, el término "radiación" se refiere a energía en forma de radiación electromagnética que provoca que la superficie de una nanopartícula induzca, emita, soporte o de otro modo provoque dispersión de la luz, por ejemplo, dispersión de Raman, en una molécula indicadora próxima a la superficie de la nanopartícula.

Como se usa en el presente documento, una "molécula indicadora" se refiere a cualquier molécula o compuesto químico que sea capaz de producir un espectro de Raman cuando se ilumina con radiación de una longitud de onda apropiada. Una "molécula indicadora" también puede denominarse en el presente documento "marcador", "colorante", "molécula Raman activa" o "molécula SERS activa", cada una de las cuales puede usarse indistintamente.

Un experto habitual en la materia apreciaría que una diversidad de moléculas pueden actuar como moléculas indicadoras de SERS. Por ejemplo, también pueden usarse algunas moléculas colorantes fluorescentes como moléculas indicadoras de SERS. Véase, por ejemplo, Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 12/134.594 de Thomas *et al.*, presentada el 6 de junio de 2008 y Solicitud de Patente Internacional de PCT n.º PCT/US2008/066023 de Thomas *et al.*, presentada el 6 de junio de 2008, cada uno de los cuales se incorpora por referencia en su totalidad. En general, las moléculas adecuadas para su uso como moléculas indicadoras de SERS pueden ser una molécula pequeña, una molécula grande o una molécula compleja, aunque no es necesario que la molécula sea compleja para actuar como una molécula indicadora de SERS. Las moléculas indicadoras de SERS, en algunas disposiciones, pueden tener al menos un anillo aromático. Además, sin desear quedar ligado a ninguna teoría particular, se requiere un cambio de la capacidad de polarización de un enlace para actividad de Raman. Además, las moléculas simétricas tienden a mostrar señales de Raman específicas y fuertes. Provechosamente, una molécula indicadora muestra una sección transversal de dispersión de Raman alta y una identificación espectral bien caracterizada.

Una nanopartícula SERS activa, como se denomina en el presente documento, incluye una nanopartícula que tiene una superficie que induce, provoca o de otro modo soporta una dispersión de la luz de Raman potenciada en superficie (SERS) o dispersión de la luz de Raman de resonancia potenciada en superficie (SERRS). Varias superficies son capaces de producir una señal de SERS, incluyendo superficies rugosificadas, superficies texturizadas y otras superficies, incluyendo superficies lisas.

Una partícula indicadora SERS activa adecuada para su uso con los ensayos desvelados por la presente incluye un núcleo, que induce el efecto de Raman, y puede incluir además una o más capas y tipos de materiales SERS activos localizados en la superficie externa del núcleo, y opcionalmente un encapsulante que encapsula parcial o completamente el núcleo o los materiales SERS activos.

Las Figuras 19-21 muestran diversos ejemplos de partículas indicadoras SERS activas. La Figura 19 muestra una partícula indicadora SERS activa 20 con una única nanopartícula SERS activa 21 como núcleo, que tiene una molécula indicadora 22 localizada en la superficie externa del núcleo de la nanopartícula y una capa de sílice 23 que encapsula completamente el núcleo y la molécula indicadora. Dichas partículas indicadoras SERS activas se describen en la Patente de Estados Unidos n.º 6.514.767 de Natan, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Como se usa en el presente documento, el término "nanopartícula", se refiere a una partícula que tiene al menos una dimensión en el intervalo de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 1000 nm, incluyendo cualquier valor de número entero entre 1 nm y 1000 nm (incluyendo aproximadamente 1, 2, 5, 10, 20, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500 y 1000 nm). En algunas disposiciones, el núcleo de la partícula indicadora SERS activa es una nanopartícula metálica. En algunas disposiciones, la partícula indicadora SERS activa es una partícula esférica o una partícula sustancialmente esférica que tiene un diámetro entre 2 nm y aproximadamente 200 nm (incluyendo aproximadamente 2, 5, 10, 20, 50, 60, 70, 80, 90, 100 y 200 nm). En algunas disposiciones, la partícula indicadora SERS activa tiene un

diámetro entre aproximadamente 2 nm y aproximadamente 100 nm (incluyendo aproximadamente 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 nm) y en algunas disposiciones, entre aproximadamente 20 nm y 100 nm (incluyendo aproximadamente 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y 100 nm).

Las partículas indicadoras SERS activas adecuadas para su uso con los ensayos desvelados por la presente también pueden incluir un núcleo que comprende dos o más nanopartículas. La Figura 20 muestra una partícula indicadora SERS activa 30 con una primera nanopartícula SERS activa 31 y una segunda nanopartícula SERS activa 32 en el núcleo, que tiene una molécula indicadora 33 localizada entre la primera nanopartícula SERS activa 31 y la segunda nanopartícula SERS activa 32. Dichas partículas indicadoras SERS activas se describen en la Patente de Estados Unidos n.º 6.861.263 de Natan, que se incorpora en el presente documento por diferencia en su totalidad. Véase también, para otro ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2003/0232388 de Kreimer *et al.*, publicado el 18 de diciembre de 2003, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Por lo tanto, el núcleo de una partícula indicadora SERS activa puede incluir una única nanopartícula o puede incluir múltiples nanopartículas agregadas juntas. Dichos agregados pueden también encapsularse como se desvela adicionalmente en el presente documento.

El núcleo de una partícula indicadora SERS activa adecuada para su uso con los métodos desvelados por la presente típicamente comprende al menos un metal, es decir, al menos un elemento seleccionado de la Tabla Periódica de los Elementos que se conoce habitualmente como un metal. Los metales adecuados incluyen metales del Grupo 11, tales como Cu, Ag y Au, o cualquier otro metal que los expertos en la materia sepan que soporta SERS, tal como metales alcalinos. En algunas disposiciones, la nanopartícula del núcleo sustancialmente comprende un único elemento metálico. Por ejemplo, la preparación de nanopartículas de oro se describe en Frens, G., *Nat. Phys. Sci.*, 241, 20 (1972). En otras disposiciones, la nanopartícula del núcleo comprende una combinación de al menos dos elementos, tal como una aleación, por ejemplo, una aleación binaria. En algunas disposiciones, la nanopartícula del núcleo es magnética.

En otras disposiciones, el núcleo de una partícula indicadora SERS activa incluye dos componentes en los que un primer material forma un núcleo interno que está rodeado por una cubierta formada a partir de un segundo material, tal como en una partícula de núcleo-cubierta de $\text{Au}_2\text{S}/\text{Au}$. La Figura 21 muestra dicha partícula indicadora SERS activa 40 con un núcleo interno 41 de Au_2S rodeado por una cubierta externa 42 formada a partir de Au como un núcleo, que tiene una capa de molécula indicadora 43 localizada en la superficie externa del núcleo y una capa de sílice 44 que encapsula completamente el núcleo y la capa de molécula indicadora. Se ha indicado que las partículas de núcleo-cubierta de $\text{Au}_2\text{S}/\text{Au}$ tienen resonancia óptica de IR cercano ampliamente ajustable. Véase Averitt, R. D., *et al.*, "Ultrafast optical properties of gold nanoshells," *JOSA B*, 16(10), 1824-1832 (1999). Además, pueden usarse las partículas de núcleo de Ag/cubierta de Au, tales como las descritas en Cao, Y. W., *et al.*, "DNA-modified core-shell Ag/Au nanoparticles," *J. Am. Chem. Soc.*, 123(32), 7961-7962 (2001) o partículas de núcleo de Au/cubierta de Ag o cualquier combinación de núcleo-cubierta que implique metales SERS activos. Otras combinaciones adecuadas para su uso en partículas de núcleo-cubierta también son adecuadas para su uso con la materia objeto desvelada por la presente, incluyendo coloides de alúmina/sílice funcionalizados con Au o Ag, coloides TiO_2 funcionalizados con Au o Ag, nanopartículas de Au recubiertas con nanopartícula de Au (véase, por ejemplo, Mucic, *et al.*, "DNA-directed synthesis of binary nanoparticle network materials," *J. Am. Chem. Soc.*, 120(48), 12674 (1998)); coloides de TiO_2 recubiertos con nanopartícula de Au; y partículas que tienen un núcleo de Si con una cubierta metálica (es decir "nanocubiertas"), tales como coloides de SiO_2 recubiertos con plata o coloides de SiO_2 recubiertos con oro. Véase, por ejemplo, Jackson, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(52): 17930-5 (2004); véase también Patentes de Estados Unidos n.º 6.34.272 y 6.685.986 de Oldenburg *et al.*, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Se ha descrito el uso de dichas nanocubiertas en aplicaciones biosensibles. Véase Patente de Estados Unidos n.º 6.699.724 de West *et al.*, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Otra clase de nanopartículas adecuada para su uso como un núcleo de una nanopartícula indicadora SERS activa incluye nanopartículas que tienen una superficie interna. Dichas nanopartículas incluyen partículas huecas y nanocristales huecos o nanopartículas porosas o semiporosas. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 6.913.825 de Ostafin *et al.*, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. En algunas disposiciones, el núcleo/cubierta y las nanopartículas que tienen una superficie interna pueden mostrar una señal de SERS mejorada.

Aunque se reconoce que la forma y la relación de aspecto de las partículas pueden afectar a las características físicas, ópticas y electrónicas de las nanopartículas, la forma específica, la relación de aspecto o la presencia/ausencia del área de superficie interna no influyen en la clasificación de una partícula como una nanopartícula. En consecuencia, las nanopartículas adecuadas para su uso como núcleo de una partícula indicadora SERS activa pueden tener una diversidad de formas, tamaños y composiciones. Además, el núcleo de nanopartícula puede ser sólido, o en algunas disposiciones, como se ha descrito inmediatamente antes en el presente documento, hueco. Los ejemplos no limitantes de nanopartículas adecuadas para su uso como un núcleo incluyen nanobarras huecas o rellenas metálicas coloidales, nanopartículas magnéticas, paramagnéticas, conductoras o aislantes, partículas sintéticas, hidrogeles

(coloides o barras) y similares. Los expertos en la materia apreciarán que las nanopartículas pueden existir en una diversidad de formas, incluyendo pero sin limitación esferoides, varillas, discos, pirámides, cubos, cilindros, nanohélices, nanomuelles, nanoanillos, nanopartículas en forma de varilla, nanopartículas en forma de flecha, nanopartículas en forma de gota, nanopartículas en forma de tetrápodo, nanopartículas en forma de prisma y una pluralidad de formas geométricas y no geométricas adicionales.

Además, las nanopartículas adecuadas para su uso como un núcleo de una partícula indicadora SERS activa pueden ser isotrópicas o anisotrópicas. Como se indica en el presente documento, las nanopartículas anisotrópicas tienen una longitud y una anchura. En algunas disposiciones, la longitud de un núcleo de nanopartícula anisotrópica es la dimensión paralela a la apertura en la que se produjo la nanopartícula. En algunas disposiciones, el núcleo de nanopartícula anisotrópica tiene un diámetro (anchura) de aproximadamente 350 nm o menos. En otras disposiciones, el núcleo de nanopartícula anisotrópica tiene un diámetro (anchura) de aproximadamente 250 nm o menos y en algunas disposiciones, un diámetro (anchura) de aproximadamente 100 nm o menos. En algunas disposiciones, la anchura del núcleo de nanopartícula anisotrópica está entre aproximadamente 15 nm y aproximadamente 300 nm. Además, en algunas disposiciones, el núcleo de nanopartícula anisotrópica tiene una longitud, en el que la longitud está de entre aproximadamente 10 nm y 350 nm.

Mucha de la bibliografía de SERS (tanto experimental como teórica) sugiere que las partículas anisotrópicas (varillas, triángulos, prismas) pueden proporcionar un aumento de la potenciación de la señal de Raman en comparación con esferas. Por ejemplo, el denominado "efecto antena" predice que se espera que la potenciación de Raman sea mayor en áreas de mayor curvatura. Se han descrito recientemente muchos informes de partículas anisotrópicas, incluyendo prismas de plata (Ag) y partículas de oro (Au) "ramificadas".

Pueden producirse nanovarillas de Au y Ag anisotrópicas por electrodeposición en moldes de alúmina preformados, de una manera similar a la producción de partículas de Nanobarcodes® (Oxonica Inc., Mountain View, California). Véase, por ejemplo, Nicewarner-Pena, S. R., *et al.*, "Submicrometer metallic barcodes", *Science*, 294, 137-141 (2001); Walton, I. D., *et al.*, "Particles for multiplexed analysis in solution: detection and identification of striped metallic particles using optical microscopy", *Anal. Chem.* 74, 2240-2247 (2002). Estas partículas pueden prepararse por la deposición de capas alternantes de materiales, típicamente Au y Ag, en moldes de alúmina preformados, y pueden tener un diámetro de aproximadamente 250 nm y una longitud de aproximadamente 6 micrómetros.

Las partículas indicadoras SERS activas también adecuadas para su uso en los métodos desvelados por la presente incluyen nanoestructuras compuestas, por ejemplo, estructuras de satélite y estructuras de núcleo-cubierta, como se desvela en la Solicitud de Patente Internacional de PCT n.º PCT/US2008/057700 de Weidemaier *et al.*, presentada el 20 de marzo de 2008, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Una ventaja de las disposiciones de ensayos de SERS y dispositivos para detectar microorganismos en muestras de cultivo es la diversidad de nanopartículas SERS activas que pueden prepararse, teniendo cada una una identificación de SERS única. Las partículas indicadoras SERS activas representativas útiles para los métodos desvelados por la presente incluyen, pero sin limitación, partículas indicadoras SERS activas de Oxonica Inc. (Mountain View, California). Dichas partículas indicadoras SERS activas incluyen un núcleo de nanopartícula marcado con moléculas indicadoras de SERS y encapsulado en una cubierta de vidrio.

Las moléculas indicadoras no limitantes, representativas, incluyen 4,4'-dipiridil (DIPY), D8-4,4'-dipiridil (d8DIPY), trans-1,2-bis(4-piridil)-etileno (BPE) y 2-quinolinetiol (QSH), cada uno de los cuales se han desvelado como colorantes indicadores Raman activos útiles en la Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2006/0038979 de Natan *et al.*, publicada el 23 de febrero de 2006, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Los ejemplos no limitantes adicionales de moléculas indicadoras adecuadas para los métodos desvelados por la presente incluyen 1,2-dil(4-piridil)acetileno (BPA), 4-azobis(piridina) (4-AZP), GM19, 1-(4-piridil)-1-ciano-2-(2-fluoro-4-piridil)-etileno (CNFBPE), 1-ciano-1-(4-quinolinil)-2-(4-piridil)-etileno (CQPE), colorante 10 y 4-(4-hidroxifenilazo)piridina (136-7). Un espectro de SERS representativo de nanopartículas SERS activadas marcadas con 4,4'-dipiridil (DIPY) se proporciona en la Figura 22. Como se muestra en la Figura 22, la molécula de colorante de DIPY tiene un pico dominante a aproximadamente 1601 cm⁻¹.

Las partículas indicadoras SERS activas adecuadas para su uso con los métodos desvelados por la presente incluyen, pero sin limitación, núcleos de nanopartículas que comprenden una molécula indicadora activa en dispersión de Raman potenciada en superficie (SERS) desvelada en la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 12/134.594 de Thomas *et al.*, presentada el 6 de junio de 2008 y Solicitud de Patente Internacional de PCT n.º PCT/US2008/066023 de Thomas *et al.*, presentada el 6 de junio de 2008, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad y la diversidad de partículas indicadoras SERS activas desveladas en la Solicitud de Patente Internacional de PCT n.º PCT/US2008/057700 de Weidemaier *et al.*, presentada el 20 de marzo de 2008, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

En algunas disposiciones, la partícula indicadora SERS activa comprende un encapsulante. Las nanopartículas SERS activas tienen una tendencia a agregarse en solución acuosa y una vez agregadas son difíciles de redispersar. Además, la composición química de algunas moléculas Raman activas es incompatible con las químicas usadas para

unir otras moléculas, tales como proteínas, con nanopartículas metálicas. Estas características pueden limitar la elección de molécula Raman activa, químicas de unión y otras moléculas para unir con la nanopartícula metálica. En consecuencia, en algunas disposiciones, los métodos desvelados por la presente comprenden partículas indicadoras SERS activas en las que la molécula indicadora cuando se fija, por ejemplo, se adsorbe o se une covalentemente con un núcleo de nanopartícula, puede recubrirse o encapsularse, por ejemplo, en una cubierta, de un material diferente, incluyendo un material dieléctrico, tal como un polímero, vidrio, metal, óxidos metálicos tales como TiO_2 y SnO_2 , sulfuros metálicos o un material cerámico. Se describen métodos para preparar dichas partículas indicadoras SERS activas en la Patente de Estados Unidos n.º 6.514.767 de Natan, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

El grosor del encapsulante puede variarse dependiendo de las propiedades físicas requeridas de la partícula indicadora SERS activa. Dependiendo de la combinación particular de núcleo de nanopartícula, encapsulante y colorante, los recubrimientos espesos de encapsulante, por ejemplo, recubrimientos de aproximadamente un micrómetro o más, podrían atenuar potencialmente la señal de Raman. Además, un recubrimiento fino podría conducir a interferencia en el espectro de Raman del microorganismo asociado por las moléculas en la superficie de encapsulante. Al mismo tiempo, las propiedades físicas, tales como el coeficiente de sedimentación pueden verse afectadas por el grosor del encapsulante. En general, cuanto más grueso sea el encapsulante, más eficaz será la inmovilización de los colorantes SERS activos del núcleo de nanopartícula metálica del disolvente circundante.

En disposiciones en las que el encapsulante es vidrio, el grosor del vidrio típicamente puede variar de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 70 nm. En disposiciones ejemplares, no limitantes, las partículas indicadoras SERS activas comprenden nanopartículas de oro que tienen un diámetro que varía de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 100 nm encapsuladas en una esfera de vidrio que tiene un grosor que varía de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 65 nm, en algunas disposiciones, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 50 nm; en algunas disposiciones, de aproximadamente 15 nm a aproximadamente 40 nm; y, en algunas disposiciones, aproximadamente 35 nm. La optimización de las dimensiones de las partículas indicadoras SERS activas desveladas por la presente puede conseguirse por un experto en la materia.

Además, las partículas indicadoras SERS activas que comprenden colorantes SERS activos pueden funcionalizarse con una molécula, tal como un miembro de unión específica de un par de unión, que puede unirse con un microorganismo diana. Tras la unión del microorganismo diana, la señal de SERS de la molécula indicadora SERS activa cambia de tal modo que podrá determinarse la presencia o cantidad del microorganismo diana. El uso de una partícula indicadora SERS activa funcionalizada tiene varias ventajas frente a una partícula indicadora no funcionalizada. En primer lugar, el grupo funcional proporciona un grado de especificidad por la partícula indicadora proporcionando una interacción específica con un microorganismo diana. En segundo lugar, no es necesario que el microorganismo diana sea Raman activo en sí mismo; su presencia puede determinarse observando cambios en la señal de SERS del colorante Raman activo unido al núcleo de nanopartícula. Dichas mediciones se denominan en el presente documento "detección indirecta", en la que la presencia o ausencia de un microorganismo diana en una muestra de cultivo se determina detectando una señal de SERS que no surge directamente del microorganismo de interés.

En otras disposiciones, la partícula indicadora SERS activa comprende una nanopartícula SERS activa como un núcleo, sin ninguna molécula indicadora o encapsulante presente. La superficie del núcleo puede funcionalizarse con una molécula, tal como un miembro de unión específica de un par de unión, que puede unirse con un microorganismo diana. Tras la unión del microorganismo diana, el espectro de SERS del microorganismo diana en sí mismo se detecta para confirmar la presencia o cantidad del microorganismo diana. Dichas mediciones se denominan en el presente documento "detección directa", en la que la presencia o ausencia de un microorganismo diana en una muestra de cultivo sanguíneo se determina detectando una señal de SERS que surge directamente del microorganismo de interés.

Las partículas indicadoras SERS activas pueden funcionalizarse para unirse con un analito diana de al menos dos formas diferentes. En algunas disposiciones, la molécula indicadora SERS activa, es decir, el colorante SERS activo, puede conjugarse con un miembro de unión específica de un par de unión, mientras que en otras disposiciones, un miembro de unión específica de un par de unión puede unirse directamente con el núcleo de nanopartícula. En disposiciones en las que el núcleo de nanopartícula está al menos parcialmente rodeado por una cubierta encapsulante, el miembro de unión puede unirse con una superficie externa de la cubierta encapsulante.

C. Miembros de unión específica

Como se usa en el presente documento, la expresión "miembro de unión específica" y derivaciones gramaticales de la misma, se refiere a una molécula para la que existe al menos una molécula de unión complementaria, separada. Un miembro de unión específica es una molécula que se une, se fija o se asocia de otro modo con una molécula específica, por ejemplo, un microorganismo de interés. Cuando un miembro de unión específica de un tipo particular se une con un tipo particular de molécula, los miembros de unión específica se denominan "par de unión específica". Por ejemplo, un anticuerpo se unirá específicamente con un antígeno. En consecuencia, "par de unión específica" se refiere a dos moléculas diferentes, en las que una de las moléculas mediante medios físicos o químicos se une específicamente con la segunda molécula. En este sentido, un microorganismo que se ensaya es un miembro

recíproco de un par de unión específica. Se proporcionan en el presente documento posteriormente miembros de unión representativos adecuados para su uso con microorganismos particulares que se ensayan.

Además, los pares de unión específica pueden incluir miembros que son análogos de los compañeros de unión específica originales, por ejemplo, un análogo de analito que tenga una estructura similar al analito. Por "similar" se entiende que, por ejemplo, un análogo de analito tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 60 % o 65 % de identidad de secuencia, aproximadamente 70 % o 75 % de identidad de secuencia, aproximadamente 80 % u 85 % de identidad de secuencia, aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos de analito usando programas de alineamiento y parámetros convencionales bien conocidos en la técnica. Un análogo de un analito puede tener también la misma función que un analito.

Un miembro de unión específica, cuando se conjuga, por ejemplo, con una partícula indicadora SERS activa, interacciona con un microorganismo específico que se ensaya de una manera capaz de producir una señal de Raman detectable diferenciable de cuando un microorganismo particular está presente o ausente, o cuando un microorganismo particular está presente en diversas concentraciones a lo largo del tiempo.

La expresión "producir una señal detectable" se refiere a la capacidad de reconocer la presencia de un grupo indicado o un cambio en una propiedad de un grupo indicador, por ejemplo, moléculas indicadoras SERS activas, de una manera que permite la detección del complejo de miembro de unión-microorganismo. Además, la producción de una señal detectable puede ser reversible o no reversible. El acontecimiento productor de señal incluye medios continuos, programados y episódicos incluyendo aplicaciones de una sola vez o reutilizables. El acontecimiento productor de señal reversible puede ser instantáneo o puede depender del tiempo, siempre que se establezca una correlación con la presencia o concentración del analito.

La unión, fijación o asociación entre el miembro de unión específica y, por ejemplo, un microorganismo, puede ser química o física. El término "afinidad" se refiere a la fuerza de atracción entre un miembro de unión y otro miembro de un par de unión en un sitio de unión particular. El término "especificidad" y derivaciones del mismo, se refiere a la probabilidad de que un miembro de unión se una preferentemente con el otro miembro pretendido de un par de unión (la diana a diferencia de los otros componentes en la muestra). Dicha unión entre un miembro de unión, por ejemplo, una proteína de unión, y otro miembro de unión de un par de unión, por ejemplo, un ligando o analito, puede ser reversible.

Además, como se desvela en la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 12/134.594 de Thomas *et al.*, presentada el 6 de junio de 2008, y Solicitud de Patente Internacional de PCT n.º PCT/US2008/066023 de Thomas *et al.*, presentada el 6 de junio de 2008, cada una de las cuales se incorpora por referencia en su totalidad, en algunas disposiciones, puede usarse un enlazador de polietilenglicol (PEG) para unir un miembro de unión específica con una partícula indicadora SERS activa, una partícula de captura magnética, o un soporte sólido. En los métodos desvelados por la presente, una molécula enlazadora, por ejemplo, PEG, también puede usarse para unir un miembro de unión específica con una partícula indicadora SERS activa, o una partícula de captura magnética. El uso de un enlazador de PEG puede reducir la unión no específica en los ensayos desvelados por la presente. La eliminación de adsorción no específica puede ser un reto significativo para el rendimiento de ensayo. Por ejemplo, en ensayos de captura magnética, la unión no específica puede incluir el proceso en el que proteínas u otras biomoléculas de solución se adhieren a las superficies de la partícula de captura magnética o partícula indicadora SERS activa que presenta miembros de unión para el analito diana o el proceso por el que las superficies de la partícula de captura magnética y nanopartícula SERS activa se adhieren entre sí mediante interacciones no específicas. En algunas disposiciones, el enlazador de PEG comprende una molécula de PEG bifuncional que tiene un grupo funcional en uno de los extremos terminales de la molécula lineal, separada por dos o más subunidades de etilenglicol. En algunas disposiciones, la molécula de PEG comprende entre 2 y aproximadamente 1000 subunidades de etilenglicol. En disposiciones particulares, el enlazador de PEG comprende al menos 12 subunidades de etilenglicol. Además, el enlazador de PEG puede caracterizarse por tener un peso molecular de aproximadamente 200 Da a aproximadamente 100.000 Da.

Dependiendo del miembro de unión, un experto habitual en la materia reconocería tras la revisión de la materia objeto desvelada por la presente que pueden usarse enlazadores distintos de PEG. Por ejemplo, pueden usarse alcanotioles como enlazadores para anticuerpos y péptidos. Pueden usarse alcanotioles de cadena corta, incluyendo, pero sin limitación, N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA) y N-succinimidil-S-acetiltiopropionato (SATP) como enlazadores después de la desprotección de sulfhidrilo. Otras propiedades también pueden determinar la elección de enlazador, tal como la longitud de la cadena enlazadora. Por ejemplo, PEG puede ser deseable porque también actúa para proteger la superficie del reactivo y es flexible, lo que puede potenciar la capacidad del reactivo para unirse con el analito de interés.

En algunas disposiciones, el miembro de unión específica es una inmunoglobulina, también denominada en el presente documento anticuerpo, que comprende una región de unión a antígeno que se une con antígenos en el microorganismo diana o secretados por el mismo.

Los anticuerpos y fragmentos de los mismos adecuados para su uso en los métodos y dispositivos desvelados por la

presente pueden ser de origen natural o derivar de forma recombinante y pueden incluir, pero sin limitación, anticuerpos policlonales, monoclonales, multispecíficos, humanos, humanizados, primatizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos de unión a epítipo, por ejemplo, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs, Fv monocatenarios (scFv), Fv con enlaces disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden un domino ligero variable (VL) o pesado variable (VH), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab y anticuerpos antiidiotípicos (anti Id). En todos los casos, el anticuerpo o fragmento del mismo tendrá una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) específicas para el antígeno diana. Para fines de la divulgación, una "región determinante de complementariedad de un anticuerpo" es la parte de un anticuerpo que se une con un epítipo, incluyendo cualquier región marco conservada necesaria para dicha unión, y que puede estar comprendida por un subconjunto de restos de aminoácidos codificados por las regiones V, D y J de cadena pesada humana, las regiones V y J de cadena ligera humana y/o combinaciones de las mismas.

Los expertos en la materia pueden realizar cualquiera de dichos derivados de anticuerpo usando técnicas reconocidas en este campo convencionales. Por ejemplo, Jones *et al.* (1986) Nature 321: 522-525 desvela el reemplazo de las CDR de un anticuerpo humano con las de un anticuerpo de ratón. Marx (1985) Science 229: 455-456 analiza anticuerpos quiméricos que tienen regiones variables de ratón y regiones constantes humanas. Rodwell (1989) Nature 342: 99-100 analiza elementos de reconocimiento de menor peso molecular derivados de la información de CDR de anticuerpos. Clackson (1991) Br. J. Rheumatol. 3052: 36-39 analiza anticuerpos monoclonales modificados por ingeniería genética, incluyendo derivados de fragmentos Fv, anticuerpos monocatenarios, proteínas de fusión, anticuerpos quiméricos y anticuerpos de roedor humanizados. Reichman *et al.* (1988) Nature 332: 323-327 desvela un anticuerpo humano en el que se han injertado regiones hipervariables de rata. Verhoeyen *et al.* (1988) Science 239: 1534-1536 enseña el injerto de un sitio de unión a antígeno de ratón en un anticuerpo humano.

D. Partículas de captura magnética

Las partículas de captura magnética adecuadas para su uso con las disposiciones desveladas por la presente pueden comprender de aproximadamente 15 % a aproximadamente 100 % de material magnético tal como, por ejemplo, magnetita, incluyendo aproximadamente 15 % de magnetita, aproximadamente 20 % de magnetita, aproximadamente 25 % de magnetita, aproximadamente 30 % de magnetita, aproximadamente 35 % de magnetita, aproximadamente 40 % de magnetita, aproximadamente 45 % de magnetita, aproximadamente 50 % de magnetita, aproximadamente 55 % de magnetita, aproximadamente 60 % de magnetita, aproximadamente 65 % de magnetita, aproximadamente 70 % de magnetita, aproximadamente 75 % de magnetita, aproximadamente 80 % de magnetita, aproximadamente 85 % de magnetita, aproximadamente 90 % de magnetita, aproximadamente 95 % de magnetita, y cualquier número entero entre aproximadamente 15 % y aproximadamente 100 %. Además, las partículas de captura magnética pueden tener un diámetro que varía de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 12 micrómetros. En algunas disposiciones, las partículas de captura magnética tienen un diámetro que varía de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 8 micrómetros. En otras disposiciones, las partículas de captura magnética tienen un diámetro que varía de aproximadamente 800 nm a aproximadamente 4 micrómetros. En otras disposiciones más, las partículas de captura magnética tienen un diámetro que varía de aproximadamente 1,6 micrómetros a aproximadamente 3,5 micrómetros, incluyendo pero sin limitación, aproximadamente 1,6, aproximadamente 1,7, aproximadamente 1,8, aproximadamente 1,9, aproximadamente 2,0, aproximadamente 2,1, aproximadamente 2,2, aproximadamente 2,3, aproximadamente 2,4, aproximadamente 2,5, aproximadamente 2,6, aproximadamente 2,7, aproximadamente 2,8, aproximadamente 2,9, aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,1, aproximadamente 3,2 y aproximadamente 3,3, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,5 y aproximadamente 4,5 micrómetros. Pueden obtenerse partículas representativas adecuadas para su uso como partículas de captura magnética de Bangs Laboratories, Inc. (Fishers, Indiana), Life Technologies (Carlsbad, CA), o Polyscience Laboratories (Warrington, Pensilvania).

Puede conseguirse captura magnética de las partículas usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, colocación de un imán fuerte o inducción de un campo magnético en un área localizada del vaso de ensayo. El campo magnético localizado puede inducirse, por ejemplo, por uno o más imanes permanentes, electroimanes y/o materiales (por ejemplo, metales ferrosos) para conducir, restringir o centrar un campo magnético. Como se representa en la Figura 18, que representa una disposición, el imán 15 se usa para localizar los complejos de partícula de captura magnética-microorganismo-partícula indicadora SERS activa dentro de la zona de medición 9. La radiación incidente de una longitud de onda deseada, por ejemplo, un haz de láser, puede después centrarse en el sedimento de complejos de partícula de captura magnética concentrada-microorganismo-partícula indicadora SERS activa y la señal de SERS se obtiene de los complejos.

E. Sistema en tiempo real de supervisión del crecimiento en una muestra de cultivo microbiológico

La Figura 24 representa una disposición de un sistema en tiempo real 150 que proporciona supervisión en tiempo real del crecimiento de microorganismos en muestras de cultivo microbiológico para la detección automática de patógenos en muestras clínicas e industriales. El sistema 150 incluye un carrusel 152 que contiene una pluralidad de vasos de cultivo 154 dentro de un recinto de temperatura controlada. Por ejemplo, pueden usarse hasta 25 vasos de cultivo microbiológico. En esta disposición, los vasos 154 se colocan alrededor de la periferia de un carrusel 152, que rota para presentar cada vaso en una estación de sedimentación y lectura 156 en secuencia a una frecuencia programable (por ejemplo, una lectura cada 10-60 minutos). La estación de sedimentación y lectura 156 incluye un conjunto de

imán para formar un sedimento junto con una cabeza de lectura óptica que contiene filtros y lentes apropiados para epiluminación y recogida de señales. Por ejemplo, la iluminación puede proporcionarse por un láser estabilizado a longitud de onda de 785 nm y la señal recogida se detecta en un espectrómetro apropiado para espectroscopia de Raman. Después de sedimentar y leer una muestra dada, el carrusel 152 rota hasta presentar la siguiente muestra en el carrusel a la estación de sedimentación y lectura 156. La secuencia continúa hasta que todas las muestras en el carrusel 152 se leen, en cuyo punto el carrusel entra en un modo de giro en el que el carrusel rota continuamente hasta el siguiente ciclo de medición. El carrusel y la estación de sedimentación y lectura se montan en un brazo que se extiende desde una plataforma de balanceo. El movimiento de "balanceo equilibrado" resultante proporciona agitación mediante movimiento tanto lineal como de balanceo. La plataforma de balanceo actúa a una frecuencia seleccionada para todas las fases de un ciclo de mediciones, durante el transcurso del experimento. La agitación cumple múltiples fines. En primer lugar, desde el extremo de un ciclo de medición hasta el inicio del siguiente, asegura el mezclado de las partículas de SERS y magnéticas con la muestra y el medio de cultivo, permitiendo la formación de complejos de miembro de unión-microorganismo-partícula indicadora. En segundo lugar, después de haberse leído el sedimento, permite la dispersión de las partículas magnéticas de nuevo en solución. En tercer lugar, durante la sedimentación, la agitación porta partículas magnéticas en el fluido de diversos puntos espaciales dentro del vaso de muestra en la región del campo magnético localizado, lo que asegura que se recojan partículas magnéticas de regiones de la muestra fuera del campo magnético localizado. Finalmente, en muestras que contienen partículas (por ejemplo resinas, carbón o carbonato cálcico), la agitación antes y durante la sedimentación puede evitar que estas partículas se depositen en la región de detección e interfieran con la señal óptica. A medida que aumenta la concentración del organismo diana mediante el proceso de enriquecimiento, se produce detección e identificación del microorganismo por óptica, tal como tecnología de SERS, en cuanto la concentración del microorganismo alcance el umbral de detección de la tecnología. La capacidad de supervisar continuamente la señal de SERS durante el cultivo asegura que se use el tiempo de cultivo requerido mínimo y que el instrumento pueda alertar automáticamente al usuario cuando se detecte e identifique un patógeno o microorganismo.

La Figura 25 muestra otra disposición de un sistema 200 configurado para procesar una pluralidad de muestras. En esta disposición particular, cada una de las muestras de cultivo microbiológico se procesa en paralelo y se incuba dentro de la misma zona térmica. En esta disposición, los tubos de muestras se alinean en el mismo plano horizontal. El sistema 200 puede colocarse dentro de un recinto que forma la zona térmica.

Todas las muestras se agitan juntas durante las fases de unión de reactivo, sedimentación y dispersión del sedimento. En una disposición, después de la sedimentación, la agitación se detiene para todas las muestras, y estas se leen en sucesión. El procesamiento en paralelo requiere una disposición de muestras diferente que el carrusel usado en la primera configuración del sistema 150. Aquí, los tubos de muestra 202 se sitúan adyacentes entre sí en una bandeja plana 204. En esta disposición, la agitación es por reciprocidad lineal a lo largo del eje longitudinal de los tubos 202, que puede programarse para diferentes frecuencias y perfiles a lo largo del ensayo. Esto permite diferentes tipos y niveles de agitación para la formación de sedimentos, dispersión de sedimentos y fases de unión de reactivos. También permite detener la agitación para la lectura. La programación de diferente agitación en cada fase se hace posible por el enfoque de procesamiento de muestras en paralelo.

El sistema 200 mostrado en la Figura 25 incluye un conjunto de imán 206 que está configurado para girar en una posición adyacente a los tubos 202 para sedimentar y después alejarse girando de los tubos de muestra para exploración. Para la disposición del sistema 200 mostrada en la Figura 25, la exploración óptica puede realizarse con el conjunto de imán 206 alejado girando de los tubos de muestra 202 después de la formación de sedimentos para permitir el acceso de la cabeza de lectura óptica 208 a la zona de medición de los tubos de muestra. La retirada del conjunto de imán 206 es posible en esta configuración debido a que las muestras no se están agitando durante la lectura. Como alternativa, pueden disponerse un par de imanes de tal manera que proporcionen una ranura a través de la cual la cabeza de lectura 208 toma las lecturas, con los imanes mantenidos en posición después de la sedimentación. Por lo tanto, la cabeza de lectura 208 se configura para moverse a lo largo de la ranura entre los imanes para explorar cada tubo. Esto ofrece ventajas eliminando la necesidad de mover los imanes entre la sedimentación y la lectura de los tubos.

Las Figuras 26-29 ilustran otra disposición de un sistema 250 para supervisión automática y en tiempo real del crecimiento de microorganismos en muestras de cultivo. El sistema 250 se configura para procesar automáticamente uno o más ensayos diferentes simultáneamente. En general, el sistema 250 incluye una pluralidad de incubadores 252 en los que actúa un único conjunto de sedimentación/lectura 254 que se mueve detrás de los incubadores para actuar en (sedimentar y leer) cada bandeja 256 una cada vez en una zona de detección. Cada incubador 252 se configura para recibir una bandeja 256 que contiene una pluralidad de tubos de muestra 258. Cada bandeja 256 de tubos se configura para moverse desde el incubador 252 al conjunto de sedimentación/lectura 254 donde se forman sedimentos y se recogen datos en la zona de detección. El conjunto de sedimentación/lectura 254 comprende un conjunto de imán 260 para formar sedimentos y los componentes ópticos (por ejemplo, óptica de Raman, láser y espectrómetro) para recoger las señales ópticas.

En una disposición, el sistema 250 incluye una pluralidad de incubadores 252. Diversos ensayos pueden incubar muestras de cultivo a diferentes temperaturas. Por lo tanto, el sistema 250 puede incluir una pluralidad de zonas térmicas 262 (zonas de incubación) que pueden actuar a diferentes temperaturas, en el que cada zona incluye uno o

más incubadores. Los ensayos en cada incubador 252 se procesan simultáneamente, en el que cada incubador puede incluir una o más bandejas 256 que contiene uno o más tubos de muestras 258. Sin embargo, los tubos de muestra 258 pueden no procesarse necesariamente en un lote. A este respecto, cada tubo de muestras 258 puede colocarse en el incubador 252 en un momento diferente, teniendo de este modo un tiempo de inicio diferente para su periodo de ensayo. Los tubos de muestras 258 pueden exponerse todos al mismo ciclo de ensayo repetido durante sus periodos de ensayo. La mayoría de tubos de muestras 258 pueden introducirse juntos en lotes. Como se muestra en las Figuras 26 y 27, el sistema incluye cuatro incubadores 252 que se dividen en dos zonas térmicas 262. Las zonas térmicas 262 pueden disponerse verticalmente de modo que dos incubadores 252 se asocien con una zona térmica respectiva. Las zonas térmicas idénticas 262 se apilan verticalmente como se muestra en la Figura 27. Sin embargo, se entiende que las zonas térmicas 262 pueden disponerse horizontalmente, o lateralmente, si se desea. Cada zona 262 puede incluir uno o más incubadores 252 mantenidos a niveles de incubador idénticos que actúan a una temperatura común. En una disposición ejemplar, las zonas 262 se configuran para procesar ensayos de *Salmonella* y *Listeria*, que se mantienen a diferentes temperaturas (por ejemplo, aproximadamente 42 °C y 30 °C, respectivamente). Por lo tanto, el sistema 250 se configura para procesar diferentes tubos de muestras 258 (por ejemplo, viales de detección) independientemente del tipo de ensayo.

En una disposición, cada incubador 252 forma un recinto adecuado para recibir una bandeja 256 en el mismo y mantener una temperatura predeterminada necesaria para cultivar una muestra particular. Un ejemplo de un incubador 252 se muestra en la Figura 34. El incubador 252 puede incluir un bloque base 264, incluyendo las superficies inferiores y laterales, puertas frontales y traseras 266, 268 y una superficie superior 270. El incubador 252 puede estar formado por una diversidad de materiales adecuados para proporcionar un recinto de temperatura controlada. Por ejemplo, los incubadores 252 pueden construirse a partir de un único bloque base metálico mecanizado 264 (por ejemplo, aluminio) que forma el fondo y los laterales de la región de temperatura controlada, mientras que una placa metálica (por ejemplo, aluminio) forma la superficie superior 270. El incubador 252 también puede incluir un canal 272 en el lado izquierdo del bloque base que se configura para soportar una correa 274 para oscilar la bandeja 256 en una dirección Y bajo el control de una plataforma Y 278. El rango de movimiento de la bandeja 256 se extiende más allá de la profundidad de zona caliente para proporcionar impulso de bandeja en el área de sedimentación/lectura detrás del incubador 252. Por lo tanto, el rango de movimiento de cada bandeja 256 se basará en distancia necesaria para agitar apropiadamente los tubos 258 así como resituar los tubos fuera del incubador 252 para sedimentación y análisis de imágenes por el conjunto de sedimentación/lectura 254.

En una disposición, el incubador 252 incluye una puerta frontal 266 y una puerta trasera 268, en el que las puertas cooperan con la superficie superior 270 y el bloque base 264 para formar un recinto. La puerta frontal 266 se configura para abrirse y cerrarse selectivamente por un operador (véase por ejemplo Figura 31). Por ejemplo, la puerta frontal 266 puede configurarse para oscilar hacia abajo de modo que la bandeja 256 pueda extenderse desde el frontal del incubador 252 a una distancia mínima y la puerta no obstruya el acceso del tubo o la visibilidad. La puerta frontal 266 puede montarse usando una diversidad de técnicas para facilitar la apertura y el cierre. Por ejemplo, la puerta frontal 266 puede montarse en bisagras cargadas con muelle de torsión que cierran la puerta tras la extracción de la bandeja al incubador 252. Un mecanismo de empuje puede extenderse desde uno o ambos lados del frontal de la bandeja para ayudar a abrir la puerta. De acuerdo con un aspecto, se localiza una bandera dentro de la puerta frontal 266 que se configura para interrumpir un sensor óptico montado en la pared lateral interior del incubador 252 para detectar cuando se cierra la puerta frontal.

De forma similar, la puerta trasera 268 puede configurarse para abrir y cerrar después de que la bandeja 256 salga y vuelva a entrar en la parte posterior del incubador 252 (véase Figura 40). Por lo tanto, a medida que la bandeja 256 sale del incubador 252, la bandeja se configura para empujar la puerta trasera 268 para que se abra al menos parcialmente. Como la puerta frontal 266, la puerta trasera 268 puede montarse en bisagras cargadas con muelles de torsión y puede configurarse un elemento en la parte trasera de la bandeja 256 para empujar la puerta trasera para que se abra a medida que la bandeja sale de la parte posterior del incubador 252. Se configura una funda 276 para recibir la bandeja 256 tras salir del incubador 252 y se configura para moverse a lo largo de un eje Z como se explica en más detalle posteriormente. Una vez que se ha abierto parcialmente la puerta trasera 268, la funda 276 puede configurarse para abrir completamente la puerta trasera a medida que la funda se eleva a lo largo del eje Z para alinearse con el incubador 252. Manteniendo la funda 276 la puerta abierta, la bandeja 256 se puede mover libremente en el área de sedimentación/lectura sin interferencia de la puerta trasera 268. La puerta trasera 268 se configura para cerrarse cuando la bandeja 256 se retraiga al incubador 252 y la funda 276 se baja. El incubador 252 puede incluir un sensor para indicar que la bandeja 256 está situada de forma apropiada en el mismo. Por ejemplo, una bandera en el interior de la puerta trasera 268 puede configurarse para interrumpir un sensor óptico montado en la pared lateral interior del incubador para detectar cuando se cierra la puerta trasera. Este sensor puede también usarse como un indicador de acoplamiento para la bandeja 256. Por lo tanto, el sensor de la puerta trasera puede establecer la posición de la bandeja 256 en o fuera de la parte trasera del incubador 252. Un segundo sensor de acoplamiento puede localizar el acoplamiento para cada bandeja 256 en relación con la sedimentación y el hardware óptico durante cada traslado a la región de sedimentación/lectura.

Debido a que cada incubador 252 tiene la temperatura controlada, el incubador puede envolverse en un material aislante (por ejemplo, un aislante de espuma de celda cerrada). Cada una de las zonas térmicas 262 también puede separarse por un material aislante, que es útil cuando las zonas se mantienen a diferentes temperaturas. También

puede haber huecos entre zonas para limitar la interacción entre zonas. Además, el material aislante puede usarse para evitar la interacción térmica cuando se abra una puerta incubadora 266 o 268 a la parte frontal o la parte posterior y la otra esté cerrada. Los espaciadores aislantes pueden separar incubadores en una zona 262. De forma similar, las zonas 262 también pueden separarse usando espaciadores y material aislante.

Cada incubador 252 se calienta usando un elemento de calentamiento. Por ejemplo, el elemento de calentamiento puede configurarse para conducir calor a través del bloque base 264 o proporcionar aire caliente dentro del incubador. De acuerdo con una disposición, el elemento de calentamiento es un elemento de calentamiento plano adherido a o integrado de otro modo con la superficie inferior del bloque base 264. La distribución de potencia del elemento de calentamiento puede adaptarse para minimizar los gradientes térmicos a través de los tubos 258 en la bandeja 256 para compensar la pérdida térmica a través de los componentes del impulsor Y 278 en el lado izquierdo del incubador 252. Cada incubador 252 puede equiparse con uno o más sensores para supervisar la temperatura en el mismo, tal como la temperatura del bloque base 264 y/o el aire dentro del incubador.

Como se ha analizado anteriormente, cada incubador 252 se configura para recibir una bandeja respectiva 256 en el mismo. Las Figuras 30-32 ilustran disposiciones ejemplares de bandejas 256 adecuadas para situarse dentro de un incubador respectivo. Una bandeja 256 en cada incubador 252 se configura para acomodar una pluralidad de tubos 258. En la disposición ilustrada, la bandeja 256 contiene 15 tubos 258 de modo que cada zona térmica 262 contenga 30 tubos, aunque puede usarse cualquier número de tubos. Los tubos 258 pueden disponerse horizontalmente en una matriz plana en cada una de las bandejas 256. En una disposición mostrada en la Figura 31, un técnico coloca manualmente tubos de muestras 258 en bandejas de muestras desmontables 256. El técnico coloca después las bandejas 256 en los incubadores 252. Un ensayo está completo cuando se determina un resultado positivo o cuando el resultado permanece negativo durante un periodo de tiempo predeterminado. Cuando el ensayo se ha completado, el técnico retira las bandejas 256 para recargar con nuevos tubos 258. Como alternativa, el técnico puede retirar y/o añadir tubos a la bandeja individualmente según sea necesario sin detener los ensayos que ya están en progreso dentro de otros tubos en la bandeja o incubadores adyacentes. Las muestras positivas pueden segregarse para análisis adicional. En otra disposición, las bandejas 256 no son desmontables. Por lo tanto, los tubos 258 pueden colocarse individualmente en una bandeja no desmontable 256 en cada incubador 252. En otra disposición más, la bandeja 256 puede ser innecesaria cuando el incubador 252 incluya medios adecuados para sostener los tubos 258 en el mismo.

La disposición de los tubos 258 horizontalmente y lateralmente en las bandejas 256 facilita la carga de tubos de muestra individuales o bandejas desde el frontal del incubador 252. La carga frontal evita el uso de espacio de asiento o espacio de pasillo enfrente del sistema, ya que una bandeja de carga superior necesitaría extenderse desde el frontal del sistema casi la longitud de un tubo para facilitar la carga superior. Además, la bandeja y el soporte deslizante necesitarían soportar altas cargas cuando un usuario ejerza presión excesiva en la bandeja extendida voladiza.

Cada bandeja 256 puede ser de una diversidad de tamaños y configuraciones para contener tubos 258 y facilitar la colocación dentro del incubador 252. Por ejemplo, la Figura 31 ilustra que los tubos 258 se insertan dentro de ranuras respectivas 284 definidas en la bandeja 256. Los tubos 258 pueden mantenerse en su sitio usando una fuerza o un ajuste de interferencia o elementos de distorsión dispuestos dentro de la bandeja 256. Cuando las bandejas 256 sean desmontables del incubador 252, las bandejas pueden incluir uno o más elementos de agarre 286 que permitan a un técnico sostener las bandejas y manipular las bandejas dentro del incubador, como se muestra en las Figuras 33A-33C.

En una disposición, la bandeja 256 incluye ranuras longitudinales 284 de modo que una parte de los tubos 258 sea visible a través de la bandeja. Las ranuras longitudinales 284 también permiten que los tubos 258 sobresalgan por debajo de la superficie inferior de la bandeja 256 para proporcionar un área de contacto con los imanes de sedimentación 288. Para asegurar el contacto suficiente con los imanes a través de la bandeja 256, cada tubo 258 puede tener conformidad vertical en la bandeja. Por ejemplo, un muelle puede sostener el tubo 258 pegado a los imanes a medida que se elevan para encontrarse con el tubo. El muelle también puede conservar los tubos 258 en la bandeja 256 por fricción contra el movimiento de bandeja oscilatorio.

De acuerdo con una disposición, las bandejas 256 se configuran para oscilar horizontalmente a lo largo de un eje Y en cada incubador 252 bajo el control de una plataforma Y 278 para agitar tubos que contienen una muestra, un medio de cultivo y un reactivo. Este movimiento horizontal puede cumplir varias funciones:

- a) Agitación para mezcla cinética en el incubador 252;
- b) Extensión de los tubos del frontal del incubador 252 para carga y descarga por parte del operador;
- c) Extensión de los tubos desde la parte posterior de los incubadores 252 al conjunto de sedimentación/lectura 254;
- d) Agitar los tubos 258 para dispersar materiales sedimentados, por ejemplo, componentes sólidos de medios o muestras;
- e) Agitar los tubos 258 y los imanes 288 en el conjunto de sedimentación/lectura 254 para formar sedimentos;
- f) Situar los tubos 258 sobre la cabeza de lectura 290 para recogida de datos;
- g) Situar las etiquetas de los tubos sobre un lector de código de barras para ID de la muestra;

- h) Situar los sedimentos sobre una cámara para visualizar sedimentos con respecto a controles internos, métodos de detección basados en imágenes o diagnóstico remoto;
- i) Agitar los tubos 258 para dispersar los sedimentos después de la lectura;
- j) Operar la puerta frontal 266 del incubador;
- 5 k) Operar la puerta posterior 268 del incubador;
- l) Circular aire en el incubador 252 para reducir los gradientes de temperatura.

Como se muestra en la Figura 34, el sistema incluye una plataforma Y 278 para mover las bandejas 256 a lo largo de un eje Y, incluyendo para oscilar o agitar las bandejas y meter y sacar las bandejas de la parte posterior del incubador 252. Como se muestra en la Figura 27, cada incubador 252 puede incluir una plataforma Y 278 respectiva dispuesta a lo largo del eje Z para separar verticalmente entre sí. La bandeja 256 puede acoplarse a la plataforma Y 278 usando uno o más carros 282. Por ejemplo, la bandeja 256 puede volarse desde un carro 282 montado en un carril lineal 292, en el que el carril lineal se monta en el bloque base 264 del incubador. La plataforma Y 278 incluye un motor 280 para conducir una cinta 274 alrededor de poleas dentadas en ambos extremos del carril 292. Se entiende que la plataforma Y 278 se configura para agitar las bandejas 256 a una diversidad de frecuencias y amplitudes dependiendo del ensayo y la aplicación particulares. Por ejemplo, las bandejas 256 pueden oscilarse más lentamente mientras que estén en los incubadores 252 que cuando se sitúen en el conjunto de sedimentación/lectura 254.

Los componentes de plataforma Y 278 pueden también encerrarse por un material aislante, mientras que el motor 280 que conduce la plataforma Y está fuera del área aislada. Las bandejas 256 y el carro 282 pueden moverse a través de una apertura en el material aislante.

El sistema 250 también incluye una plataforma Z 294 localizada detrás de los incubadores 252 (véase Figuras 39, 42 y 43). La plataforma Z 294 se configura para portar la funda 276, el conjunto de imán 260, los componentes ópticos (por ejemplo, espectrómetro 308, sonda de Raman 310, etc.) y la plataforma X 296 a lo largo de un eje Z. La plataforma Z 294 puede incluir un carro 298 configurado para correr en un carril lineal vertical 300. Se configura un motor 302 para subir y bajar la plataforma Z en una dirección Z (por ejemplo, usando un tornillo y tuerca lineal dispuestos dentro del astil 304 acoplado a un soporte de plataforma Z 306). Puede usarse un sensor para indicar cuando la plataforma Z 294 está en la parte inferior de su desplazamiento en la dirección Z. El espectrómetro 308, el conjunto de imán 260, funda 276 y plataforma X 296 se montan en el soporte de plataforma Z 306 y viajan todos juntos en la dirección Z como una unidad. La plataforma Z 294 se configura para moverse en la dirección Z para acomodar cada bandeja 256 que salga del incubador 252. La plataforma Z 294 también se configura para desplazarse por debajo del incubador de fondo 252 suficientemente para permitir que se cierre la puerta trasera de incubador de fondo 268.

El sistema 250 también incluye un conjunto de imán 260, como se muestra en las Figuras 42, 45 y 46. El conjunto de imán 260 puede incluir uno o más imanes 288 montados en un marco de imanes 318 configurado para aplicar un campo magnético a los tubos 258, facilitando de este modo la formación de un sedimento dentro de cada tubo. Por ejemplo, las Figuras 45 y 46 ilustran un par de imanes longitudinales 288 separados a una distancia suficiente para permitir que la cabeza de lectura 290 se extienda a través de ellos para obtener una lectura. Por lo tanto, los imanes 288 pueden permanecer en su posición después de la sedimentación y mientras la cabeza de lectura 290 lee los tubos 258. Cada imán longitudinal 288 puede ser un imán sencillo o una colección de una pluralidad de imanes dispuestos de extremo a extremo.

Pueden formarse sedimentos cuando los imanes 288 se ponen en contacto con, o en proximidad estrecha a, el fondo de los tubos orientados en horizontal 258. Los tubos 258 e imanes 288 oscilan suavemente durante la formación de sedimentos para asegurar que las partículas magnéticas en suspensión pasen a través del campo magnético y sean atraídas a un punto focal de campo magnético. De acuerdo con una disposición, el conjunto de imán 260 se monta en un carro 312 que se desplaza en la dirección Y en un carril 314 fijado al soporte de plataforma Z 306 (véase Figura 46). El carril 314 puede ser paralelo al carril de plataforma Y 292.

Cuando la bandeja 256 se extiende desde la parte trasera del incubador 252 y al conjunto de sedimentación/lectura 254, la plataforma Z 294 puede elevarse desde abajo a lo largo de un eje Z. Como se muestra en las Figuras 42 y 47, un pasador 316 que se extiende hacia fuera desde el marco de imanes 318 se configura para conectar con un agujero en la parte inferior de la bandeja 256. Una vez conectado, el marco de imanes 318 se acopla con la bandeja 256, y el marco de imanes y la bandeja son capaces de moverse juntos en la dirección Y a lo largo del carril 314. Por lo tanto, en una disposición, el conjunto de sedimentación/lectura 254 se configura para procesar una bandeja 256 cada vez. La amplitud de oscilación de sedimentación puede variar dependiendo del número de factores específicos para un ensayo particular. En un ejemplo, la amplitud de oscilación puede ser de hasta aproximadamente 50 mm. El marco de imanes 318 y la bandeja 256 pueden acoplarse en una posición de desplazamiento completo de la plataforma Y en la dirección Y, mientras que el centro de las oscilaciones de sedimentación pueden localizarse hacia adelante desde la localización de acoplamiento para acomodar la mitad de la amplitud en la dirección Y.

En una disposición, una cantidad pequeña de movimiento relativo entre los tubos oscilantes 258 y los imanes 288 permiten que el campo magnético reúna las partículas magnéticas en un sedimento más ajustado. Por lo tanto, un acoplamiento suelto entre la bandeja 256 y el marco de imanes 318 puede ser deseable. Dicho acoplamiento puede implementarse, por ejemplo, montando el marco 318 en un bloque mantenido en una ranura en el marco 318 entre

dos muelles. A medida que la bandeja 256 oscila hacia adelante y hacia atrás en la dirección Y, el marco 318 se mueve en relación con la bandeja a medida que los muelles se comprimen alternativamente en un segundo movimiento oscilatorio. El impulso de acoplamiento suelto puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 5 mm. Las constantes de muelle se seleccionarán para proporcionar la frecuencia de oscilación óptima.

El conjunto de imán 260 se configura para sedimentar cada uno de los tubos 258 en la bandeja 256 simultáneamente, según una disposición de la presente invención. Los imanes 288 pueden configurarse para permanecer en su lugar mientras que los tubos 258 se leen por la cabeza de lectura 290. Como alternativa, los sedimentos pueden ser adecuadamente persistentes para permitir que el imán 288 o los tubos 258 se alejen entre sí para la lectura.

La Figura 41 muestra un ejemplo de una plataforma X 296 que está acoplada a la plataforma Z 294. Por lo tanto, la plataforma X 296 está configurada para moverse en la dirección Z por la plataforma Z. La plataforma X 296 también facilita el movimiento de la cabeza de lectura 290 en la dirección X para la lectura de cada uno de los tubos 258. La plataforma X 296 explora la cabeza de lectura 290 bajo la serie de tubos 258 para recoger datos de ensayo después de haberse formado los sedimentos. Durante la sedimentación, la plataforma X 296 se mueve a una posición X que permite que una bandeja acoplada 256 se mueva sin interferencia con la cabeza de lectura 290 y el conjunto de imán 260. Después de sedimentar, con la bandeja 256 estacionaria, la plataforma X 296 se traslada a cada tubo 258, deteniéndose para recoger datos hasta que se han leído todos los tubos. La plataforma X 296 se resitúa después en su posición de partida antes de moverse la bandeja 256. En una disposición ejemplar, el impulsor de plataforma X (por ejemplo, motor 320 y cinta 322) se monta en un canal 324 en el soporte de plataforma Z 306 y utiliza un diseño similar al de la plataforma Y 278. La cabeza de lectura 290 se monta en un carro 326 que se configura para moverse a lo largo de un carril 328 de la plataforma X 296. Puede usarse un manguito flexible 330 para dirigir los cables eléctricos de la cabeza de lectura 290 y el cable óptico de fibra flexible de la plataforma Z 294 a la cabeza de lectura en movimiento. El manguito flexible 330 se configura no solamente para proteger el haz de fibra óptica sino también para permitir que la fibra se doble en la dirección X y proporcionar un radio de flexión deseado.

De acuerdo con otra disposición, la plataforma X 296 se configura para portar un lector de código de barras (no mostrado) para leer un código de barras u otro identificador en cada uno de los tubos 258. Por ejemplo, el lector de códigos de barras puede usarse para confirmar que el tubo 258 esté en la zona térmica correcta 262, evitando de este modo falsos negativos. El código de barras podría incluir otros datos, tales como identificación e información de ensayo. Como se ha analizado anteriormente, los tubos 258 pueden incluir ranuras longitudinales 284 que facilitan dicha lectura por un lector de código de barras. Adicionalmente, el lector de código de barras puede proporcionar datos de imágenes en sedimentos para controles internos, métodos de detección basados en imágenes y/o diagnóstico remoto.

Como se ha analizado anteriormente, se configura una funda 276 para recibir cada bandeja 256 a medida que la bandeja sale de la parte posterior del incubador 252. En particular, la funda aislada 276 se porta en la plataforma Z 294 y se configura para alinearse con cada incubador 252 para rodear la bandeja 256 cuando se extiende desde la parte posterior del incubador a la región de sedimentación/lectura 254. La funda aislada 276 minimiza el cambio de temperatura de la bandeja mientras que la bandeja 256 se extiende desde el incubador 252. La funda 276 proporciona un manguito aislado y bloquea el enfriamiento por parte del flujo de aire de la bandeja 256 y los tubos 258 contenidos en la misma. Además, la funda 276 se construye de materiales que minimizan su masa térmica y por lo tanto el intercambio de energía calórica con una bandeja 256 a una temperatura diferente de la de la zona precedente. Por ejemplo, la funda 276 puede comprender una estructura de aluminio fina rodeada por un material aislante. En una disposición específica, una bandeja a aproximadamente 30 °C que entra en una funda a aproximadamente 42 °C no aumentará su temperatura en más de aproximadamente 0,5 °C.

Puede haber un hueco 332 definido entre el incubador 252 y la funda alineada 276 de modo que el incubador no puede regular completamente la temperatura en la funda. En esos casos cuando la temperatura en el incubador 252 es mayor que la temperatura ambiente, el aire que rodea la funda 276 puede ser más frío que la bandeja 256, de modo que cualquier transferencia térmica desde la funda será hacia una temperatura de bandeja menor. Sin embargo, algunos ensayos tienen una tolerancia de temperatura aceptable si hubiera variaciones resultantes del movimiento de la bandeja 256 desde el incubador 252 a la funda 276. Por ejemplo, los ensayos son más tolerantes a bajadas de temperatura negativas breves, por ejemplo, aproximadamente -2 °C, que a aumentos de temperatura, por ejemplo, aproximadamente +0,5 °C para *Salmonella* a 42 °C y *Listeria* a 30 °C. Por lo tanto, puede ser innecesario formar un buen sellado térmico con el incubador 252 siempre que las variaciones negativas estén dentro de tolerancias aceptables.

Además de rodear la bandeja extendida 256, la funda 276 también puede envolver el conjunto de imán 260 como se muestra en la Figura 42. Por lo tanto, la funda 276 puede ser de un tamaño que permita que la plataforma Z 294 se mueva verticalmente con el conjunto de imán 260 para acoplar y desacoplar la bandeja 256, como se ha analizado anteriormente. Además, la funda 276 puede incluir recortes para proporcionar espacio para la cabeza de lectura 290 a lo largo del fondo de la funda y para que los carros 282 se muevan a lo largo del lateral mediante la plataforma Y 278. La parte superior de la funda 276 también puede incluir un recorte para la puerta de incubador posterior 268.

Los componentes anteriormente mencionados del sistema 250 pueden encerrarse en un armario 334, como se

muestra en las Figuras 48A y 48B. Una piel forma un armario 334 alrededor del incubador 252 y región de sedimentación/lectura 254 para controlar el flujo de aire y añadir control térmico. El armario 334 también puede proporcionar un recinto seguro en el que los componentes ópticos actúan (por ejemplo, láser). El sistema 250 puede incluir además una o más señales visibles o auditivas para indicar el estado de los ensayos. Por ejemplo, pueden usarse uno o más LED 336 para indicar que el ensayo está en progreso y cuando se produce un resultado positivo. Cada tubo 258 y/o bandeja 256 puede incluir un LED 336 asociado para dicho fin. Pueden usarse diferentes colores de LED para diferentes indicaciones, en las que los colores pueden ser visibles cuando la puerta frontal 266 del incubador 252 está abierta o cerrada.

Los incubadores 252 típicamente se mantienen a una temperatura que es mayor que la ambiental. Para ayudar a conseguir esta diferencia de temperatura y asegurar que no se suministra exceso de calor a las bandejas 256 que se extienden a la funda 276, puede emplearse una ruta de flujo de aire. También pueden usarse ventiladores con filtros para presurizar el armario 334 para reducir la infiltración de polvo, y pueden usarse otras técnicas de disipación del calor para componentes tales como los motores. Otras técnicas, tales como un enfriador eléctrico térmico pueden usarse para enfriar adicionalmente el armario 334.

Pueden usarse diversos componentes eléctricos para interaccionar con y controlar el sistema 250 como conocen los expertos habituales en la materia. Por ejemplo, pueden usarse diversas tarjetas de controlador de motor para controlar los motores y proporcionar la interfaz a los otros dispositivos tales como sensores y codificadores. Pueden usarse otras tarjetas para proporcionar funcionalidad adicional tal como proporcionar potencia y señales de interfaz para la cabeza de lectura 290 y el espectrómetro 308 así como controlar calentadores y leer los termistores asociados. Adicionalmente, el sistema 250 puede emplear diversos otros componentes tales como un microcontrolador para controlar el sistema de una manera automática como conocen los expertos habituales en la materia.

E. Técnicas de agitación y sedimentación

La Figura 49 representa métodos de agitación y sedimentación de acuerdo con una disposición de la invención que se han desarrollado para minimizar el volumen de reactivo y obtener una lectura que es representativa de un volumen grande (por ejemplo, hasta 250 ml). Esto se consigue principalmente agitando el vaso de cultivo a lo largo de su eje longitudinal durante la aplicación del campo magnético. El sedimento se forma en el lado del tubo, a lo largo de la dirección del eje longitudinal. Puede seleccionarse una combinación de volumen de muestra con respecto a tubo (por ejemplo 1:2), relación de aspecto de longitud/anchura del tubo (por ejemplo, 7:1) y resultados de parámetros de agitación para optimizar el rendimiento. La agitación promueve una formación de sedimentos más eficaz asegurando que las partículas del volumen mayor se pongan en proximidad estrecha con el imán. Además, la agitación ayuda a mantener células no en complejo, microorganismos y sólidos sueltos (por ejemplo resina en muestras de cultivo sanguíneo) fuera del sedimento aplicando una fuerza en dirección distinta a la dirección del campo magnético.

La Figura 50 representa una disposición de un dispositivo para formar y explorar el sedimento magnético. Este dispositivo puede usarse en la disposición del sistema de carrusel 150 mostrado en la Figura 24. En la disposición ilustrada en la Figura 50, el conjunto de imán consiste en una pila de imanes anulares que rodean y son colineales con la parte de la cabeza de lectura óptica que contiene la lente del objetivo. Una punta de acero cónica hueca centra el campo magnético en la punta del cono, provocando que el sedimento se forme en el foco de la cabeza de lectura. Esta disposición alinea automáticamente el sedimento con el foco de la cabeza de lectura y suaviza las restricciones sobre el alineamiento del tubo, el imán y la cabeza de lectura. El alineamiento uniforme de sedimento, imán y cabeza de lectura es importante para mediciones uniformes por todas las muestras durante el transcurso del ensayo, y este diseño proporciona formación de sedimento fiable y repetible entre tubos de muestras, durante múltiples lecturas durante el transcurso de un ensayo, y entre diferentes instrumentos.

Las Figuras 51 y 52 muestran métodos alternativos de formación del sedimento que se han usado de acuerdo con los sistemas descritos anteriormente. El alineamiento de los tubos en un plano horizontal permite que la señal óptica se lea con los imanes extraídos después de la sedimentación o mantenidos en la posición de sedimentación. Esto permite ensayar diversas geometrías de imanes. Se ha demostrado que dos de ellas son especialmente eficaces. Una, denominada "Norte-arriba" usa un imán en barra con magnetización dirigida perpendicular al tubo (Figura 52). Esto forma un sedimento circular simétrico ideal para leer con la cabeza de lectura. La otra geometría se denomina "par Norte en dirección Norte" (Figura 51), en la que dos imanes en barra se sitúan adyacentes y paralelos entre sí. La magnetización se dirige a lo largo de la línea perpendicular a los imanes a través del grosor de cada imán, de modo que los polos Norte se enfrentan entre sí. Con separación apropiada entre los imanes, la región del mayor gradiente de campo está en la región entre los imanes, dando como resultado un sedimento centrado en la región entre los imanes, a la que se puede acceder fácilmente para lectura con los imanes en su sitio.

En otra disposición de la invención también se añade una cámara a la estación de ensayo para supervisar la formación y el tamaño del sedimento durante el ensayo de SERS-HNW que contiene partículas indicadoras de SERS conjugadas y perlas magnéticas y el patógeno diana dentro de un vaso de cultivo. El tamaño del sedimento aumenta, y en algunos casos el sedimento desaparece de la vista de la cámara a medida que avanza el ensayo de HNW. El crecimiento del tamaño del sedimento y/o la desaparición del sedimento es un indicio de la presencia del patógeno diana. Las imágenes capturadas durante el análisis de muestras que contienen partículas indicadoras de SERS conjugadas y

perlas magnéticas sin patógeno no muestran ningún cambio en el tamaño del sedimento y no muestran ninguna desaparición de sedimento. Este método de detección de patógenos puede usarse solo o junto con otro método de detección tal como el análisis de SERS previamente descrito como medio de validación.

Los métodos desvelados por la presente con cualquier espectrómetro adecuado o sistemas de espectrómetro de Raman conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, un Espectrómetro de Raman de Espectrómetro Múltiple Multimodo (Centice, Morrisville, Carolina del Norte, Estados Unidos de América), tal como el sistema de espectrómetro de Raman desvelado en la Patente de Estados Unidos n.º 7.002.679 de Brady *et al.*, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Otros ejemplos no limitantes de espectrómetros adecuados o sistemas de espectrómetros de Raman incluyen el Hamamatsu C9405CA y el Intevac ReporteR, e incluyen configuraciones ópticas tanto acopladas a fibra como de espacio libre. Se desvela instrumentación adicional adecuada para su uso con las partículas indicadoras SERS activas desveladas por la presente en la Solicitud de Patente Internacional de PCT n.º PCT/US2008/057700 de Weidemaier *et al.*, presentada el 20 de marzo de 2008, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Se desvelan métodos representativos para realizar ensayos de SERS basados en líquido de captura magnética en la Solicitud de Patente Internacional de PCT n.º PCT/US2008/057700 de Weidemaier *et al.*, presentada el 20 de marzo de 2008, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Dichos métodos pueden incluir métodos de referencia y control para compensar variaciones en el tamaño, la forma o la situación de sedimentos magnéticos, y métodos para generar espectros de referencia de Raman mejorados y análisis espectral en ensayos basados en líquidos de extracción magnética, como también se desvela en el documento PCT/US2008/057700. Además, pueden usarse múltiples moléculas indicadoras para crear una señal de referencia interna que puede usarse para distinguir el ruido de fondo de la detección de señal, particularmente en muestras que muestran o se espera que muestren una señal relativamente débil.

Además, como se desvela en la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 12/134.594 de Thomas *et al.*, presentada el 6 de junio de 2008, y Solicitud de Patente Internacional de PCT n.º PCT/US2008/066023 de Thomas *et al.*, presentada el 6 de junio de 2008, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad, los colorantes adecuados para su uso como moléculas indicadoras en partículas indicadoras SERS activas muestran típicamente espectros de Raman relativamente sencillos con anchuras de línea estrechas. Esta característica permite la detección de varias especies Raman activas diferentes en el mismo volumen de muestras. En consecuencia, esta característica permite fabricar múltiples partículas indicadoras SERS activas, que incluyen cada una diferentes colorantes, de modo que el espectro de Raman de cada colorante pueda distinguirse en una mezcla de diferentes tipos de partículas indicadoras. Esta característica permite la detección múltiple de varias especies diana diferentes en un volumen de muestra pequeño, denominado en el presente documento ensayos múltiples.

En consecuencia, en algunas disposiciones, puede unirse más de un tipo de miembro de unión a la partícula indicadora SERS activa. Por ejemplo, el tipo de miembro de unión unido a la partícula indicadora SERS activa puede variarse para proporcionar múltiples reactivos que tengan diferentes afinidades por diferentes microorganismos diana. De esta manera, el ensayo puede detectar más de un microorganismo de interés o mostrar diferentes selectividades o sensibilidades para más de un microorganismo. La partícula indicadora SERS activa puede adaptarse para muestras de cultivo en las que la presencia de uno o más microorganismos, o las concentraciones del o los microorganismos, pueden variar.

Un reactivo de ensayo de SERS puede incluir más de un tipo de marcador, por ejemplo, más de un tipo de molécula indicadora SERS activa, dependiendo de los requisitos del ensayo. Por ejemplo, pueden usarse moléculas indicadoras SERS activas que muestran una señal de Raman a diferentes longitudes de onda para crear una "identificación" de Raman única para un microorganismo de interés específico, potenciando de este modo la especificidad del ensayo. Pueden unirse diferentes moléculas indicadoras a núcleos de nanopartículas que tienen unidos a los mismos diferentes miembros de unión específica para proporcionar un reactivo capaz de detectar más de un microorganismo de interés, por ejemplo, una pluralidad de microorganismos de interés.

En una disposición de la invención, las capacidades de multiplexación de la tecnología de SERS HNW se usan para identificar seis de los organismos más comunes que provocan infecciones del torrente sanguíneo. Están presentes seis tipos o "estilos" diferentes de partículas indicadoras SERS activas en un frasco de cultivo sanguíneo, cada uno conjugado con anticuerpos específicos para uno de los seis organismos para detectar. Además en el vaso hay partículas de captura magnética capaces de formar sándwiches con las partículas indicadoras SERS activas. Las partículas de captura magnética pueden configurarse de modo que haya un anticuerpo de captura común o conjunto de anticuerpos que intercalen múltiples partículas indicadoras SERS activas o como alternativa podría haber seis conjugados magnéticos separados presentes en el vaso, siendo cada conjugado magnético capaz de forma única de formar un sándwich con cada una de las seis partículas indicadoras SERS activas. Cuando se forma un sedimento magnético y se lee la señal de SERS del sedimento, el espectro de Raman medido será una contribución de cada estilo de partícula indicadora SERS activa presente en el sedimento; la presencia de una partícula indicadora SERS activa indica la presencia del microorganismo para el que las partículas indicadoras SERS activas son específicas. Los algoritmos de desconvolución pueden distinguir eficazmente los espectros de las seis partículas indicadoras SERS activas individuales del espectro agregado medido.

La Figura 53 muestra un esquema de una disposición múltiple que usa solamente dos partículas indicadores SERS activas. En una disposición preferida, se conserva un sensor de gas convencional (por ejemplo BACTEC™), de modo que se supervisen simultáneamente la señal de SERS y las señales sensoras de pH. Esto permite la detección eficaz de cualquier microorganismo que no reconozcan los anticuerpos de SERS HNW.

Como se desvela adicionalmente en la Solicitud de Patente Internacional de PCT n.º PCT/US2008/057700 de Weidemaier *et al.*, presentada el 20 de marzo de 2008, en los ensayos desvelados por la presente que implican partículas indicadoras SERS activas, los espectros de SERS puede amplificarse mediante la adición de una segunda alícuota de moléculas indicadoras capaces de generar una señal detectable y tener asociado con las mismas al menos un miembro de unión específica que tenga una afinidad por la al menos una molécula indicadora SERS activa asociada con la o las partículas indicadoras SERS activas antes de, simultáneamente con o después de disponer la muestra y/o la al menos una molécula indicadora SERS activa en la misma, en la que la segunda alícuota de moléculas indicadoras es la misma que la al menos una moléculas indicadora SERS activa asociada con las partículas indicadoras SERS activas. En algunas disposiciones, la segunda alícuota de moléculas indicadoras comprende una molécula indicadora SERS activa asociada con una partícula indicadora SERS activa capaz de producir una señal de SERS. En las disposiciones en las que se dispone una segunda alícuota de moléculas indicadoras en el vaso de ensayo, el miembro de unión específica de la segunda alícuota de moléculas indicadoras no reconoce el o los miembros de unión específica que comprenden la zona de captura o unidos a las partículas de captura magnética.

F. Ejemplos de flujo de trabajo

Según una disposición ejemplar, una muestra de cultivo para detectar e identificar *Salmonella* puede proporcionarse junto con las disposiciones anteriormente mencionadas. En una disposición, *Salmonella* se cultiva en primer lugar en un medio no selectivo dentro del vaso de enriquecimiento, seguido de una transferencia biocontenida a un vial de detección que contiene los reactivos de detección y un segundo medio selectivo. En general, el ensayo de *Salmonella* incluye añadir medios con complemento opcional a un vaso de preparación de medios. El medio se distribuye después al vaso de enriquecimiento y se añade una muestra al vaso de enriquecimiento. Opcionalmente, la muestra se homogeneiza (por ejemplo, por agitación en bolsa o mezclado) antes de la adición al vaso de enriquecimiento. En este caso, el medio del vaso de preparación de medios se añade junto con la muestra al homogeneizador. Después de la homogeneización, la muestra se transfiere al vaso de enriquecimiento, y se une una tapa al vaso. Una vez que se han añadido medio y muestra al vaso de enriquecimiento y se ha unido la tapa del vaso de enriquecimiento, puede leerse un código de barras en el vaso para fines de identificación de cadena de custodia. El vaso de enriquecimiento se incuba después durante un periodo de tiempo predeterminado. Después de la incubación, el vaso de enriquecimiento y un vial de detección pueden explorarse con un lector de código de barras. El vial de detección incluye un medio selectivo y reactivos de detección que son particulares para detectar *Salmonella*. En caso de que el medio en el vial de detección se deshidrate, se añade fluido de reconstitución al vial de detección y el vial se invierte para su mezclado. El recipiente de enriquecimiento se inclina después para llenar un depósito respectivo con una cantidad deseada de muestra (por ejemplo, 100 µl). El vial de detección se inserta en el vaso de enriquecimiento para conectar una aguja dentro de la apertura para una transferencia biocontenida de la muestra al vial de detección. El vial de detección se inserta después dentro de un sistema automático en tiempo real para incubación y ensayo automático de la muestra, incluyendo sedimentación y análisis óptico de la muestra. Tras la detección de una muestra positiva, el vial de detección puede retirarse, leerse por un lector de código de barras y dirigirse a procesamiento adicional.

En una realización ejemplar disposición, puede proporcionarse una muestra de cultivo para detectar e identificar *Listeria* junto con las disposiciones anteriormente mencionadas. En una disposición preferida, el cultivo de *Listeria* dentro del vial de detección se produce en el mismo medio que se usa en el vaso de enriquecimiento, de modo que se usa un único medio a lo largo del flujo de trabajo. En general, el ensayo de *Listeria* incluye añadir medio con complemento adicional a un vaso de preparación de medios. El medio se distribuye después al vaso de enriquecimiento y se añade una muestra al vaso de enriquecimiento. Opcionalmente, la muestra se homogeneiza (por ejemplo, por agitación en bolsa o mezclado) antes de la adición al vaso de enriquecimiento. En este caso, el medio para el vaso de preparación de medio se añade junto con la muestra al homogeneizador. Después de la homogeneización, la muestra se transfiere al vaso de enriquecimiento, y se une una tapa al vaso. Una vez que se han añadido medio y muestra al vaso de enriquecimiento y se ha unido la tapa del vaso de enriquecimiento, también puede leerse un código de barras en el vaso para fines de identificación de cadena de custodia. El vaso de enriquecimiento se incuba después durante un periodo de tiempo predeterminado. Después de la incubación, el vaso de enriquecimiento y un vial de detección pueden leerse con un lector de código de barras. El vial de detección incluye reactivos de detección que son particulares para detectar *Listeria*. El recipiente de enriquecimiento se inclina después para llenar un depósito respectivo con una cantidad deseada de muestra (por ejemplo, 5 ml). El vial de detección se inserta en el vaso de enriquecimiento para conectar con una aguja dentro del orificio para una transferencia biocontenida de la muestra al vial de detección. El vial de detección se inserta después dentro de un sistema automático en tiempo real para incubación y ensayo automático de la muestra, incluyendo sedimentación y análisis óptico de la muestra. Tras detección de una muestra positiva, el vial de detección puede retirarse, explorarse por un lector de código de barras y dirigirse a procesamiento adicional.

G. Estación de reconstitución

Las Figuras 93-95 ilustran estaciones de reconstitución que pueden usarse junto con disposiciones de la presente divulgación. Como se ha analizado anteriormente, puede añadirse fluido de reconstitución al vial de detección en el que el medio en el vial de detección se deshidrata. Las estaciones de reconstitución facilitan la medición de un volumen deseado y permiten la adición del líquido de reconstitución sin agotar un vacío conservado dentro del vial de detección. La Figura 93 ilustra una disposición en la que la estación de reconstitución 350 incluye una bolsa 352 o depósito secundario similar con una válvula de pinza 354. La estación de reconstitución 350 se alimenta por gravedad de modo que el líquido se configura para desplazarse del depósito principal, a través de los tubos 358 y a la bolsa 352 cuando la válvula 354 está abierta. Por ejemplo, una palanca 356 puede rotarse en el sentido de las agujas del reloj para conectar con o pinzar el tubo 358 para cerrar el tubo en la válvula 354. Después un usuario puede insertar el vial de detección 360 en el orificio de acceso 362 de modo que una aguja dispuesta dentro del orificio de acceso conecte con el obturador 364 para extraer el líquido de reconstitución al tubo. Después de retirarse el vial de detección 360 del orificio de acceso 362, el obturador 364 se configura para sellar el vial de detección para mantener el vacío en el mismo. Además, la bolsa 352 se configura para rellenar automáticamente de modo que la estación de reconstitución 350 siempre esté lista.

Como alternativa, la Figura 94 ilustra una estación de reconstitución 375 que incluye una válvula rotatoria 376, de acuerdo con otra disposición. A este respecto, el líquido de reconstitución se almacena en el depósito 378 y se alimenta por gravedad en un segundo depósito o bolsa. Cuando la válvula rotatoria 376 está en una posición "cerrada", no puede escapar ningún líquido del orificio de acceso 380 debido a filtración de la bolsa. Para transferir fluido, la válvula rotatoria 376 puede rotarse a una posición "abierta". Se inserta un vial de detección 382 dentro del orificio de acceso 380 por el que el fluido puede después retirarse de la bolsa cuando el obturador conecta con una aguja dispuesta dentro del orificio de acceso. La rotación de la válvula 376 a la posición abierta también cierra la línea de gravedad que alimenta a la bolsa. Cuando la válvula 376 se rota de vuelta a la posición cerrada, la bolsa es capaz de rellenarse automáticamente. La válvula rotatoria 376 puede operarse por un botón u otro mecanismo adecuado para abrir y cerrar la válvula, aunque no se requiera una acción rotatoria para efectuar dicha apertura y cierre de la válvula (por ejemplo, una válvula accionada mediante movimiento lineal).

La Figura 95 representa una estación de reconstitución 400 que incluye una jeringa 402 en comunicación fluida con una válvula rotatoria 404, de acuerdo con otra disposición. A diferencia de las disposiciones anteriores, la estación de reconstitución 400 no es alimentada por gravedad, de modo que el líquido de reconstitución se extrae del depósito 406 y a la jeringa 402 mediante el accionamiento de la jeringa. A este respecto, la jeringa 402 puede configurarse para extraer una cantidad deseada del líquido de reconstitución a la jeringa o una bolsa dispuesta en la misma cuando la válvula rotatoria 404 está en una posición cerrada. Una vez que se llena la jeringa, la rotación de la válvula 404 a una posición abierta permite el acceso al líquido contenido dentro de la jeringa insertando un vial de detección dentro del orificio de acceso 408 y conectando con la aguja dispuesta en el orificio de acceso 408. La rotación de la válvula 404 a la posición abierta cierra la línea que alimenta la bolsa del depósito 406. De nuevo, se entiende que la válvula rotatoria 404 puede ser cualquier mecanismo adecuado para facilitar la apertura y el cierre de la válvula. De forma similar, la jeringa 402 puede ser cualquier dispositivo adecuado configurado para extraer una cantidad deseada de líquido de reconstitución del depósito 406.

Los ejemplos representados demuestran estaciones de reconstitución que no requieren fuentes de energía externas. Un experto en la materia puede prever sistemas de medición de líquidos con fuentes de energía.

III. Microorganismos representativos

Pueden usarse disposiciones de la presente invención para detectar infecciones del torrente sanguíneo sospechadas que surgen de bacteriemia y fungemia. Se recogen múltiples muestras sanguíneas típicamente de venas separadas de un sujeto, por ejemplo, un paciente, a diferentes intervalos temporales dependiendo de los síntomas del sujeto, por ejemplo, la observación de una fiebre, o algún otro diagnóstico inicial. Puede disponerse un volumen de la muestra sanguínea, por ejemplo, de aproximadamente 3 ml a aproximadamente 10 ml para adultos y aproximadamente 1 ml para muestras pediátricas, en un frasco de crecimiento de cultivo sanguíneo después de la recogida. Típicamente para cada ciclo de recogida, se dispone una muestra en un frasco de crecimiento de cultivo sanguíneo adecuado para organismos aerobios y se dispone una muestra en un frasco de crecimiento de cultivo sanguíneo adecuado para organismos anaerobios.

A diferencia de los métodos conocidos en la técnica que detectan un aumento en la producción de gas como una medida del crecimiento microbiano en muestras de cultivo sanguíneo, los métodos desvelados por la presente permiten provechosamente la detección de patógenos intracelulares (por ejemplo, bacterianos, víricos). Los microorganismos o patógenos intracelulares crecen y se reproducen dentro de otras células (por ejemplo, células eucariotas) y por lo tanto no pueden detectarse usando sensores de gas conocidos en la técnica. Los microorganismos intracelulares representativos que pueden detectarse con los métodos desvelados por la presente incluyen, pero sin limitación, *Chlamydia trachomatis* y *Mycobacterium tuberculosis*.

Los microorganismos presentados en la Tabla 1 se encuentran habitualmente en sujetos como la causa de bacteriemia o septicemia y se clasifican en el orden en que se encuentran en los sujetos. También se indican en la Tabla 2 los

microorganismos que representan colectivamente el 80 % de todos los resultados positivos en muestras de cultivo sanguíneo y los microorganismos que se considera que tienen tratamiento inadecuado.

Tabla 1. Organismos por Aparición de Especies Bacterianas o Grupo en 2002¹

Clasificación	Especie Bacteriana o Grupo	%	Representa el 80 % de todos los BC positivos	Tratamiento Inadecuado
1	<i>Staphylococcus</i> Coagulasa negativo (incluyendo <i>S. epidermidis</i>)	42	X	X
2	<i>S. aureus</i>	16,5	X	X
3	<i>E. faecalis</i>	8,3	X	
4	<i>E. coli</i>	7,2	X	X
5	<i>K. pneumoniae</i>	3,6	X	X
6	<i>E. faecium</i>	3,5	X	
7	grupo de <i>Streptococci viridans</i>	3,4		
8	<i>Psuedomonas aeruginosa</i>	2,5		X
9	<i>S. pneumoniae</i>	2,3		
10	<i>Enterobacter cloacae</i>	1,9		
11	<i>Serratia marcescens</i>	1,0		
12	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,9		X
13	<i>Proteus mirabilis</i>	0,9		
14	<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,8		
15	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0,6		
16	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,5		
17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,3		
18	<i>Citrobacter freundii</i>	0,3		
19	<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,3		
20	<i>Enterococcus avium</i>	0,2		
21	Otros	3,4		
	Hongos > Levadura <i>C. albicans</i>			X

¹Karlowsky, J. A. et al., "Prevalence and antimicrobial susceptibilities of bacteria isolated from blood cultures of hospitalized patients in the United States in 2002," Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 3: 7 (2004).

- 5 Las muestras alimentarias, de agua, cosméticas, farmacéuticas y ambientales se exploran habitualmente con respecto a microorganismos incluyendo, pero sin limitación, *Escherichia coli* enterotoxinógena (ETEC), *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enteroagregante (EAEC), *Escherichia coli* difusamente adherente (DAEC), *Escherichia coli* productora de toxina shiga (STEC), *E. coli* 0157, *E. coli* O157:H7, *E. coli* 0104, *E. coli* 026, *E. coli* 045, *E. coli* 0103, *E. coli* O111, *E. coli* O121 y *E. coli* O145, especies de *Shigella*, especies de *Salmonella*, *Salmonella bongori*, *Salmonella enterica*, especies de *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, especies de *Vibrio*, *Vibrio cholerae*, especies de *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria grayii*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshmeri*, especies de *Staphylococcus*, especies de *Staphylococcus* Coagulasa negativas, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium sporogenes*, especies de *Cronobacter*, *Cronobacter sakazakii* (formalmente *Enterobacter sakazakii*), especies de *Streptococcus*, *S. pyogenes*, especies de *Micrococcus*, especies de *Psuedomonas*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, especies de *Legionella*, especies de *Serratia*, *K. pneumoniae*, especies de *Enterobacter*, especies de *Alcaligenes*, especies de *Achromobacter*, levadura y mohos tales como especies de *Aspergillus*, especies de

Penicillium, especies de *Acremonium*, especies de *Cladosporium*, especies de *Fusarium*, especies de *Mucor*, especies de *Rhizopus*, especies de *Stachybotrys*, especies de *Trichoderma*, especies de *Alternaria*, especies de *Geotrichum*, especies de *Neurospora*, especies de *Rhizomucor*, especies de *Rhizopus*, especies de *Ustilago*, especies de *Tolypocladium*, especies de *Mizukabi*, especies de *Spinellus*, especies de *Cladosporium*, especies de *Alternaria*, especies de *Botrytis*, especies de *Monilia*, especies de *Manosculus*, especies de *Mortierella*, especies de *Oidium*, especies de *Oosproa*, especies de *Thamnidium*, especies de *Candida*, especies de *Saccharomyces*, especies de *Trichophyton*.

Además, estas muestras se exploran con frecuencia con respecto a organismos indicadores incluyendo, pero sin limitación, coliformes, coliformes fecales, *E. coli*, *Enterobacteriaceae*, especies de *Enterococcus*, colifagos o bacteriófagos.

Adicionalmente, algunas muestras se exploran con respecto a cepas resistentes a antibióticos clínicamente significativas de microorganismos, incluyendo, pero sin limitación, *S. aureus* resistentes a meticilina y especies de *Enterococcus* resistentes a vancomicina.

Los microorganismos que pueden detectarse de acuerdo con disposiciones de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, bacterias Gram negativas, bacterias Gram positivas, bacterias Gram positivas acidorresistentes y hongos, incluyendo levaduras. Los microorganismos bacterianos y fúngicos representativos, es decir, antígenos, que son dianas para los ensayos de cultivo sanguíneo desvelados por la presente se proporcionan inmediatamente a continuación en el presente documento, de acuerdo con una disposición. Como se observa en otra parte del presente documento, los anticuerpos que tienen especificidad por los antígenos presentados inmediatamente a continuación en el presente documento pueden incluir pero sin limitación, anticuerpos policlonales, monoclonales, Fab', Fab'', recombinantes, anticuerpos monocatenarios (SCA), anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos. En todos los casos, el anticuerpo tendrá una o más CDR específicas para el antígeno enumerado inmediatamente a continuación en el presente documento. Se conocen en la técnica anticuerpos y están disponibles fácilmente para antígenos seleccionados. En algunos casos, los antígenos están presentes en la superficie celular. En otros casos, los antígenos se secretan de la célula y están presentes en el medio de cultivo sanguíneo como "antígeno libre". En otros casos más, pueden medirse antígeno tanto libre como unido simultáneamente para confirmar una bacteriemia o fungemia.

Independientemente de la información de diagnóstico que se busque en el vaso de cultivo, un miembro de unión específica tendrá con frecuencia especificidad amplia. Los miembros de unión específica pueden ser pancepa, panserogrupo, panespecie o pangénero.

La pared celular bacteriana es una estructura compleja, semirrígida, que define la forma del organismo, rodea la membrana citoplasmática frágil subyacente y protege a la célula bacteriana del ambiente externo. La pared celular bacteriana está compuesta por una red macromolecular conocida como peptidoglucano, que comprende carbohidratos y polipéptidos que forman una red alrededor de la célula bacteriana. La pared celular bacteriana proporciona la estabilidad mecánica para la célula bacteriana y evita la lisis osmótica. De forma más relevante para la presente divulgación, lo que se usa para diferenciar las principales especies de bacterias es la composición química de la célula.

Las paredes celulares de diferentes especies de bacterias pueden diferir en gran medida en el grosor, la estructura y la composición. Sin embargo, existen dos tipos predominantes de pared celular bacteriana y si una especie dada de bacteria tiene uno o el otro tipo de pared celular puede determinarse en general por la reacción de la célula a ciertos colorantes. Quizás el colorante más ampliamente usado para teñir bacterias sea la tinción de Gram. Cuando se tiñen con esta tinción de violeta en cristal y yodo, las bacterias que conservan la tinción se denominan Gram positivas y las que no, se denominan Gram negativas.

Como se usa en el presente documento, por "bacterias Gram positivas" se entiende una cepa, un tipo, una especie o un género de bacteria que, cuando se expone a tinción de Gram, conserva el colorante y se tiñe, por lo tanto, de color azul-púrpura.

Como se usa en el presente documento, por "bacterias Gram negativas" se entiende una cepa, un tipo, una especie o un género de bacteria que, cuando se expone a tinción de Gram no conserva el colorante y, por lo tanto, no se tiñe de color azul-púrpura. El practicante experto habitual reconocerá, por supuesto, que dependiendo de la concentración del colorante y de la longitud de exposición, una bacteria Gram negativa puede captar una ligera cantidad de tinción de Gram y teñirse con un color azul-púrpura claro. Sin embargo, en comparación con una bacteria Gram positiva teñida con la misma formulación de tinción de Gram durante la misma cantidad de tiempo, una bacteria Gram negativa tendrá un color azul-púrpura mucho más claro en comparación con una bacteria Gram positiva.

Las bacterias Gram negativas representativas incluyen, pero sin limitación, bacterias en la familia *Enterobacteriaceae*. Las bacterias Gram negativas representativas en la familia *Enterobacteriaceae* incluyen, pero sin limitación, bacterias en el género *Escherichia*, tal como especie *E. coli* (modelo). Los miembros de unión adecuada, por ejemplo, anticuerpos, que tienen una afinidad por bacterias Gram negativas en la familia *Enterobacteriaceae* incluyen, pero sin limitación, los anticuerpos que se unen específicamente con el lipopolisacárido (LPS) o la proteína de membrana externa (OMP). El componente de Lípido A de LPS, la región O de LPS y el núcleo de LPS que tiene regiones de

núcleo interna y externa pueden actuar como antígenos adecuados para miembros de unión específicos que tienen una afinidad por bacterias Gram negativas en el género *Escherichia*.

Los miembros representativos del género *Escherichia* incluyen: *E. adecarboxylata*, *E. albertii*, *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* y *E. vulneris*.

Otro género representativo dentro de la familia *Enterobacteriaceae* es el género *Klebsiella*, incluyendo pero sin limitación, *Klebsiella pneumoniae* (modelo). Los miembros de unión adecuados, por ejemplo, anticuerpos, que tienen una afinidad por bacterias Gram negativas en el género *Klebsiella* incluyen, pero sin limitación, los que se unen específicamente con LPS, polisacárido capsular (CPS) o antígenos K (polisacárido capsular de alto peso molecular con un peso molecular de aproximadamente 50 a aproximadamente 70 kDa) u OMP.

Los miembros representativos del género *Klebsiella* incluyen *K. granulomatis*, *K. mobilis*, *K. ornithinolytica*, *K. oxytoca*, *K. ozaenae*, *K. planticola*, *K. pneumoniae*, *K. rhinoscleromatis*, *K. singaporensis*, *K. terrigena*, *K. trevisanii* y *K. varriicola*.

Las bacterias Gram negativas también incluyen bacterias que pertenecen a la familia *Chlamydiaceae*. Las bacterias Gram negativas representativas en la familia de *Chlamydiaceae* incluyen, pero sin limitación, bacterias en el género *Chlamydia*, tales como la especie *C. trachomatis* (modelo). Los miembros de unión adecuados, por ejemplo, anticuerpos, que tienen una afinidad por bacterias Gram negativas en la familia *Chlamydiaceae* incluyen, pero sin limitación, los que se unen específicamente con lipopolisacárido (LPS) o proteína de la membrana externa (OMP), incluyendo proteína de la membrana externa principal (MOMP).

Los miembros representativos del género *Chlamydia* incluyen: *C. muridarum*, *C. suis* y *C. trachomatis*.

Las bacterias Gram negativas adecuadas también pueden incluir las que están dentro del género *Pseudomonas*, incluyendo pero sin limitación *P. aeruginosa* (modelo), el género *Stenotrophomonas*, incluyendo pero sin limitación, *S. maltophilia* (modelo) y el género *Acinetobacter*, incluyendo pero sin limitación *A. baumannii* (modelo). Los antígenos adecuados que son reconocidos por miembros de unión específicos con afinidad por bacterias Gram negativas dentro del género *Pseudomonas* incluyen, pero sin limitación, LPS, OMP, proteínas de membrana reguladas por hierro (IRMP), flagelos, exopolisacárido mucoide (MEP) y proteína de membrana externa F (OprF). Los antígenos adecuados que son reconocidos por miembros de unión específicos con afinidad por bacterias Gram negativas dentro del género *Stenotrophomonas* incluyen, pero sin limitación, LPS, flagelos, proteasa extracelular principal, OMP, la proteína expuesta de 30 kDa que se une con el Fc IgG, y la proteína de membrana de 48,5 kDa. Los antígenos adecuados que son reconocidos por miembros de unión específicos con afinidad por bacterias Gram negativas dentro del género *Acinetobacter* incluyen, pero sin limitación, LPS, LPS con D-ramos, Bap (factor asociado a biopelícula), polisacárido capsular (CPS) y OMP.

Las bacterias Gram positivas representativas incluyen, pero sin limitación, bacterias en la familia de *Micrococcaceae*. Las bacterias Gram positivas en la familia *Micrococcaceae* incluyen, pero sin limitación, bacterias en el género *Staphylococcus*, incluyendo la especie *S. epidermidis* (modelo). Los miembros de unión adecuados, por ejemplo, anticuerpos, que tienen una afinidad por bacterias Gram positivas, incluyen, pero sin limitación, los que se unen específicamente con Ácido Lipoteicoico (LTA), peptidoglucano, antígenos de biopelícula, incluyendo antígenos de biopelícula de 140/2200 kDa y polisacárido de 20 kDa (PS) o Lípido S (glicerofosfolipídico). Otros miembros de unión adecuados que tienen una afinidad por bacterias Gram positivas en el género *Staphylococcus*, incluyendo pero sin limitación *S. aureus*, incluyen los que se unen específicamente con ácido teicoico, componentes de superficie microbiana que reconocen moléculas de matriz de adhesión (MSCRAMMS), determinante A de superficie sensible a hierro (IsdA), las proteínas de 110 kDa, 98 kDa y 67 kDa, proteína activadora de ARNIII (RAP), diana de la proteína activadora de ARNIII (TRAP), toxina alfa, poli-n-succinil beta-1-6-glucosamina (PNSG), lipasa, estafilolisina, FnBPA, FnBPB, antígeno estafilocócico inmunodominante, polisacárido capsular o el antígeno de superficie celular asociado con resistencia a meticilina.

Los miembros representativos del género *Staphylococcus* incluyen: *S. aureus*, *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. felis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. intermedius*, *S. lugdunensis*, *S. pettenkoferi*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi*, *S. simulans*, *S. vitulus*, *S. warneri* y *S. xylosus*.

Otras bacterias Gram positivas representativas incluyen bacterias en el género *Enterococcus*, incluyendo, pero sin limitación, *E. faecalis* (también conocida como *Streptococcus* del Grupo D) y *E. faecium*. Los miembros de unión adecuados, por ejemplo, anticuerpos, que tienen una afinidad por *E. faecalis* incluyen, pero sin limitación, los que se unen específicamente con ácido lipoteicoico (LTA), antígeno de superficie de unión a colágeno (CNA), sustancia de agregación (AS), polisacárido capsular, polisacárido capsular de tipo ácido teicoico, producto génico de Esp, GlS24, producto génico de Epa, Ace (agente de unión de ECM) o peptidoglucano. Los miembros de unión adecuados, por ejemplo, anticuerpos, que tienen una afinidad por *E. faecalis* incluyen, pero sin limitación, los que se unen específicamente con proteína ACM (agente de unión de colágeno) o proteína SagA.

Las bacterias Gram positivas acidorresistentes representativas incluyen, pero sin limitación, bacterias en la familia

Mycobacteriaceae. Las bacterias Gram positivas acidorresistentes en la familia *Mycobacteriaceae* incluyen, pero sin limitación, bacterias en el género *Mycobacterium*, tal como la especie *M. bovis* (modelo) y la especie *M. tuberculosis* (modelo). Los miembros de unión adecuados, por ejemplo, anticuerpos, que tienen una afinidad por bacterias Gram positivas acidorresistentes, incluyen pero sin limitación, las que se unen específicamente con arabinomanona (AM), lipoarabinomanona (LAM) o el antígeno de 38 kDa.

Los miembros representativos del género *Mycobacterium* incluyen: *M. abscessus*, *M. africanum*, *M. agri*, *M. aichiense*, *M. alvei*, *M. arupense*, *M. asiaticum*, *M. aubagnense*, *M. aurum*, *M. austroafricanum*, complejo de *Mycobacterium avium* (MAC), incluyendo, *M. avium*, *M. avium paratuberculosis*, *M. avium silvaticum*, *M. avium "hominissuis"*, *M. boenickei*, *M. bohemicum*, *M. bolletii*, *M. botniense*, *M. bovis*, *M. branderi*, *M. brisbanense*, *M. brumae*, *M. canariense*, *M. caprae*, *M. celatum*, *M. chelonae*, *M. chimaera*, *M. chitae*, *M. chlorophenicum*, *M. chubuense*, *M. colombiense*, *M. conceptionense*, *M. confluentis*, *M. conspicuum*, *M. cookii*, *M. cosmeticum*, *M. diernhoferi*, *M. doricum*, *M. duvalii*, *M. elephantis*, *M. fallax*, *M. farcinogenes*, *M. flavescens*, *M. florentinum*, *M. fluoroanthronivorans*, *M. fortuitum*, *M. fortuitum* subsp. *acetamidolyticum*, *M. frederiksbergense*, *M. gadium*, *M. gastri*, *M. genavense*, *M. gilvum*, *M. goodii*, *M. gordonae*, *M. haemophilum*, *M. hassiacum*, *M. heckeshornense*, *M. heidelbergense*, *M. hiberniae*, *M. hodleri*, *M. holsaticum*, *M. houstonense*, *M. immunogenum*, *M. interjectum*, *M. intermedium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. komossense*, *M. kubicae*, *M. kumamotonense*, *M. lacus*, *M. lentiflavum*, *M. leprae*, *M. lepraemurium*, *M. madagascariense*, *M. mageritense*, *M. malmoense*, *M. marinum*, *M. massiliense*, *M. microti*, *M. monacense*, *M. montefiorensense*, *M. morioakaense*, *M. mucogenicum*, *M. murale*, *M. nebraskense*, *M. neoaurum*, *M. neworleansense*, *M. nonchromogenicum*, *M. novocastrense*, *M. obuense*, *M. palustre*, *M. parafortuitum*, *M. parascrofulaceum*, *M. parmense*, *M. peregrinum*, *M. phlei*, *M. phocaicum*, *M. pinnipedii*, *M. porcinum*, *M. poriferae*, *M. pseudoshottsii*, *M. pulveris*, *M. psychrotolerans*, *M. pyrenivorans*, *M. rhodesiae*, *M. saskatchewanense*, *M. scrofulaceum*, *M. senegalense*, *M. seoulense*, *M. septicum*, *M. shimoidei*, *M. shottsii*, *M. simiae*, *M. smegmatis*, *M. sphagni*, *M. szulgai*, *M. terrae*, *M. thermoresistibile*, *M. tokaiense*, *M. triplex*, *M. triviale*, complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), incluyendo *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. tusciae*, *M. ulcerans*, *M. vaccae*, *M. vanbaalenii*, *M. wolinskyi* y *M. xenopi*.

Los hongos representativos, incluyendo levaduras, incluyen, pero sin limitación, la familia *Saccharomycetaceae*, incluyendo el género *Candida*, tal como con *C. albicans* (modelo). Los miembros de unión adecuados, por ejemplo, anticuerpos, que tienen una afinidad por hongos que pertenecen al género *Candida* incluyen, pero sin limitación, los que se unen específicamente con manano, fosfomanano, manoproteína 58 (mp58), galactomanano, beta-D-glucano, metaloabinol, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa asociada a la pared celular, Enolasa -(47/48 kDa), Aspartil Proteinasa Secretada (SAP) o proteína de choque térmico 90 (HSP-90).

Los miembros representativos del género *Candida* incluyen: *C. aaseri*, *C. albicans*, *C. amapae*, *C. anatomiae*, *C. ancudensis*, *C. antillanae*, *C. apicola*, *C. apis*, *C. atlantica*, *C. atmosphaerica*, *C. auringiensis*, *C. austromarina*, *C. azyma*, *C. beechii*, *C. bertae*, *C. berthetii*, *C. blankii*, *C. boidinii*, *C. boleticola*, *C. bombi*, *C. bombicola*, *C. buinensis*, *C. butyri*, *C. cantarellii*, *C. caseinolytica*, *C. castellii*, *C. castrensis*, *C. catenulata*, *C. chilensis*, *C. chiropterorum*, *C. chodatii*, *C. ciferrii*, *C. coipomoensis*, *C. conglobata*, *C. cylindracea*, *C. dendrica*, *C. dendronema*, *C. deserticola*, *C. diddensiae*, *C. diversa*, *C. drimydis*, *C. dubliniensis*, *C. edax*, *C. entomophila*, *C. ergastensis*, *C. ernobii*, *C. ethanolica*, *C. euphorbiae*, *C. euphorbiophila*, *C. fabianii*, *C. famata*, *C. famata* var. *famata*, *C. famata* var. *flareri*, *C. fennica*, *C. fermenticarens*, *C. firmetaria*, *C. floricola*, *C. fluvialis*, *C. freyschussii*, *C. friedrichii*, *C. fructus*, *C. galacta*, *C. geochares*, *C. glabrata*, *C. glaeobosa*, *C. glucosophila*, *C. gropengiesseri*, *C. guilliermondii*, *C. guilliermondii* var. *guilliermondii*, *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens*, *C. haemulonii*, *C. homilientoma*, *C. humilis*, *C. incommunis*, *C. inconspicua*, *C. insectalens*, *C. insectamans*, *C. insectorum*, *C. intermedia*, *C. ishiwadae*, *C. karawaiewii*, *C. kefyr*, *C. krissii*, *C. kruisii*, *C. krusei*, *C. lactiscondensi*, *C. laureliae*, *C. lipolytica*, *C. llanquihuensis*, *C. lodderae*, *C. lusitaniae*, *C. lyxosophila*, *C. magnoliae*, *C. maltosa*, *C. maris*, *C. maritima*, *C. melibiosica*, *C. membranaefaciens*, *C. mesenterica*, *C. methanosorbosa*, *C. milleri*, *C. mogii*, *C. montana*, *C. multigemmis*, *C. musae*, *C. naeodendra*, *C. natalensis*, *C. nemodendra*, *C. norvegensis*, *C. norvegica*, *C. odintsovae*, *C. oleophila*, *C. oregonensis*, *C. ovalis*, *C. palmioleophila*, *C. paludigena*, *C. parapsilosis*, *C. pararugosa*, *C. pelliculosa*, *C. peltata*, *C. petrohuensis*, *C. pignaliae*, *C. pini*, *C. populi*, *C. pseudointermedia*, *C. pseudolambica*, *C. psychrophila*, *C. pulcherrima*, *C. quercitrusa*, *C. quercuum*, *C. railenensis*, *C. reukauffii*, *C. rhagii*, *C. robusta*, *C. rugopelliculosa*, *C. rugosa*, *C. saitoana*, *C. sake*, *C. salda*, *C. salmanticensis*, *C. santamariae*, *C. santjacobensis*, *C. savonica*, *C. schatavii*, *C. sequanensis*, *C. shehatae*, *C. shehatae* var. *Insectosa*, *C. shehatae* var. *lignosa*, *C. shehatae* var. *shehatae*, *C. silvae*, *C. silvanorum*, *C. silvatica*, *C. silvicultrix*, *C. solani*, *C. sonorensis*, *C. sophiaereginae*, *C. sorbophila*, *C. sorbosa*, *C. sorboxylosa*, *C. spandovensis*, *C. stellata*, *C. succiphila*, *C. suecica*, *C. tanzawaensis*, *C. tapae*, *C. techellsii*, *C. tenuis*, *C. torresii*, *C. tropicalis*, *C. tsuchiya*, *C. utilis*, *C. vaccini*, *C. valdiviana*, *C. valida*, *C. vanderwaltii*, *C. vartiovaarae*, *C. versatilis*, *C. vini*, *C. viswanathii*, *C. wickerhamii*, *C. xestobii* y *C. zeylanoides*.

También pueden usarse anticuerpos terapéuticos tales como Aurograb™ con especificidad por las cepas de *S. aureus* resistente a metilina (MRSA) en superficies de captura o indicadoras. De forma similar, el anticuerpo monoclonal (mab) terapéutico Myograb™ (Efungumab) con una especificidad por la Proteína de choque Térmico HSP90 puede usarse para detección de *C. albicans*.

Las partículas indicadoras SERS activas desveladas por la presente memoria pueden distinguirse de los muchos otros materiales ópticamente activos que pueden estar presentes en un ambiente de cultivo, tales como componentes de

medios de cultivo usados para dar soporte al crecimiento, sangre completa, anticoagulante SPS, partículas alimentarias y aditivos. Además, las partículas indicadoras SERS activas específicas muestran la intensidad de señal necesaria para permitir la detección de cantidades pequeñas de células bacterianas. Adicionalmente, una diversidad de partículas indicadoras SERS activas, que tienen cada una una identificación de SERS única, permiten explorar

- 5 muestras de cultivo sanguíneo con respecto a uno cualquiera de una pluralidad de microorganismos (por ejemplo, veinte) que puede encontrarse típicamente en sangre de mamífero, por ejemplo, humana. En dichas disposiciones, la detección de cada microorganismo particular puede realizarse simultáneamente, lo que se denomina en el presente documento "ensayo múltiple".
- 10 De acuerdo con una disposición, por ejemplo, el cultivo sanguíneo, las dianas primarias para los ensayos múltiples desvelados por la presente incluyen: *Staphylococcus* Coagulasa negativos, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. faecium*, estreptococos del grupo Viridans, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Citrobacter freundii*, *Streptococcus pyogenes* y
- 15 *Enterococcus avium*. Dichas múltiples dianas pueden detectarse simultáneamente, en algunas disposiciones, por un ensayo múltiple desvelado por la presente.

IV. Medios de cultivo representativos

- 20 Se proporcionan medios de cultivo representativos adecuados para su uso con disposiciones de la presente divulgación inmediatamente a continuación en el presente documento. Un experto habitual en la materia reconocerá que las formulaciones desveladas por la presente pueden modificarse para cumplir requisitos de rendimiento específicos. Adicionalmente, estas formulaciones, dependiendo de la aplicación particular, pueden tener dispuestas en las mismas, CO₂, O₂, N₂ y combinaciones de los mismos, para crear un ambiente adecuado para crecimiento
- 25 aeróbico, anaeróbico o microaerófilico. Opcionalmente, algunos medios de cultivo contienen adsorbentes para aislar, es decir, retirar, del medio de cultivo, interferentes, tales como antibióticos o elementos inmunitarios que pueden estar presentes en una muestra de sangre de un sujeto o metabolitos producidos durante el cultivo. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 5.624.814, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Por ejemplo, el Medio BD BACTEC™ Plus Anaeróbico/F, BD BACTEC™ Plus Aeróbico/F y BD BACTEC™ PEDS
- 30 Plus/F, cada uno de los cuales está disponible de Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, Nueva Jersey, contienen todas resinas para aislar antibióticos que de otro modo pueden inhibir el crecimiento microbiano en el medio de cultivo sanguíneo. Las resinas tienen un diámetro sustancialmente mayor que cualquier componente de la sangre y son más rígidas que las células de mamífero halladas en sangre. Otro ejemplo de un absorbente de cultivo es el carbonato cálcico precipitado (1 % - 2,5 % p/v) hallado en diversas formulaciones de Caldo de cultivo de Tetratiónato
- 35 usadas para cultivar selectivamente *Salmonella* en muestras alimentarias y ambientales. Las partículas de carbonato cálcico neutralizan el ácido sulfúrico producido por la reducción del tetratiónato cultivando *Salmonella*.

A. Viales de cultivo lítico BD BACTEC™ Myco/F

- 40 Los Viales de Cultivo Lítico BD BACTEC™ Myco/F soportan el crecimiento y la detección de microorganismos aeróbicos. Más particularmente, los Viales de Cultivo Lítico BD BACTEC™ Myco/F son medios de cultivo no selectivo para usar como un complemento al medio de cultivo sanguíneo aeróbico para la recuperación de micobacterias de muestras de ensayo sanguíneas y levadura y hongos de sangre y fluidos corporales estériles.
- 45 *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y micobacterias distintas de tuberculosis (MOTT), especialmente el complejo de *Mycobacterium avium* (MAC), están reapareciendo. Desde 1985 a 1992, el número de casos de MTB presentados aumentaron un 18 %. Entre 1981 y 1987, la vigilancia de casos de SIDA indicó que el 5,5 % de los pacientes con SIDA tenían infecciones micobacterianas no tuberculosas diseminadas, por ejemplo, MAC. En 1990, los casos aumentados de infecciones micobacterianas no tuberculosas diseminadas habían dado como resultado una incidencia acumulativa de 7,6 %. La incidencia de fungemia también ha aumentado constantemente desde principios de los años ochenta.
- 50 Estos aumentos han elevado la necesidad de procedimientos diagnósticos eficaces para fungemia y micobacteriemia.

Los componentes de las formulaciones desveladas por la presente pueden incluir, pero sin limitación, citrato de amonio férrico o un equivalente que proporciona una superficie de hierro para cepas específicas de micobacterias y hongos,

55 saponina o un agente de lisis sanguíneo equivalente y proteínas específicas y azúcares para proporcionar complementos nutricionales.

B. Viales de cultivo de micobacterias BD BACTEC™ 12B Middlebrook 7H12

- 60 El Medio de Micobacterias cualitativo BACTEC™ 12B puede usarse para el cultivo y la recuperación de micobacterias de muestras de ensayo clínicas, esputo, muestras de ensayo gástricas, orina, tejido, muestras de ensayo mucopurulentas, otros fluidos corporales y otras secreciones respiratorias, diferenciación del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* de otras micobacterias y ensayos de susceptibilidad farmacológica de *M. tuberculosis*.

- 65 C. Viales de cultivo BACTEC™ LÍTICO/10 Anaeróbico/F

El Medio BACTEC™ LÍTICO/10 Anaeróbico/F también es adecuado para disposiciones de la presente divulgación.

D. Caldo de digestión de caseína de soja de viales de cultivo BACTEC™ Plus Aeróbico/F y Plus Anaeróbico/F**

- 5 Los Medios BACTEC™ Plus Aeróbico/F y Plus Anaeróbico/F proporcionan un procedimiento cualitativo para el cultivo y la recuperación de microorganismos (bacterias y levadura) de sangre y se han formulado para permitir la adición de hasta 10 ml de sangre. La adición de estos volúmenes de muestra mayores da como resultado tasas de detección generales mayores y tiempos más tempranos hasta la detección.

10 *E. Digestión de caseína de soja de viales de cultivo BD BACTEC™ convencional anaeróbico/F*

El Caldo de Digestión de Caseína de Soja de Viales de Cultivo BD BACTEC™ Convencional Anaeróbico/F proporciona un procedimiento cualitativo para el cultivo y la recuperación de microorganismos anaeróbicos de sangre.

15 *F. Viales de cultivo BD BACTEC™ PEDS PLUS™/F*

- Se pretende usar los viales de cultivo BACTEC™ tipo PEDS PLUS™/F (Caldo de Digestión de Caseína de Soja enriquecido con CO₂) para cultivos aeróbicos y posibilitar el cultivo y la recuperación de microorganismos aeróbicos (principalmente bacterias y levaduras) de muestras de ensayo pediátricas y otras sanguíneas que son en general de menos de 3 ml de volumen.

G. Viales de cultivo convencional/10 aeróbico/F

- 25 Se pretende usar viales de cultivo BACTEC™ Convencional/10 Aeróbico/F (caldo de Digestión de Caseína de soja enriquecido con CO₂) en cultivos de sangre aeróbicos y posibilitar el cultivo y la recuperación de microorganismos aeróbicos (bacterias y levaduras) de la sangre.

H. Viales de cultivo BacT/ALERT™

- 30 Se pretende usar viales de cultivo BacT/ALERT™ FAN, BacT/ALERT™ FN y BacT/ALERT™ SN (bioMérieux, Durham, NC) en cultivos sanguíneos anaeróbicos y posibilitar el cultivo y la recuperación de microorganismos anaeróbicos (bacterias y levadura) de sangre.

I. Medios de cultivo selectivo de E. coli

- 35 El agua de peptona tamponada modificada con piruvato (mBPWp) y Complemento de Acriflavina-Cefsulodina-Vancomicina (ACV) es un medio prescrito por el Manual Analítico Bacteriológico (BAM) de la FDA para enriquecer muestras para la detección de *Escherichia coli* diarreagénicas.

40 *J. Medios de cultivo selectivos de Listeria*

- Se usan Base de Caldo de Cultivo Frasier y Complemento de Caldo de Cultivo Fraser para enriquecer y detectar selectivamente especies de *Listeria*. El Manual del Laboratorio Microbiológico (MLG) de la USDA recomienda el uso de Caldo de Cultivo Fraser cuando se ensaya con respecto a *L. monocytogenes* en muestras de carne roja, aves, huevos y ambientales (USDA MLG Capítulo 8.07, revisado el 3/8/09).

K. Medios de cultivo selectivos de Salmonella

- 50 El Caldo de Cultivo Base de Tetrionato, Hajna es un medio diseñado para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella*. El tetrionato se genera por la adición de yodo y yoduro de potasio justo antes del enriquecimiento. El Manual del Laboratorio Microbiológico de USDA estipula este caldo de cultivo para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella* en productos de carne, aves, huevos pasteurizados y siluro (USDA MLG Capítulo 4.05, revisado 20/1/11).

L. Medio de cultivo de Salmonella

- 55 Además de los medios de cultivo enumerados anteriormente, existen varios caldos de cultivo conocidos habitualmente en la técnica para cultivar o mantener *Salmonella*, incluyendo, pero sin limitación, Caldo de Infusión de Corazón y Cerebro, enriquecimiento de Sulfa Verde Brillante (BD Difco™), Caldo de Cultivo Verde Brillante modificado (BD Difco™), Agua de Peptona Tamponada (BD Difco™), Agua de Caseína de Peptona Tamponada (BD Difco™), Caldo de Cultivo Dey-Engly (BD Difco™), enriquecimiento de Mossel de Caldo de Cultivo EE (BD Difco™), Caldo de Cultivo Gram Negativo (BD Difco™), Caldo de Cultivo Gram Negativo Hajna (BD Difco™), Caldo de Cultivo de Lactosa (BD Difco™), Caldo de Cultivo de Lethen (BD Difco™), Caldo de Cultivo de Lisina Descarboxilasa, Caldo de Cultivo M (BD Difco™), Caldo de Cultivo de Malonato (BD Difco™), Caldo de Cultivo MR-VP, Caldo de Cultivo Nutritivo, Caldo de Cultivo One-Salmonella (Oxoid), Caldo de Cultivo de Carbohidrato de Rojo Fenol (BD BBL™), Caldo de Cultivo de Cianuro de Potasio, Caldo de Cultivo de Carbohidrato Púrpura (BD BBL™), medio primario de *Salmonella* RapidChek® (SDIX), medio primario de *Salmonella* con complemento RapidChek® SELECT™ (SDIX), medio secundario de

Salmonella RapidChek® SELECT™ (SDIX), Medio Rappaport-Vassiliadis, Medio Rappaport-Vassiliadis modificado, Caldo de Cultivo de Rappaport-Vassiliadis R10 (BD Difco™), Caldo de Cultivo de Soja de *Salmonella* Rappaport-Vassiliadis (RVS) (BD Difco™), Caldo de Cultivo de Peptona de Soja Rappaport-Vassiliadis, Caldo de Cultivo de Selenita (BD Difco™), Caldo de Cultivo de Selenita F (BD BBL™), Caldo de Cultivo de Cistina de Selenita (BD Difco™),

5 Caldo de Cultivo de Tetracionato, Caldo de Cultivo de Tetracionato (Hajna), Caldo de Cultivo de Tripton, Caldo de Cultivo de Tripticasa de Soja, Caldo de Cultivo de Tripticasa de Soja con sulfato ferroso, Caldo de Cultivo Preenriquecimiento Universal, Caldo de Cultivo Preenriquecimiento Universal sin citrato de amonio férrico y Caldo de Cultivo de Urea.

10 *M. Medio de Cultivo de Listeria*

Además de los medios de cultivo enumerados anteriormente, existen varios caldos de cultivo conocidos habitualmente en la técnica para cultivo o mantenimiento de *Listeria*, incluyendo, pero sin limitación, Caldo de Cultivo de Infusión de Corazón y Cerebro (BHI), Caldo de Enriquecimiento de *Listeria* Tamponado (BLEB), Caldo de Cultivo Nutritivo, base

15 de caldo de cultivo de fermentación de carbohidratos Púrpura (M130¹⁵), que contiene soluciones al 0,5 % de dextrosa, esculina, maltosa, ramnosa, manitol y xilosa, medio SIM, caldo de cultivo de Tripticasa de soja con extracto de levadura al 0,6 %, Caldo de Cultivo de Triptosa, Caldo de Cultivo de la Universidad de Vermont Modificado (UVM), Caldo de Cultivo de enriquecimiento de *Listeria* tamponado con ácido Morfolinopropanosulfónico (MOPS-BLEB), Demi Frasier, caldo de cultivo de Fraser, caldo de cultivo de enriquecimiento de *Listeria* (BD Difco™, Oxoid), Caldo de Cultivo One de *Listeria* (Oxoid), medio de *Listeria* RapidChek® con complemento (SDIX) y medio de *Listeria* RapidChek® FAST™ (SDIX).

V. Muestras representativas

25 La cantidad de uno o más microorganismos presentes en una muestra que se ensaya puede representarse como una concentración. La concentración puede expresarse como un valor cualitativo, por ejemplo, como un resultado de tipo negativo o positivo, por ejemplo, una respuesta de "SÍ" o "NO", que indica la presencia o ausencia de un microorganismo, o como un valor cuantitativo. Además, la concentración de un microorganismo dado en una muestra de cultivo puede presentarse como una cantidad relativa o una cantidad absoluta, por ejemplo, como un "valor

30 cuantitativo".

La cantidad (es decir, concentración) de un microorganismo puede ser igual a cero, lo que indica la ausencia del analito particular que se busca o que la concentración del analito particular está por debajo de los límites de detección del ensayo. La cantidad medida puede ser la señal, por ejemplo, una señal de SERS, sin ninguna medición o

35 manipulación adicional. Como alternativa, la cantidad medida puede expresarse como una diferencia, un porcentaje o una relación del valor medido del microorganismo particular con respecto a un valor medido de otro compuesto incluyendo, pero sin limitación, un patrón u otro microorganismo. La diferencia puede ser negativa, lo que indica una reducción en la cantidad de microorganismo o microorganismos medidos. Las cantidades también pueden expresarse como una diferencia o relación de microorganismo o microorganismos consigo mismos, medida en un punto temporal

40 diferente. Las cantidades de microorganismo pueden determinarse directamente a partir de una señal generada, o la señal generada puede usarse en un algoritmo, con el algoritmo diseñado para correlacionar el valor de las señales generadas con la cantidad de microorganismo o microorganismos en la muestra. Como se ha analizado anteriormente, algunas disposiciones de la presente invención son susceptibles de uso con dispositivos capaces de medir las concentraciones de uno o más microorganismos en tiempo real.

45

Ejemplos

Los siguientes Ejemplos se han incluido para proporcionar orientación a un experto en la materia para practicar disposiciones representativas de la materia objeto desvelada por la presente. A la luz de la presente divulgación y el

50 nivel general de experiencia en la técnica, los expertos pueden apreciar que se pretende que los siguientes Ejemplos sean solamente ejemplares y que puedan emplearse numerosos cambios, modificaciones y alteraciones sin alejarse del alcance de la materia objeto desvelada por la presente. Los siguientes ejemplos se presentan como ilustración y no como limitación.

55 **Ejemplo 1**

Efecto de reactivos de SERS HNW en el tiempo hasta la detección para *E. coli*

La Figura 54 muestra el resultado de un experimento en el que el tiempo hasta la detección de crecimiento de *E. coli*

60 se comparó para muestras de cultivo sanguíneo con y sin los reactivos de SERS HNW adecuados para su uso en las diversas disposiciones.

En este ejemplo, se esterilizaron partículas indicadoras SERS activas no conjugadas (marcadores de SERS 440) y partículas de captura magnética no conjugadas (perlas Dynal®) lavando con etanol al 70 %. Las partículas indicadoras

65 SERS activas esterilizadas y partículas de captura magnética se añadieron después a frascos de Medio BACTEC™ Convencional/10 Aeróbico/F inoculadas con *E. coli*. El tiempo hasta la detección para crecimiento de *E. coli* por un

sensor BACTEC™ 9050 se comparó para frascos con y sin los reactivos de ensayo de HNW. Los frascos BACTEC™ sin *E. coli* pero con y sin los reactivos de ensayo de HNW se incluyeron como controles negativos. Como puede verse, el tiempo hasta la detección de BACTEC™ no se vio afectado por la presencia de las partículas indicadoras SERS activas y partículas magnéticas en este experimento. Por lo tanto los reactivos de ensayo de SERS HNW no influyen significativamente en la capacidad de un microorganismo para crecer.

Ejemplo 2

La sedimentación repetida es compatible con el crecimiento de microorganismos

La Figura 55 muestra el resultado de un experimento en el que el crecimiento de *Salmonella* Typhimurium se supervisó durante el transcurso de un experimento para determinar si la sedimentación afecta negativamente al crecimiento del organismo.

En este ejemplo, se cultivó *S. Typhimurium* (ATCC 14028) en un cultivo de una noche en medio primario Select de *Salmonella* SDIX con complemento a 42 °C. Se realizó una dilución 1:100 en Medio Secundario de *Salmonella* SDIX. Se determinó que la inoculación de partida en medio secundario era de $1,8 \times 10^7$ ufc/ml por recuento de placas en placas de agar Nutritivo. El medio secundario inoculado se puso después en múltiples tubos, que contenían todos marcadores de SERS y partículas magnéticas conjugadas con anticuerpos de *Salmonella* SDIX. Los tubos se colocaron en el sistema 150 (véase Figura 24) para supervisión durante el cultivo a 42 °C. Los tubos se sedimentaron y se exploraron cada 0,5 horas durante el crecimiento. En este experimento, los tubos se retiraron del instrumento después de 1, 3, 6, 9 y 11 ciclos de sedimentación y lectura. Estos tubos se enumeraron por siembra de diluciones en placas de agar Nutritivo. Como puede verse, el crecimiento de *S. Typhimurium* no se ve comprometido por la presencia de marcadores de SERS y partículas magnéticas, ni está comprometido por la sedimentación y exploración repetidas del sedimento por el láser.

Ejemplo 3

Efecto de ajuste de la frecuencia de sedimentación

En un experimento que examinaba el efecto de la sedimentación repetida en el crecimiento de microorganismos y el rendimiento del ensayo, se seleccionó una única colonia de *Salmonella* Kentucky (ATCC 9263) de una placa sembrada en estrías de Agar Nutritivo BD BBL™ y se cultivó durante una noche a 42 °C en 6 ml de medio de cultivo primario SELECT™ de *Salmonella* SDIX RapidChek® de 6 ml con 60 µl de complemento de fago. Después del cultivo primario, se prepararon 5 ml de un medio de cultivo secundario, que consistía en 90 % de medio secundario y 10 % de medio primario SELECT™ de *Salmonella* SDIX RapidChek®. En paralelo, se preparó una dilución 1:100 de cultivo primario en el medio primario, y se inocularon 125 µl de esa dilución en un tubo BD MGIT™ que contenía los 5 ml de medio secundario, 16 µl de marcadores de SERS y 20 µl de perlas magnéticas. La dilución resultante de 1:4000 de la concentración final del cultivo primario produjo una concentración de inoculación aproximada de $2,5 \times 10^5$ UFC/ml. Los tubos se pusieron después en uno de dos sistemas basados en carrusel (véase por ejemplo, Figura 24) durante 24 horas a 42 °C a una velocidad de agitación lineal de ~ 1 Hz. Todos los parámetros experimentales excepto la frecuencia de lectura se mantuvieron iguales entre los dos instrumentos. La frecuencia de lectura para cada instrumento se ajustó a 5 o 2 lecturas/hora.

La Figura 56 muestra un conjunto representativo de datos del experimento. Los datos de los dos sistemas se muestran con ejes de intensidad a escala para comparación (obsérvese que las intensidades absolutas de los pesos de marcadores entre instrumentos no deberían compararse debido a diferencias en las eficacias ópticas). Las formas de las curvas de crecimiento son casi idénticas, lo que indica que el número aumentado de ciclos de formación de sedimentos, medición y dispersión no impidió el crecimiento o la detección. La única diferencia significativa es que la curva con lecturas más frecuentes proporciona mejor resolución en la cinética de crecimiento.

Ejemplo 4

Efecto del movimiento relativo de tubo de muestra e imanes

La formación de sedimento reproducible es una etapa crítica para conseguir señal de ensayo reproducible. Este ejemplo se refiere a dos modos distintos de formar un sedimento. En el primero (imán fijo), el imán se mantiene fijo en un sitio, mientras que el tubo se mueve sobre el imán durante la duración completa del turno de agitación. En la segunda configuración preferida (acoplada), mostrada en la Figura 49, el imán se mueve junto con el tubo. En una serie de experimentos, se unieron covalentemente marcadores de SERS con partículas magnéticas activadas por tosilo para formar un precomplejo de perlas magnéticas-SERS (PC). Las perlas en precomplejo se preparan por enlace covalente de partículas de SERS con partículas magnéticas activadas por Tosilo Dynabeads® M-280 mediante reacción de grupos tiol (-SH) en la superficie de SERS con grupos tosilo (Tos) en la superficie de las partículas magnéticas. PC actúa como un sistema modelo para ensayo de la formación de sedimentos en el que el sedimento puede explorarse con respecto a señal de SERS. La formación de sedimentos en PC en agua así como en un medio secundario comercial para *Salmonella* (SDIX RapidChek® *Salmonella* SELECT™) se comparó con respecto a las

geometrías de imán fijo y acoplado. Estos ensayos se realizaron usando una configuración de sistema de lecho plano (véase, por ejemplo, Figura 25).

La Figura 57 muestra una imagen de PC en agua después de sedimentar con un imán fijo. PC en agua se sedimentó durante 1,5 minutos moviendo el tubo sobre un imán en barra fijo a una frecuencia de agitación de 0,5 Hz y 25 mm de alcance. Se detuvo la agitación y se permitió que el imán persistiera durante 30 segundos antes de separar la barra de los tubos. Como se muestra en la Figura 57, se formó un único sedimento. Esta imagen destaca la capacidad para arrastrar los complejos magnéticos con el imán a través del agua.

Por el contrario, las Figuras 58A y 58B muestran la formación de sedimento de PC en medio secundario de *Salmonella* SDIX usando un imán fijo y dos frecuencias de agitación diferentes. Se sedimentó PC en medio secundario SDIX durante 3 minutos moviendo el tubo sobre un imán en barra fijo a 2 Hz (21A) o 0,5 Hz (21B) de frecuencia de agitación y 25 mm de alcance. La agitación se detuvo y se permitió que el imán persistiera durante 30 segundos antes de separar la barra de imán de los tubos. Como se muestra en la Figura 58A, se arrastraron dos sedimentos de complejos magnéticos al fondo del tubo, localizado en los límites del movimiento relativo entre el tubo y el imán. Para la agitación más lenta (Figura 58B), se formaron dos sedimentos en los extremos del desplazamiento del imán junto con una línea poco definida que conecta los sedimentos. Como la señal de SERS reproducible se obtiene mejor con un sedimento colocado de forma reproducible, denso, las Figuras 58A y 58B destacan las desventajas de la configuración de imán fijo, que parece ser incapaz de arrastrar las perlas magnéticas a través del medio secundario de *Salmonella* SDIX, supuestamente debido a las partículas sólidas presentes en este medio.

La Figura 59A muestra una disposición preferida usando la configuración de imán acoplado. Se sedimentó PC en medio secundario de *Salmonella* SDIX durante 1,5 minutos moviendo el tubo acoplado con un imán en barra a una frecuencia de agitación de 1,5 Hz y 25 mm de alcance. La agitación se detuvo y se permitió que el imán persistiera durante 30 segundos antes de separar el imán en barra de los tubos. Se formó un único sedimento denso donde el imán en barra entra en contacto con el tubo de muestras. En comparación con los sedimentos formados usando la configuración de imán fijo, el sedimento formado usando imanes acoplados es más compacto y denso, como se muestra en la Figura 59A. La Figura 59B muestra un experimento similar con un imán acoplado, usando solamente una frecuencia de agitación de 0,8 Hz. Aunque se formó un único sedimento, el medio depositado interfiere con la capacidad para extraer un sedimento denso, como se demuestra por las partículas difusas en el centro del sedimento.

Los resultados ilustrados en las Figuras 57-59 muestran que para un alcance de 25 mm, el enfoque de sedimentación de imán fijo no consiguió formar un único sedimento denso en presencia de medio secundario de *Salmonella* SDIX usando una diversidad de frecuencias de agitación. Este medio contiene partículas sólidas que se depositan rápidamente e interfieren con la capacidad del imán para arrastrar los complejos magnéticos a lo largo del fondo del tubo. Aunque la agitación rápida evitará que el medio sólido se deposite, se forman dos sedimentos en los límites del movimiento relativo entre el tubo y el imán. A medida que la agitación se ralentiza hasta detenerse, estos sedimentos no pueden arrastrarse a través del medio para formar un único sedimento. Debido a que los complejos magnéticos pueden arrastrarse a través del agua, el enfoque de imán fijo puede usarse para sedimentar PC en agua.

El enfoque de sedimentación de imán acoplado forma un único sedimento denso en presencia de medio secundario de *Salmonella* SDIX a una diversidad de frecuencias de agitación. El acoplamiento de los imanes al tubo para sedimentar no requiere arrastrar complejos magnéticos a lo largo del fondo del tubo porque se extraen a un punto común para formar un único sedimento.

Usando imanes acoplados, la agitación rápida forma un sedimento más denso en comparación con la agitación lenta. Esto probablemente se deba a que el medio sólido se deposita usando agitación lenta e interfiere con la formación de sedimento. Usando agitación rápida, el sólido se suspende en solución y pueden extraerse complejos magnéticos en un sedimento con menos interferencia del medio.

Ejemplo 5

Detección sencilla de *C. albicans* en sangre humana

La Figura 60 muestra un ejemplo de detección e identificación de microorganismos dentro de una muestra de cultivo sanguíneo (sangre con adiciones) para un formato sencillo. En este experimento, se cultivó *Candida albicans* (ATCC 10231) en un cultivo de una noche en Caldo de Cultivo de Dextrosa Sabouraud de una única colonia a 30 °C en un cultivo de agitación. El cultivo se diluyó y se inoculó en sangre humana a 3 ufc/ml o 0 ufc/ml como un control negativo. Se inocularon muestras positivas y negativas en frascos BACTEC™ Convencional 10 Aeróbico/F sin reactivos de detección así como en tubos que contenían medio BACTEC™ Convencional 10 Aeróbico/F y los reactivos de detección (marcadores de SERS y partículas magnéticas conjugados con anticuerpo anti *Candida albicans* Virostat 6411). La relación de sangre total con respecto al medio fue de 1:8. Los inóculos se sembraron en placas de CHROMagar™ BBL™ para enumeración. Los tubos de detección se insertaron en el sistema de carrusel 150 (véase Figura 24) y se insertaron frascos BACTEC™ en el instrumento BACTEC™ FX para supervisión en tiempo real durante el cultivo a 35 °C. El tubo de SERS positivo se detectó a las 18 horas y el frasco de BACTEC™ fue positivo a las 30 horas. La señal de SERS proporciona detección e ID al menos 12 horas antes de BACTEC™ FX para este ensayo

sencillo en sangre humana

Ejemplo 6

5 Detección de *C. albicans* en un formato de ensayo cuádruple

La Figura 61 muestra un ejemplo de detección e identificación de microorganismos dentro de una muestra de cultivo sanguíneo (sangre con adiciones) para un formato múltiple. En este ensayo cuádruple para la detección de *C. albicans*, *E. coli* 0157, *K. pneumoniae* y *S. aureus*, se conjugaron marcadores de SERS con cuatro indicadores Raman distintos cada uno con anticuerpos para uno de los cuatro organismos (anticuerpos conjugados con marcadores de SERS policlonal Virostat 6411 anti *C. albicans*, monoclonal Biodesign MAV119-499 anti *E. coli* O157:H7, monoclonal Biodesign C55573M anti *Staphylococcus* y monoclonal Santa Cruz Biotechnology sc-80861 anti *K. pneumoniae*). Los cuatro tipos de marcador de SERS estaban presentes en la mezcla de ensayo, junto con perlas magnéticas conjugadas con anticuerpos de captura para los cuatro microorganismos. Las perlas magnéticas presentes en el ensayo fueron un grupo de perlas magnéticas que consistían en partículas magnéticas anti *E. coli* 0157 Dynal® (Life Technologies n.º de catálogo 710-03), perlas M280 Dynal® conjugadas con anticuerpo policlonal Virostat 6411 anti *C. albicans*, perlas M280 Dynal® conjugadas con anticuerpo monoclonal Biodesign C55573M anti *Staphylococcus* y perlas M280 Dynal® conjugadas con anticuerpo policlonal PA1-7226 de Affinity Bioreagents anti *K. pneumoniae*.

En el experimento representado en la Figura 61, se cultivó *C. albicans* (ATCC 10231) en un cultivo de una noche en Caldo de Cultivo de Dextrosa Sabouraud a partir de una única colonia a 30 °C en un cultivo en agitación. El cultivo se diluyó y se inoculó en sangre humana a 3 ufc/ml o 0 ufc/ml como control negativo. Se inocularon muestras positivas y negativas en frascos de BACTEC™ Convencional 10 Aeróbico/F así como tubos de muestras que contenían medio BACTEC™ Convencional 10 Aeróbico/F con los reactivos de detección. La relación de sangre con respecto a medio en la muestra final fue de 1:8. Los inóculos de *C. albicans* se sembraron en placas de CHROMagar™ BBL™ para enumeración. Los tubos de muestras que contenían los reactivos de SERS se insertaron en un sistema de carrusel (véase Figura 24), mientras que los frascos de BACTEC™ sin reactivos de detección se insertaron en el instrumento BACTEC™ FX para supervisión en tiempo real durante el crecimiento a 35 °C.

Se detectó *C. albicans* por SERS a las 16,6 horas, mientras que el sensor de gas de BACTEC™ proporcionó detección positiva a las 28 horas. Además, la detección por SERS se vio acompañada de identificación del microorganismo como *C. albicans*, mientras que el instrumento BACTEC™ no proporcionó ninguna información de identificación. Como puede verse en la Figura 61, la detección de *C. albicans* por SERS en un formato múltiple no dio como resultado ninguna señal de SERS significativa de los otros marcadores de SERS (distintos de *C. albicans*).

Ejemplo 7

Detección de coinfección por *E. coli* y *S. epidermidis* en sangre de conejo

La Figura 62 muestra un ejemplo de detección múltiple e identificación de microorganismos dentro de una muestra de cultivo sanguíneo (sangre con adiciones) para un modelo de coinfección. Se cultivaron por separado *E. coli* O157:H7 (ATCC 700728) y *S. epidermidis* (ATCC 55133) en cultivos durante una noche en Caldo de Cultivo Nutritivo BD a partir de una única colonia a 37 °C en un cultivo de agitación. Los cultivos se diluyeron y se coinocularon en sangre de conejo a 2,6 ufc/ml para *E. coli* O157: H7 y 12,5 ufc/ml para *S. epidermidis*. Se inocularon muestras positivas y negativas en frascos de BACTEC™ Convencional 10 Aeróbico/F (sin reactivos SERS) así como tubos que contenían medio BACTEC™ Convencional 10 Aeróbico/F y los reactivos de detección descritos en el Ejemplo 6 (marcadores de SERS conjugados con Virostat 6411, Biodesign MAV119-499, Biodesign C55573M y Santa Cruz Biotechnology sc-80861, así como partículas magnéticas anti *E. coli* 0157 Dynal® y partículas M280 Dynal® conjugadas con Virostat 6411, Biodesign C55573M y Affinity Bioreagents PA1-7226). La sangre se diluyó 1:8 en medio BACTEC™. Los inóculos se sembraron en placas de CHROMagar™ BBL™ para enumeración. Se insertaron tubos de detección que contenían los reactivos de SERS en el sistema de carrusel 150 (véase Figura 24), mientras que se insertaron frascos de BACTEC™ sin reactivos de SERS en el instrumento de BACTEC™ FX para supervisión en tiempo real durante el crecimiento a 35 °C. Se detectó *E. coli* O157:H7 y se identificó por SERS a las 7,9 horas, mientras que *S. epidermidis* se detectó e identificó por SERS a las 11,4 horas. El frasco de BACTEC™ fue positivo a las 10,4 horas, pero no proporcionó ningún nivel de identificación.

Ejemplo 8

Detección por SERS en tiempo real en muestras que contienen partículas

En este ejemplo, se descongeló *E. coli* O157:H7 (ATCC 700728) a partir de una reserva de glicerol y se inoculó en sangre de conejo diluida en medio BACTEC™ Plus Aeróbico/F a una relación de 1:8. El Medio BACTEC™ Plus Aeróbico/F contiene partículas de resina (17 % p/v) para potenciar la recuperación de organismos sin la necesidad de procesamiento especial. El medio plus de sangre inoculada se enumeró por recuentos de placa para confirmar una inoculación de 5 ufc/ml. La muestra se colocó en tres tubos repetidos que contenían SERS y conjugados de perlas magnéticas (anticuerpos Biodesign MAV119-499 y G5V119-500). Se insertaron tubos de detección en el sistema de

carrusel 150 (véase Figura 24) para supervisión en tiempo real durante el crecimiento a 35 °C. Los resultados se muestran en la Figura 63. El sistema de carrusel fue capaz de formar y explorar eficazmente un sedimento en presencia de la resina.

5 Ejemplo 9

Detección en grandes volúmenes

La agitación proporcionada durante la sedimentación permite que las perlas magnéticas se capturen eficazmente, incluso en volúmenes de muestras grandes o a concentraciones de perlas magnéticas bajas.

En un ejemplo, se realizaron ensayos con SERS y volúmenes de reactivos de partículas magnéticas mantenidos constantes, variando al mismo tiempo volúmenes de muestras para conseguir un intervalo de concentraciones de reactivos. Se ensayaron muestras de 5, 10, 20, 30, 40 y 50 ml de una dilución 1:10 de sangre de conejo en medio de cultivo sanguíneo BD BACTEC™ Convencional 10 Aeróbico/F en 50 ml de Tubos Falcon™ en un sistema de ensayo basado en carrusel modificado para volúmenes de muestra grandes (véase por ejemplo, Figura 24). Se descongeló *E. coli* 0157 a partir de una reserva congelada y se añadió a cada muestra a 10^4 ufc/ml. Durante el transcurso de seis días, cada volumen se ensayó por triplicado, ensayándose solamente una muestra de un volumen dado por día.

En cada tubo, se creó una mezcla maestra usada típicamente para muestras de 5 ml combinando 125 µl de marcadores de SERS y 80 µl de partículas magnéticas en 795 µl de sangre y medio 1:10. La mezcla maestra de 1 ml resultante se añadió a cada muestra de ensayo. Se usaron marcadores de SERS conjugados con anticuerpos Biorad MAV119-499 anti *E. coli* y partículas magnéticas Dynabeads® Anti *E. coli* 0157 (710-04) de Life Technologies™.

Las muestras se colocaron en un sistema de ensayo basado en carrusel (véase por ejemplo, Figura 24) a 35 °C, con sedimentación durante 60 segundos, una potencia de láser incidente a 50 mW, un tiempo de integración de CCD de 5 segundos, basculador que actúa a ~ 0,5 ciclos/segundo y una frecuencia de lectura de 5/hora.

Se muestran los resultados para una muestra representativa de cada volumen en la Figura 64. Aunque la fuerza de señal se reduce con concentraciones de reactivo menores, el sistema es capaz de formar eficazmente sedimentos y detectar el crecimiento incluso a una concentración 10x menor a la convencional. Como puede verse, el ensayo detecta eficazmente el crecimiento para una diversidad de volúmenes.

5 Ejemplo 10

Incapacidad de sedimentar usando agitación rápida en sistema de carrusel

En el sistema de carrusel (véase por ejemplo, Figura 24), las muestras se agitan mientras que el sedimento magnético se forma para asegurar que los complejos magnéticos del volumen del líquido completo pasen a través del campo magnético localizado. Una cámara captura imágenes del sedimento durante la exploración con láser para supervisar la formación de sedimento a lo largo del ensayo.

La Figura 65A muestra un ejemplo en el que no se consigue formar un sedimento en unas pocas horas de enriquecimiento secundario de 10^7 UFC/ml de *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) a frecuencias de agitación rápidas en el sistema de carrusel 150 (véase Figura 24). Se cultivó *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) durante una noche en medio primario SELECT™ de *Salmonella* SDIX RapidChek® con complemento a 42 °C. Se inoculó una dilución 1:100 del cultivo con Medio Secundario de *Salmonella* SDIX en un recipiente secundario con partículas magnéticas conjugadas y marcadores de SERS y se colocó en el sistema de carrusel 150. Se determinó que la inoculación de partida en medio secundario era de 1×10^7 UFC/ml por recuento de placa en placas de agar Nutritivo. El instrumento leyó 2 veces por hora, sedimentó durante 30 segundos y agitó a 2 Hz con 25 mm de alcance. La Figura 65A muestra la curva de SERS resultante con imágenes capturadas en diversos tiempos durante el enriquecimiento secundario. La primera imagen de sedimento contiene un círculo amarillo para destacar el área en el que debería formarse el sedimento. Esta figura muestra que el sedimento crece en tamaño a las 2 horas y no consigue formarse en casi 3 horas de tiempo de enriquecimiento secundario.

Para cargas muy altas de *Salmonella*, el sedimento se hace particularmente grande porque hay mucho patógeno presente en el sedimento. Cuando la agitación es demasiado rápida, el campo magnético es incapaz de superar la dinámica de fluido y no consigue formarse el sedimento.

La Figura 65B muestra la curva de SERS e imágenes correspondientes durante el enriquecimiento secundario para una muestra negativa (perlas magnéticas conjugadas y marcadores de SERS conjugados en medio). Estos datos muestran una señal de Raman uniformemente baja y tamaño de sedimento uniforme durante el ensayo.

Ralentizando la frecuencia de agitación a 1 Hz durante el enriquecimiento secundario de 10^7 UFC/ml de *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), el sedimento se formó uniformemente por todo el ensayo. Se cultivó *Salmonella*

Typhimurium (ATCC 14028) durante una noche en medio primario SELECT™ de *Salmonella* SDIX RapidChek® con complemento a 42 °C. Se inoculó una dilución 1:100 del cultivo con Medio secundario de *Salmonella* SDIX en un recipiente secundario con partículas magnéticas conjugadas y marcadores de SERS y se colocó en el sistema de carrusel 150. Se determinó que la inoculación de partida en medio secundario era de 1×10^7 UFC/ml por recuento de placas en placas de agar Nutritivo. El instrumento leyó 2 veces por hora, sedimentó durante 30 segundos y agitó a 1 Hz con alcance de 25 mm. La Figura 65C muestra la curva de SERS resultante con imágenes capturadas en diversos tiempos durante el enriquecimiento secundario. La primera imagen de sedimento contiene un círculo amarillo para destacar el área en el que debería formarse el sedimento. La Figura 65C muestra que el sedimento se conserva durante todo el experimento. La Figura 66 muestra la influencia de la velocidad de agitación en la persistencia del sedimento superponiendo las curvas de SERS de las velocidades de agitación de 2 Hz y 1 Hz (Figuras 65A y 65C, respectivamente). Con agitación más lenta, la degradación de la señal es mucho más lenta y el pico es mucho más amplio que cuando la agitación es rápida. Además, la supervisión en tiempo real del sedimento mediante una cámara en línea indica que la pérdida de señal para agitación rápida se debe a la ausencia del sedimento, mientras que para la agitación lenta el sedimento siempre se forma. El sedimento no consigue formarse en casi 3 horas de agitación a 2 Hz, pero siempre está presente usando agitación a 1 Hz. La formación uniforme del sedimento a alta carga de organismo conduce a persistencia más larga de la señal de SERS. Esta persistencia en la señal de SERS puede ser ventajosa si, por ejemplo, existe un retardo entre cuando se añade la muestra a los reactivos de detección y cuando se coloca la muestra en el instrumento.

Ejemplo 11

Determinación de la presencia de un patógeno diana usando inspección visual del sedimento en inmunoensayos de tipo sándwich.

En este ejemplo, se describe un método para detección de microorganismos dentro de una muestra microbiológica que puede eliminar la necesidad de láseres, óptica y espectrómetro de acuerdo con una disposición. Este método implica el uso de una cámara para capturar imágenes durante lecturas para supervisar la formación de un sedimento durante el transcurso de un ensayo de SERS-HNW.

En el experimento descrito en el ejemplo 11 y mostrado en las Figuras 65A, 65B y 65C, la presencia del microorganismo provoca que crezca el tamaño del sedimento (Figuras 65A y 65C). Por el contrario, cuando el microorganismo está ausente, tanto el tamaño del sedimento como la señal de SERS permanecen estables. Sin la presencia del patógeno diana, no puede formarse ningún sándwich, dando como resultado ausencia de señal de Raman y ausencia de aumento del tamaño del sedimento. La Figura 67 muestra el tamaño del sedimento para una muestra negativa en comparación con el tamaño del sedimento para una muestra positiva después de 3 horas de enriquecimiento secundario en un sistema de carrusel (véase por ejemplo, Figura 24). Esta figura muestra un sedimento mayor formado para la muestra positiva en comparación con la muestra negativa.

Durante el enriquecimiento secundario de una muestra que contiene marcadores de SERS conjugados y perlas magnéticas y el patógeno diana, las imágenes muestran que el tamaño del sedimento aumenta, y en algunos casos, no consigue formarse a medida que continúa el ensayo. El crecimiento del tamaño del sedimento y/o la desaparición del sedimento es un indicio de la presencia del patógeno diana. Las imágenes capturadas durante lecturas de muestras que contienen marcadores de SERS conjugados y perlas magnéticas sin patógeno no muestran ningún cambio en el tamaño del sedimento y ninguna desaparición del sedimento. El uso de análisis de imágenes para supervisar el tamaño del sedimento puede presentar un método para detectar microorganismos en el ensayo. Este método de detección puede usarse solo o junto con otro método de detección.

Ejemplo 12

Detección en tiempo real de *E. coli* O157:H7 durante el cultivo en muestras alimentarias

Las Figuras 68A, 68B y 68C muestran datos representativos adquiridos con un sistema de carrusel (véase por ejemplo, Figura 24) para la detección de *E. coli* O157 en ternera picada, agua de lavado de espinacas y sólidos de leche agitados en bolsa.

La ternera picada cruda se preparó de acuerdo con el Manual de Laboratorio de Microbiología de la USDA (Capítulo 5 de MLG). Se diluyeron muestras de 25 g de ternera picada con 225 ml de mTSB con Novobiocina en una bolsa stomacher. Cada bolsa stomacher se agitó después en un Seward Stomacher® 400 durante 2 minutos. Se transfirieron alícuotas de 5 ml de la ternera picada agitada en bolsa a tubos que contenían marcador de SERS y conjugados de partículas magnéticas. Se cultivó *E. coli* O157:H7 (ATCC 43888) en un cultivo durante una noche en Caldo de Cultivo Nutritivo de una única colonia a 37 °C en un cultivo de agitación. El cultivo se diluyó en serie hasta aproximadamente 10^2 - 10^4 en Caldo de Cultivo Nutritivo. Se añadió una alícuota de 0,05 ml a cada tubo positivo y se añadió una alícuota de 0,05 ml de Caldo de Cultivo Nutritivo a tubos de control negativos.

La muestra de aclarado de espinaca se preparó de acuerdo con el Manual Analítico Bacteriológico de la FDA (Capítulo 4A del BAM). Se añadió un peso igual de tampón de fosfato de Butterfield a hojas de espinaca en una bolsa de plástico resellable y se agitó manualmente durante 5 minutos. El agua de lavado de espinacas se añadió después a un volumen

igual de mBPWp de doble fuerza (x2). Se cultivó *E. coli* O157:H7 (ATCC 43888) en un cultivo de una noche en Caldo de Cultivo Nutritivo a partir de una única colonia a 37 °C en un cultivo de agitación. El cultivo se diluyó en serie y se inoculó en el agua de lavado de espinacas + mBPWp (x2) a una concentración de 103 o 0 ufc/ml. Se añadieron alícuotas de 5 ml de estas muestras a tubos que contenían marcador de SERS y conjugados de partículas magnéticas.

La muestra de leche se preparó de acuerdo con el Manual Analítico Bacteriológico de la FDA (Capítulo 4A del BAM). Se centrifugó leche entera durante 10 minutos a 10.000 x g. La capa del sobrenadante se retiró por vertido y el sedimento se resuspendió en mBPWp a 1,125 veces el volumen de leche original. Se cultivó *E. coli* O157:H7 (ATCC 43888) en un cultivo de una noche en Caldo de Cultivo Nutritivo a partir de una única colonia a 37 °C en un cultivo de agitación. El cultivo se diluyó hasta 5000 ufc/ml en Caldo de Cultivo Nutritivo. Se añadieron alícuotas de 50 µl del cultivo de *E. coli* O157:H7 diluido o Caldo de Cultivo Nutritivo (control negativo) a tubos de 5 ml del cultivo de leche resuspendido más reactivos de ensayo.

Todos los inóculos se sembraron para enumeración en placas CHROMagar™ BD BBL™. Los tubos se insertaron en el sistema de carrusel para supervisión en tiempo real durante el crecimiento a 35 °C durante 8 horas.

Ejemplo 13

Detección en tiempo real de *Salmonella* durante el cultivo en muestras alimentarias

La Figura 69 muestra un ejemplo en el que se detectó *S. Enteritidis* con tensión térmica (ATCC 13076) durante crecimiento en tiempo real en ternera picada más medio de cultivo. Se cultivó *Salmonella* Enteritidis en un cultivo de una noche en Caldo de Cultivo Nutritivo a partir de una única colonia a 37 °C en un cultivo de agitación. El cultivo se diluyó hasta 1:100 en Caldo de Cultivo Nutritivo y se sometió a tensión térmica durante 20 minutos a 54 °C. La muestra sometida a tensión térmica se diluyó adicionalmente hasta 200 ufc/ml en Caldo de Cultivo Nutritivo. Se inocularon dos muestras de 25 g de ternera picada cruda con alícuotas de 1 ml del cultivo sometido a tensión térmica, diluido de *S. Enteritidis*. El inóculo se sembró para enumeración en placas de Agar Nutritivo. Las muestras de ternera picada inoculada se agitaron manualmente en una bolsa stomacher durante 2 minutos para mezclar exhaustivamente el inóculo. Se añadieron 225 ml de Medio Primario SELECT™ de *Salmonella* SDIX RapidChek® con complemento a las muestras inoculadas en la bolsa stomacher. Se prepararon muestras de control negativo con 25 g de ternera picada cruda en 225 ml de Medio Primario SELECT™ de *Salmonella* SDIX RapidChek® con complemento. Cada bolsa stomacher se agitó después en un Seward Stomacher® 400 durante 2 minutos. Las bolsas stomacher se colocaron después en un incubador a 42 °C durante aproximadamente 22 horas. Después se añadieron muestras de 100 µl de los cultivos primarios enriquecidos a tubos que contenían 4,5 ml de medio secundario de *Salmonella* SDIX, 0,4 ml de medio primario SELECT™ de *Salmonella* SDIX RapidChek® y reactivos de ensayo. Los tubos se insertaron después en el sistema de carrusel (véase Figura 24) para supervisión en tiempo real durante el crecimiento a 42 °C durante 8 horas. Se detectaron muestras positivas en un periodo de aproximadamente 2 horas, mientras que las muestras negativas dieron como resultado curvas de detección planas.

Ejemplo 14

Detección de *Listeria* en una muestra ambiental

La Figura 70 muestra la detección de *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) en una probeta de acero inoxidable. Se cultivó *L. monocytogenes* (ATCC 19115) en un cultivo de una noche en caldo de cultivo de infusión de corazón y cerebro a partir de una única colonia a 30 °C en un cultivo de agitación. El cultivo se diluyó hasta 5 x 10⁴ o 0 ufc/ml en PBS + leche 5 %. Se colocó una alícuota de 0,1 ml en una probeta de acero inoxidable de 2,54 cm x 2,54 cm y se permitió que se secara al aire durante una noche. Al día siguiente, se pasaron hisopos de punta de algodón, húmedos con caldo de neutralización D/E, por la superficie varias veces. Los hisopos se añadieron después a 5 ml de medio de *Listeria* SDIX con complemento, marcadores de SERS y partículas magnéticas en tubos. Los tubos se insertaron después en el sistema de carrusel (véase Figura 24) para supervisión en tiempo real durante el crecimiento a 30 °C. Se detectaron muestras positivas entre aproximadamente 19 y 27 horas, mientras que las muestras negativas dieron como resultado curvas de detección planas.

Ejemplo 15

Detección de *Salmonella* usando un sistema de lecho plano

En este ejemplo se detectó *Salmonella* usando agitación lineal y un sistema de lecho plano (véase por ejemplo Figura 25). Se cultivaron *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) y *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) por separado en cultivos de una noche en medio primario SELECT™ de *Salmonella* SDIX RapidChek® con complemento a 42 °C. Se preparó una dilución 1:100 de cada cepa en lotes de Medio Secundario de *Salmonella* SDIX separados. Se determinó que la inoculación de partida para cada cepa en medio secundario era de 1 x 10⁷ UFC/ml por recuento de placa en placas de agar Nutritivo. Cada cepa se inoculó por duplicado en tubos que contenían marcadores de SERS y partículas magnéticas conjugadas con anticuerpos anti *Salmonella* (Virostat 0701). Estos tubos, junto con dos muestras negativas (medio secundario SDIX y marcadores de SERS conjugados y partículas magnéticas sin *Salmonella*) se

colocaron en el instrumento para supervisión durante el enriquecimiento secundario a 42 °C.

El sistema usado en este ejemplo fue una configuración de lecho plano (véase por ejemplo Figura 25). En esta configuración, la agitación es por reciprocidad lineal a lo largo del eje de los tubos, que puede programarse para diferentes frecuencias y perfiles a lo largo del ensayo. Cada ciclo consiste en las siguientes fases: mezclado, dispersión presedimentación, sedimentación, lectura y dispersión. La configuración de imán usada en este ejemplo fue un único imán en barra con el polo Norte orientado hacia las muestras. Una vez que se formó un sedimento, la barra se separó de las muestras para permitir su lectura. La Figura 71 muestra la frecuencia de agitación y el alcance usado para cada fase. El experimento se procesó durante ~19 horas repitiéndose un ciclo cada ~20 minutos.

Se pretende que la fase de dispersión presedimentación resuspenda el sólido depositado en el medio secundario SDIX antes de la sedimentación. Se sabe que el sólido depositado del medio interfiere con la sedimentación de complejos magnéticos. El imán en barra individual se pone en contacto con los tubos durante la agitación y las muestras se sedimentan durante 60 segundos. La agitación se detiene durante 5 segundos y el imán se separa de los tubos de muestras para permitir que el aparato óptico explore cada sedimento. Una cámara también captura imágenes de cada sedimento. La agitación se reanuda para dispersar el sedimento y el ciclo se repite.

La Figura 72 muestra las curvas de SERS durante el enriquecimiento secundario de *S. Typhimurium* (ATCC 14028), *S. Enteritidis* (ATCC 13076) y muestras negativas. Como puede verse, las curvas de SERS son suaves y pueden distinguirse fácilmente de las negativas. La Figura 73 muestra imágenes de los sedimentos formados a diversos tiempos durante el enriquecimiento secundario de *S. Typhimurium*. Como puede verse, se forman uniformemente sedimentos densos, redondos, a lo largo del ensayo usando el instrumento de lecho plano.

Ejemplo 16

Agitación lineal frente a balanceo

En este ejemplo, se procesaron ensayos de *Salmonella* idénticos en dos sistemas de carrusel (véase por ejemplo Figura 24) usando diferentes métodos de agitación: una reciprocidad lineal a lo largo del eje de los tubos y una oscilación de balanceo. Se cultivaron *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) y *Salmonella* Kentucky (ATCC 9263) por separado en cultivos de una noche en medio primario SELECT™ de *Salmonella* SDIX RapidChek® con complemento a 42 °C. Se realizó una dilución 1:100 de cada cepa en lotes de Medio Secundario de *Salmonella* SDIX separados. Se determinó que la inoculación de partida para cada cepa en medio secundario era de 1×10^7 UFC/ml por recuento de placas en placas de agar Nutritivo. Cada cepa se inoculó por duplicado en tubos que contenían marcadores de SERS y partículas magnéticas conjugadas con anticuerpos anti *Salmonella* de Virostat (0701). Estos tubos se colocaron en los sistemas de carrusel para supervisión durante el enriquecimiento secundario a 42 °C. Cada instrumento leyó 2 veces por hora, sedimentó durante 30 segundos y agitó a 1 Hz.

La Figura 74 muestra curvas de SERS obtenidas de la agitación de balanceo y el sistema de carrusel de agitación lineal durante el enriquecimiento secundario de *S. Enteritidis* y *S. Kentucky*. Puede verse que se obtienen buenos resultados con ambos métodos.

En este ejemplo, la agitación lineal dio como resultado algunas ventajas sobre el movimiento de balanceo. El rendimiento de sedimentación fue mejor usando agitación lineal en comparación con balanceo debido a que el sedimento se formó siempre en el centro de la cabeza de lectura usando agitación lineal. El sistema de agitación de balanceo no oscila simétricamente alrededor del brazo de balanceo, provocando que la rueda de tubos favorezca el movimiento hacia delante. Este movimiento fluido asimétrico provoca que la fuerza del fluido en el sedimento favorezca el lado frontal de los tubos. Debido a su simplicidad mecánica en comparación con la agitación de balanceo, la agitación lineal es un método preferido de agitación.

Ejemplo 17

Compatibilidad de ensayo sin lavado en tiempo real con procesamiento de muestras posterior

En este ejemplo, se ensayó la compatibilidad del ensayo en tiempo real basado en SERS con ensayos de procesamiento de muestras que se realizan típicamente después de la detección de una muestra de cultivo sanguíneo positiva por sensores de gases convencionales. Estos ensayos pueden usarse para proporcionar identificación de organismos a partir de un frasco de cultivo sanguíneo positivo. Estos ensayos incluyen ensayos de coagulasa de tubo convencional, ensayos de aglutinación de látex, tinción de gram, desarrollo de medio cromogénico, ensayos de susceptibilidad antibiótica manual e inhibición antifúngica en cultivos en placa.

Los ensayos de coagulasa en tubo convencionales se realizaron seleccionando por separado varias colonias de *S. aureus* o *S. epidermidis* a partir de una placa sembrada en estrías y emulsionándolas en medio BACTEC™. Se añadió una muestra de 50 µl de bacterias emulsionadas con o sin reactivos de SERS (a concentraciones de ensayo) a 500 µl de plasma de conejo de EDTA y se incubaron a 37 °C. Las muestras de *S. aureus* con y sin reactivos de SERS coagularon el plasma en un periodo de 4 horas (Figura 75). Las muestras de *S. epidermidis* no coagularon el plasma

de conejo en un periodo de 4 horas. Por lo tanto, la presencia de reactivos de SERS no impide la capacidad de distinguir *S. aureus* de *S. epidermidis* mediante actividad coagulasa, incluso a concentraciones de reactivo de SERS relativamente altas.

- 5 También se evaluó un ensayo de aglutinación de látex para identificación de *S. aureus* con respecto a cualquier interferencia provocada por las partículas de ensayo de SERS. Las muestras de *S. aureus* y *S. epidermidis* con y sin reactivos de SERS (a concentraciones de ensayo) se prepararon como se ha descrito anteriormente. Después se añadió una gota de látex de ensayo BD BBL™ Staphyloslide™ a la tarjeta de ensayo, así como una gota de látex de control. A cada tipo de látex, se añadieron muestras de 10 µl de 1) *S. epidermidis* con reactivos de SERS, 2) *S. epidermidis* sin reactivos de SERS, 3) *S. aureus* con reactivos de SERS y 4) *S. aureus* sin reactivos de SERS. Las soluciones se mezclaron y se balancearon durante ~20 s. La Figura 76 muestra las tarjetas con *S. epidermidis* (tarjeta izquierda) y *S. aureus* tipo 8 (tarjeta derecha). Se añadieron muestras bacterianas con reactivos de SERS a la fila superior, mientras que las muestras sin reactivos de SERS se añadieron a la fila inferior. Los resultados son idénticos para muestras con y sin reactivos, mostrando solamente las muestras de *S. aureus* aglutinación. Las únicas muestras que muestran aglutinación fueron las muestras de *S. aureus* con y sin reactivos de SERS, lo que demuestra que los reactivos de SERS no impiden la aglutinación de látex en presencia de *S. aureus*, no aglutinan falsamente látex de control y no aglutinan falsamente látex de ensayo en presencia de *S. epidermidis*.

- 20 También se realizó tinción de Gram con reactivos de ensayo como un ensayo de compatibilidad de procesamiento corriente abajo. Se añadieron marcadores de SERS y partículas magnéticas a Portaobjetos de Gram de Control BD BBL que contenían *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (cocos gram positivos) y *Escherichia coli* ATCC 25922 (bacilos gram negativos) y se capturaron imágenes usando un objetivo con inmersión en aceite 100X, como se usa típicamente en la clínica. La Figura 77 muestra las partículas magnéticas y marcadores de SERS sin los organismos de control. Las partículas magnéticas son claramente visibles como esferas marrones grandes. Las partículas magnéticas también son de color y tamaño uniformes, actuando efectivamente como un patrón de tamaño interno (~3 µm) para microscopía. Los marcadores de SERS, que son de 0,1 - 0,2 µm de diámetro, no son visibles. La Figura 78 muestra una partícula magnética en presencia de una mezcla de *S. aureus* (cocos púrpuras) y *E. coli* (bacilos rosa) cuya imagen se ha capturado a 100X. Las partículas magnéticas están claramente destañadas y son fácilmente distinguibles de los microorganismos en esta imagen.

- 30 El medio cromogénico CHROMagar™ permite la identificación, diferenciación y separación de patógenos individuales por un único color desarrollado en el medio sólido. Las muestras de cultivos sanguíneos de una noche de *S. aureus* de tipo 8 y *S. epidermidis* que contienen reactivos de SERS se sembraron en estrías en placas de CHROMagar™. Los resultados obtenidos (Figura 79) indican que los reactivos de SERS no influyen en la capacidad para obtener colonias individuales y no impiden el desarrollo de color de CHROMagar™ específico de especie, en el que se muestra *S. aureus* a la izquierda y se muestra *S. epidermidis* a la derecha. Como se esperaba, las colonias de *S. aureus* son de color malva mientras que las colonias de *S. epidermidis* son de color blanco cuando se siembran en estrías en placas de *Staphylococcus aureus* BD BBL™ CHROMagar™.

- 40 También se realizó ensayo antibiótico manual usando el método de difusión de disco de agar (BD Sensi-disc™) en presencia de reactivos de SERS. Se sembraron en estrías cultivos sanguíneos de una noche de *E. coli* 0157 con reactivos de SERS en placas de agar Mueller Hinton II BD BBL™ y se colocaron tres discos de ensayo BD BBL™ Sensi-disc™ encima y se permitió que el cultivo creciera a 37 °C durante una noche. Al día siguiente, se midieron las zonas de inhibición (Figura 80) (en mm) y se compararon con el Diagrama Interpretativo de Diámetro de Zona de Sensi-disc™ para la determinación de aislados sensibles, inhibidores o resistentes. La Figura 80 muestra Ampicilina 10 (arriba a la izquierda), Levofloxacina 5 (arriba a la derecha), Vancomicina 30 (parte inferior). Las mediciones del diámetro de zona no variaron más de 1-2 mm entre el cultivo de *E. coli* con reactivos y el cultivo sin reactivos (Figura 81). Este proceso se repitió con otras bacterias de cultivo sanguíneo y levadura (Tabla 82), lo que muestra que la capacidad para determinar la susceptibilidad del antibiótico de un microorganismo usando el método de difusión en disco no se ve influida por la presencia de reactivos de SERS.

- 50 Para ensayar levadura, se usaron discos de Nistatina Taxo™. Estos discos no se usan para ensayos de susceptibilidad, sino para diferenciación y aislamiento de bacterias de muestras de ensayo tanto con bacterias como con levadura. Por lo tanto, se ensayó un método ligeramente diferente. Se sembraron en estrías cultivos de sangre mixtos de *E. coli* y *C. albicans* con y sin reactivos de SERS en placas de TSA II. Los discos de Nistatina Taxo™ se colocaron encima y los cultivos se dejaron crecer a 37 °C durante una noche. En ambas muestras con (imagen izquierda de la Figura 83) y sin (imagen derecha de la Figura 83) reactivos de ensayo, la inhibición por Nistatina del crecimiento de *C. albicans* dio como resultado áreas de colonias de *E. coli* aisladas.

60 Ejemplo 18

Efecto de la frecuencia de agitación y el tiempo de sedimentación en la formación de sedimento

- 65 Este ejemplo se refiere a la sedimentación que usa una configuración en la que el tubo se acopla al imán (véase por ejemplo Figura 49) de modo que el imán se mueve con el tubo y se mantiene en la misma posición relativa con respecto al tubo durante toda la agitación. En una serie de experimentos, se unieron covalentemente marcadores de SERS con

partículas magnéticas activadas por tosilo para formar un precomplejo (PC) de perlas magnéticas de SERS. Se preparan perlas en precomplejo por enlace covalente de partículas de SERS con partículas magnéticas activadas por Tosilo M-280 Dynabeads® mediante la reacción de grupos tiol (-SH) en la superficie de SERS con grupos tosilo (Tos) en la superficie de las partículas magnéticas. El PC actúa como un sistema modelo para un ensayo de formación de sedimentos en el que el sedimento puede explorarse con respecto a señal de SERS. En este ejemplo, la formación de sedimento de PC en un medio secundario comercial para *Salmonella* (SDIX RapidChek® *Salmonella* SELECT™) se comparó usando una diversidad de frecuencias de agitación y tiempos de sedimentación. Estos ensayos se realizaron usando una configuración de sistema de lecho plano (véase por ejemplo Figura 25) con un único imán en barra individual con el polo Norte orientado hacia los tubos (véase por ejemplo Figura 52).

La Figura 84 muestra una tabla con imágenes de sedimentos formados usando PC en medio secundario de *Salmonella* SDIX usando tres frecuencias de agitación diferentes y tres tiempos de sedimentación diferentes. El PC en medio secundario SDIX se sedimentó agitando los tubos acoplados con el imán en barra a diversas frecuencias de agitación a 50 mm de alcance (amplitud). La agitación se detuvo y se permitió que el imán persistiera durante 5 segundos antes de separar el imán en barra de los tubos. Se capturaron imágenes de los sedimentos una vez que el imán en barra se separó de los tubos.

Como se muestra en la Figura 84, la agitación rápida forma un sedimento más denso en comparación con la agitación lenta. Esto probablemente se deba a que el medio sólido se deposita al usar agitación lenta e interfiere con la formación de sedimento. Usando agitación rápida, el sólido se suspende en solución y pueden extraerse complejos magnéticos en un sedimento con menos interferencia del medio. Puede verse en los sedimentos formados usando frecuencia de agitación de 0,7 Hz con tiempos de sedimentación de 30, 60 y 90 segundos que el medio depositado interfiere con la capacidad para extraer un sedimento denso, como se demuestra por el sedimento difuso.

Ejemplo 19

Efecto de la frecuencia de agitación en la dispersión del sedimento

Este ejemplo se refiere a la medición del tiempo requerido para dispersar completamente un sedimento usando una diversidad de alcances de agitación (amplitud) y frecuencias. En cada caso, se formó un sedimento usando una configuración en la que el tubo se acopla al imán (véase por ejemplo Figura 49) de modo que el imán se mueve con el tubo y se mantiene en la misma posición relativa con respecto al tubo durante toda la agitación. El imán usado en este ejemplo fue un único imán en barra con el polo N orientado hacia los tubos de muestra, tal como se muestra en la Figura 52.

En este ejemplo, el tubo se agitó manualmente antes de cada ensayo para mezclar exhaustivamente el medio (SDIX RapidChek® *Salmonella* SELECT™) y PC. La muestra se cargó en el instrumento de lecho plano y se formó un sedimento agitando a 1,8 Hz y 25 mm de alcance durante 90 segundos. La agitación se detuvo y se permitió que el imán persistiera durante 5 segundos antes de separar la barra de imán de los tubos. Se usaron diversas frecuencias de agitación y alcances en ensayos separados para dispersar el sedimento. La dispersión de sedimentos se supervisó por inspección visual y se midió el tiempo requerido para dispersar completamente el sedimento. Los datos con un asterisco indican que no se observó ningún medio depositado.

Como se muestra en la Figura 85, la agitación rápida dispersa el sedimento en menos tiempo en comparación con la agitación lenta. Además, para una frecuencia de agitación dada, el sedimento se dispersa más rápidamente con un alcance de agitación más largo. Basándose en observaciones en este ejemplo, el medio sólido en el medio secundario permanece suspendido en solución a frecuencias de agitación por encima de 2,5 Hz a 25 mm de alcance y por encima de 1,5 Hz a 50 mm de alcance.

Ejemplo 20

Ensayo de viabilidad del ensayo de fluorescencia HNW en presencia de alimento

Este ejemplo demuestra la viabilidad de realizar un ensayo sin lavado homogéneo junto con cultivo usando partículas fluorescentes de infrarrojo cercano ("NIR") en lugar de marcadores de SERS. En este ejemplo, se fabricaron nanopartículas de sílice fluorescente usando una técnica de cultivo de Stober modificada que incorpora tanto un conjugado de silano-colorante de NIR (para proporcionar la señal fluorescente) como un silano tiolado (para proporcionar un asa química para conjugación de anticuerpos). Las partículas se caracterizaron por microscopía electrónica de transmisión ("MET"), espectroscopia de extinción de UV/Vis y espectroscopia de fluorescencia, y se descubrió que eran relativamente monodispersas y brillantes. La Figura 96 ilustra una imagen de MET de nanopartículas de sílice fluorescentes de NIR (la barra de escala es de 200 nm), mientras que la Figura 97 ilustra un espectro de fluorescencia de nanopartículas fluorescentes NIR (DO 0,5) y espectro de Raman de marcadores de SERS ES/HB convencionales (DO 1,2). Se conjugaron nanopartículas fluorescentes con Ab de *Listeria* usando un protocolo de conjugación convencional que se modificó para ajustarse a las diferencias en la concentración de nanopartículas fluorescentes, el área de superficie y la masa relativa a marcadores de SERS. Las nanopartículas de sílice fluorescentes conjugadas se ensayaron en un ensayo HNW de *Listeria* en un sistema de carrusel 150 (véase

Figura 24) usando muestras mezcladas 10 % p/v de espinaca y col. Se realizaron ensayos de control usando marcadores de SERS con muestras tanto de espinacas como de col.

Los marcadores fluorescentes fueron capaces de detectar con éxito *Listeria* en ambas muestras alimentarias. La Figura 98 representa los datos de espinacas recogidos usando marcadores de nanopartículas fluorescentes NIR y marcadores de SERS, mientras que la Figura 99 representa los datos de col recogidos usando marcadores de nanopartículas fluorescentes de NIR y marcadores de SERS. Se descubrió que tanto la señal como el fondo eran mayores para marcadores fluorescentes que para marcadores de SERS, sin embargo, la detección fue exitosa con relaciones de señal con respecto a fondo relativamente altas de ~4:1.

Aunque la materia objeto anterior se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo para fines de claridad de entendimiento, se entenderá por aquellos expertos en la materia que pueden practicarse determinados cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de los mismos.

Se entenderá que, aunque varias solicitudes de patente, patentes y otras referencias se hacen referencia en el presente documento, dicha referencia no constituye una admisión de que ninguno de estos documentos forme parte del conocimiento general común en la técnica.

REIVINDICACIONES

1. Un vaso (50) para medir una cantidad deseada de una muestra, comprendiendo el vaso (50):

- 5 un recipiente (58) para recibir una muestra de cultivo en el mismo, teniendo el recipiente (58) un extremo abierto y un extremo cerrado;
una tapa (52) configurada para conectarse con el extremo abierto del recipiente (58) en una conexión hermética a fluidos;
una cesta (54) acoplada a la tapa (52) y que incluye al menos un depósito (64), estando la cesta (54) colocada
10 entre el extremo abierto y el extremo cerrado del recipiente (58), el depósito (64) configurado para contener un volumen predeterminado de muestra en el mismo, la cesta (54) y el depósito (64) configurados de tal manera que el depósito (64) se llena cuando el vaso (50) se inclina desde una posición horizontal erguida y la muestra fluye desde el recipiente (58) hacia la cesta (54); y
al menos un conjunto de agujas (56) conectados con la tapa (52), incluyendo el conjunto de agujas (56) una aguja
15 (70) que se extiende dentro del depósito (64),
en el que la aguja (70) está configurada para extraer selectivamente una muestra contenida en el depósito (64) y en el que la aguja (70) está configurada además para conectarse a un vial (100) para una transferencia biocontenida de la muestra desde el depósito (64) hasta el vial (100).

20 2. El vaso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:

- (i) el recipiente (58) se construye a partir de un material transparente a la radiación visible; o
(ii) la aguja (70) comprende un manguito protector (120) que cubre la aguja (70), en el que el manguito protector (120) está configurado para comprimirse a medida que el vial (100) se empuja hacia abajo y en conexión con la
25 aguja (70), y en el que el manguito protector (120) está configurado para volver a su forma original para cubrir la aguja (70) a medida que el vial (120) se retira de la conexión con la aguja (70) para permitir la transferencia biocontenida.

3. El vaso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cesta define:

- 30 (i) un primer depósito (64) y un segundo depósito (66) y en el que la tapa (52) define un primer conjunto de agujas (56) con una primera aguja (70) que se extiende dentro del primer depósito (64) y un segundo conjunto de agujas (56) con una segunda aguja (70) que se extiende dentro del segundo depósito (66);
(ii) un nervio (75) que está configurado para ayudar en el drenaje del fluido a través de la cesta (54); o
35 (iii) al menos un agujero (72), en el que el agujero (72) está configurado para permitir que el exceso de la muestra drene dentro del recipiente (58) después del que el recipiente (58) se devuelva a una posición erguida;

opcionalmente en el que la primera aguja (70) y el primer depósito (64) se configuran para su uso con un primer tipo de ensayo, en el que la segunda aguja (70) y el segundo depósito (66) se configuran para su uso con un segundo tipo de ensayo, y un primer tipo de ensayo es diferente del segundo tipo de ensayo, preferentemente en el que el primer depósito (64) está configurado para contener aproximadamente 5 ml y en el que el segundo depósito (66) está configurado para contener aproximadamente 100 µl.

4. El vaso de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende además:

- 45 (i) un espacio de cabeza (80) por encima del al menos un depósito (64) para permitir que la muestra entre fácilmente al al menos un depósito (64) cuando el recipiente (58) se inclina;
(ii) un poste de ventilación (125) que se extiende desde una superficie inferior de la tapa (52), en el que el poste de ventilación (125) define una abertura a través para recibir y conectarse con un filtro para filtrar subproductos gaseosos que salen del recipiente (58); o
50 (iii) un primer poste de conexión (127) que se extiende externamente desde una superficie inferior de la tapa (52) y un segundo poste de conexión (129) que se extiende externamente desde una superficie superior de la cesta (54), en el que el primer poste de conexión (127) se configura para alinearse con y conectarse con el segundo poste de conexión (129).

5. El vaso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la tapa:

- (i) define un respiradero (86) para permitir que los subproductos no peligrosos gaseosos escapen del recipiente (58) para evitar que la presión crezca dentro del recipiente (58);
60 (ii) define al menos una apertura en forma de cerradura (104) que está configurada para permitir la coincidencia de una tapa específica del vial (100); o
(iii) comprende además al menos un elemento de separación para evitar que la tapa (52) se desatornille sin la desconexión adicional del elemento de separación.

6. Un conjunto de tapa para su uso con un recipiente para recibir una muestra de cultivo, comprendiendo el conjunto de tapa:

- una tapa (52) configurada para conectar el extremo abierto de un recipiente (58) en una conexión hermética al fluido, conteniendo opcionalmente la tapa (52) una cesta (54);
 una cesta (54) acoplada a la tapa (52) e incluyendo al menos un depósito (64), el depósito (64) configurado para
 5 contener un volumen predeterminado de muestra en el mismo, la cesta (54) y el depósito (64) configurados de tal
 manera que el depósito (64) se llena cuando el conjunto de tapa se usa con el recipiente (58) y el recipiente (58)
 se inclina desde una posición horizontal erguida y la muestra fluye desde el recipiente (58) a través de la cesta
 (54); y
 al menos un conjunto de agujas (56) conectado con la tapa (52), incluyendo el conjunto de agujas (56) una aguja
 10 (70) que se extiende dentro del depósito (64),
 en el que la aguja (70) está configurada además para conectarse a un vial (100) para una transferencia
 biocontenida de la muestra desde el depósito (64) hasta el vial (100).
7. El conjunto de tapa de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la cesta (54) define un primer depósito (64) y un
 15 segundo depósito (66) y en el que la tapa (52) define un primer conjunto de agujas (56) con una primera aguja (70)
 que se extiende dentro del primer depósito (64) y un segundo conjunto de agujas (56) con una segunda aguja (70)
 que se extiende dentro del segundo depósito (66) o la cesta (54) define un nervio (75) que está configurado para
 ayudar en el drenaje del fluido a través de la cesta (54).
8. El conjunto de tapa de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la primera aguja (70) y el primer depósito (64) se
 20 configuran para su uso con un primer tipo de ensayo, en el que la segunda aguja (70) y el segundo depósito (66) se
 configuran para su uso con un segundo tipo de ensayo, y un primer tipo de ensayo es diferente del segundo tipo de
 ensayo, preferentemente en el que el primer depósito (64) está configurado para contener aproximadamente 5 ml y
 en el que el segundo depósito (66) está configurado para contener aproximadamente 100 µl.
9. El conjunto de tapa de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la tapa:
 25 (i) define un respiradero (86) para permitir que los subproductos no peligrosos gaseosos escapen;
 (ii) define al menos una apertura en forma de cerradura (104) que está configurada para permitir la coincidencia
 de una tapa específica (106) de un vial (100); o
 30 (iii) comprende además al menos un elemento de separación para evitar que la tapa (52) se desatornille sin la
 desconexión adicional del elemento de separación.
10. El conjunto de tapa de acuerdo con la reivindicación 6:
 35 (i) que comprende además un poste de ventilación (125) que se extiende desde una superficie inferior de la tapa
 (52), en el que el poste de ventilación (125) define una abertura a través para recibir y conectarse con un filtro para
 filtrar subproductos gaseosos;
 (ii) que comprende además un primer poste de conexión (127) que se extiende externamente desde una superficie
 40 inferior de la tapa (52) y un segundo poste de conexión (129) que se extiende externamente desde una superficie
 superior de la cesta (54), en el que el primer poste de conexión (127) se configura para alinearse con y conectarse
 con el segundo poste de conexión (129); o
 (iii) en el que la aguja (70) comprende un manguito protector (120) que cubre la aguja (70), en el que el manguito
 protector (120) está configurado para comprimirse a medida que el vial (100) se empuja hacia abajo y en conexión
 45 con la aguja (70), y en el que el manguito protector (120) está configurado para volver a su forma original para
 cubrir la aguja (70) a medida que el vial (120) se retira de la conexión con la aguja (70) para permitir la transferencia
 biocontenida.

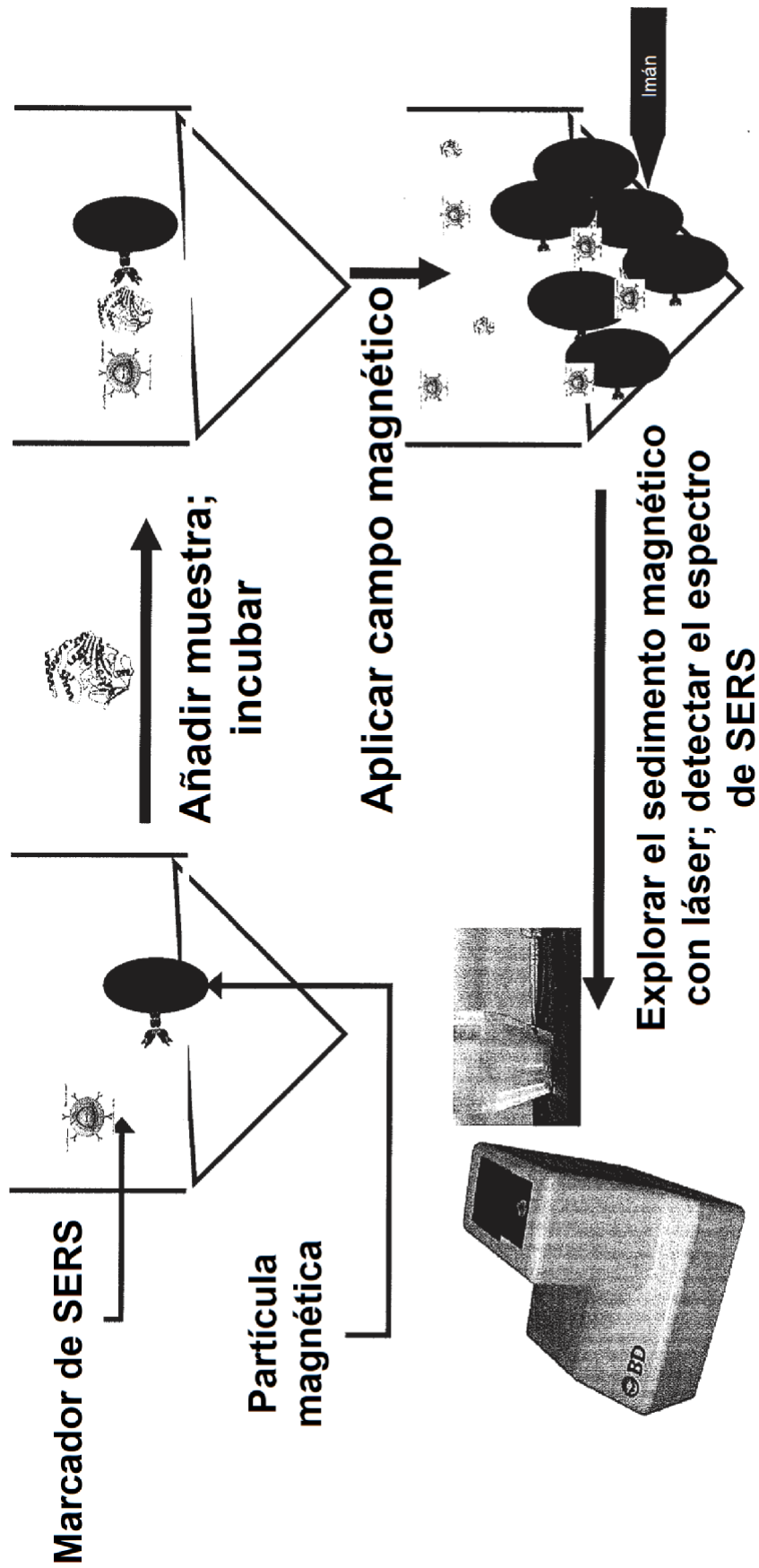


Figura 1

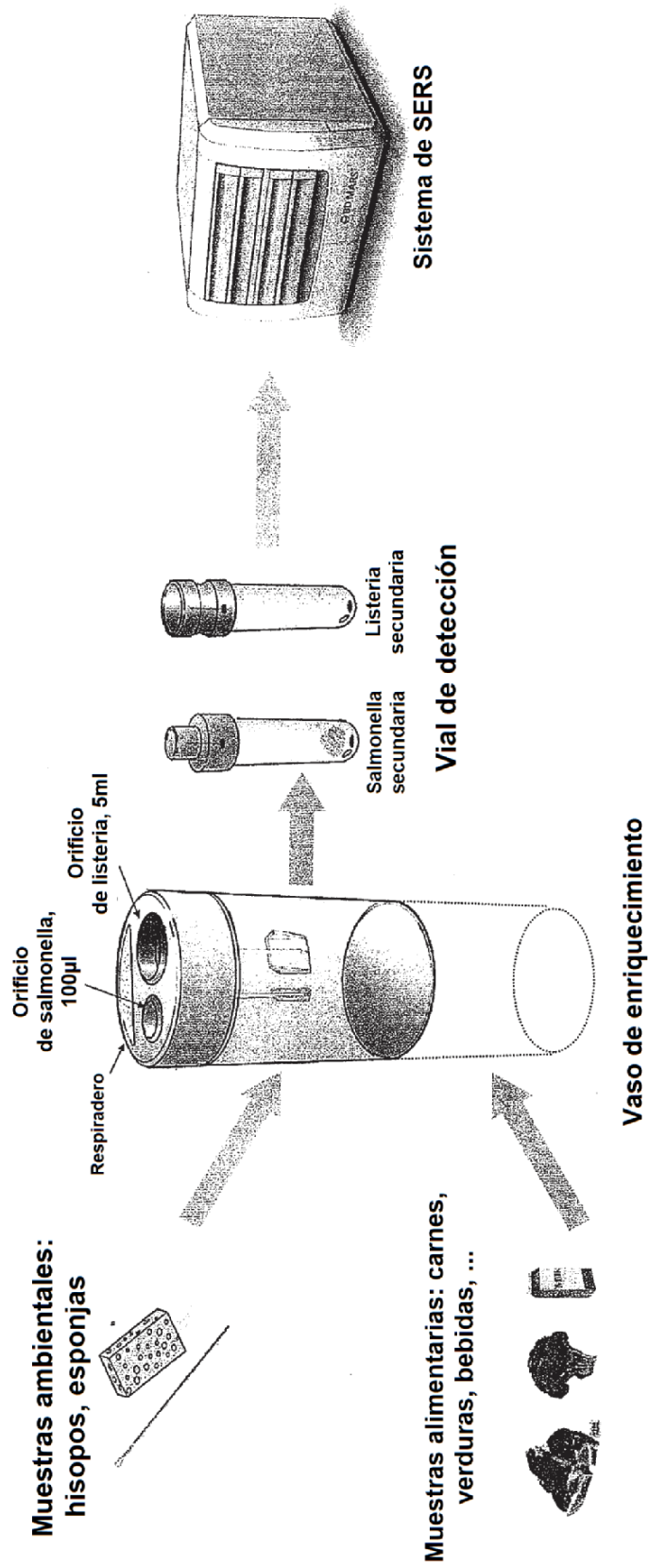


Figura 2

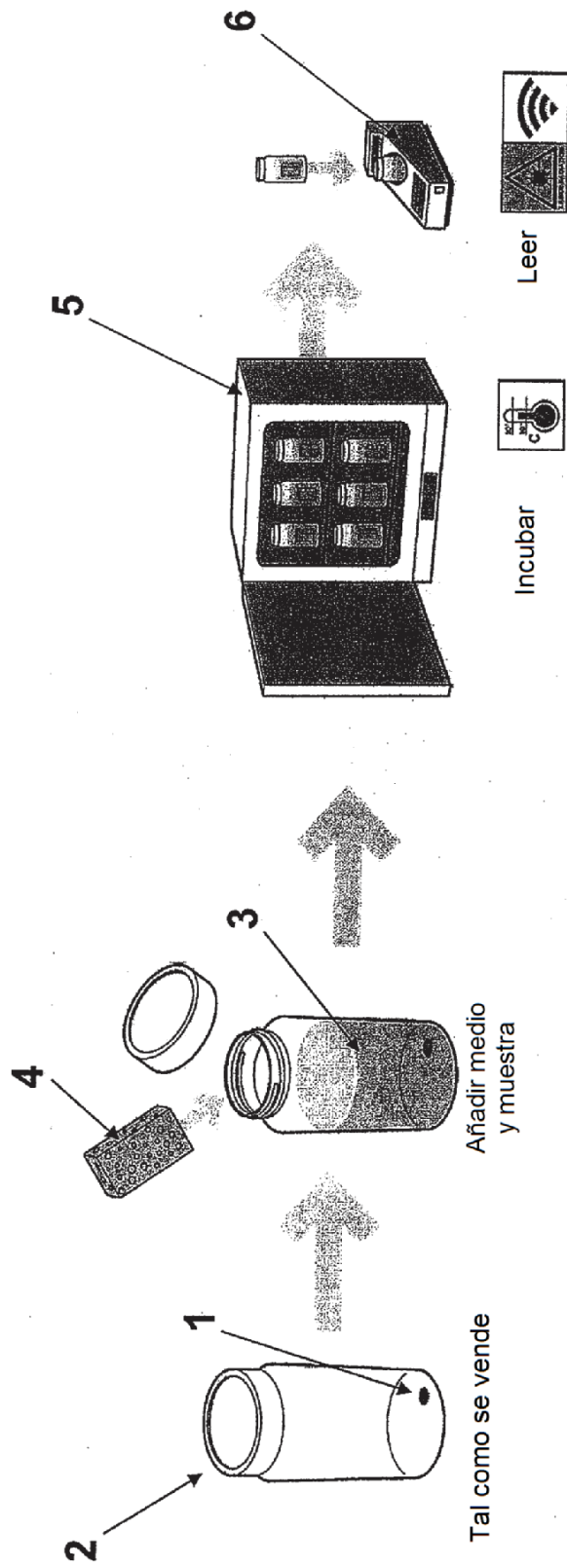


Figura 3

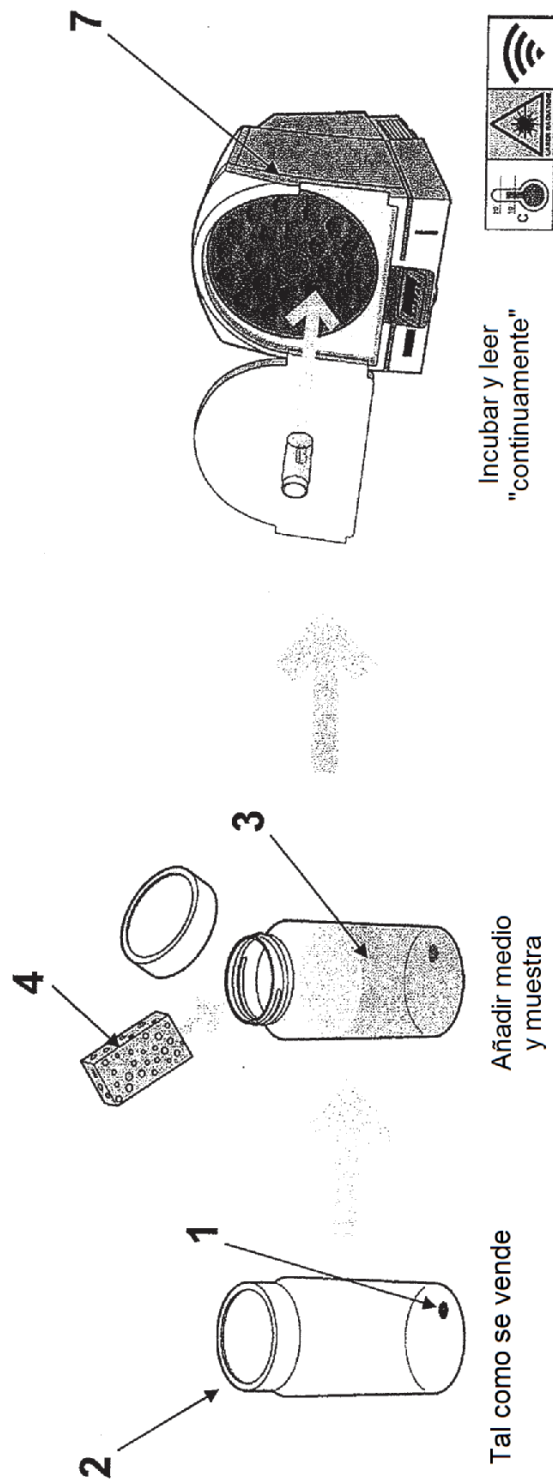


Figura 4

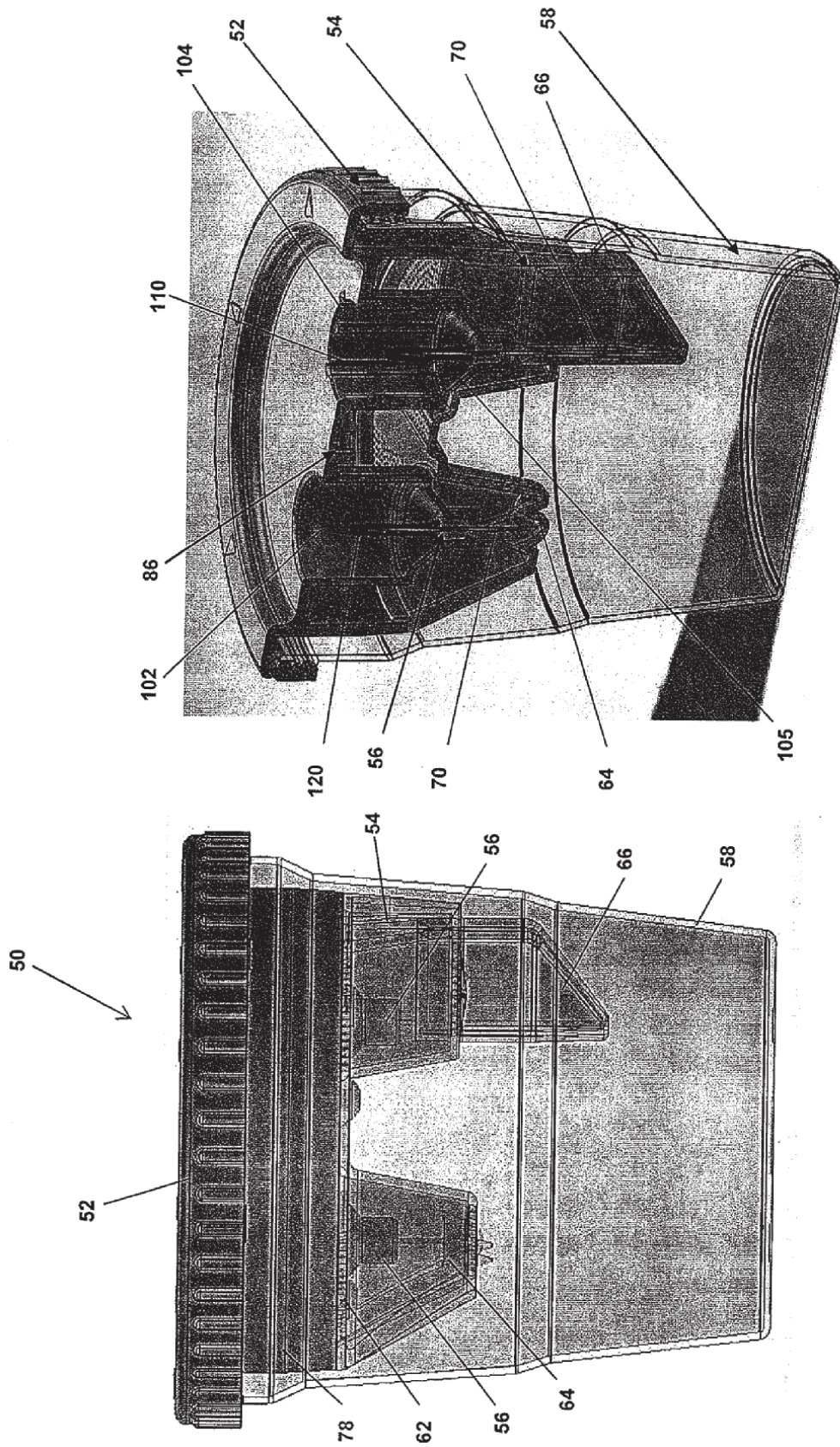


Figura 6

Figura 5A

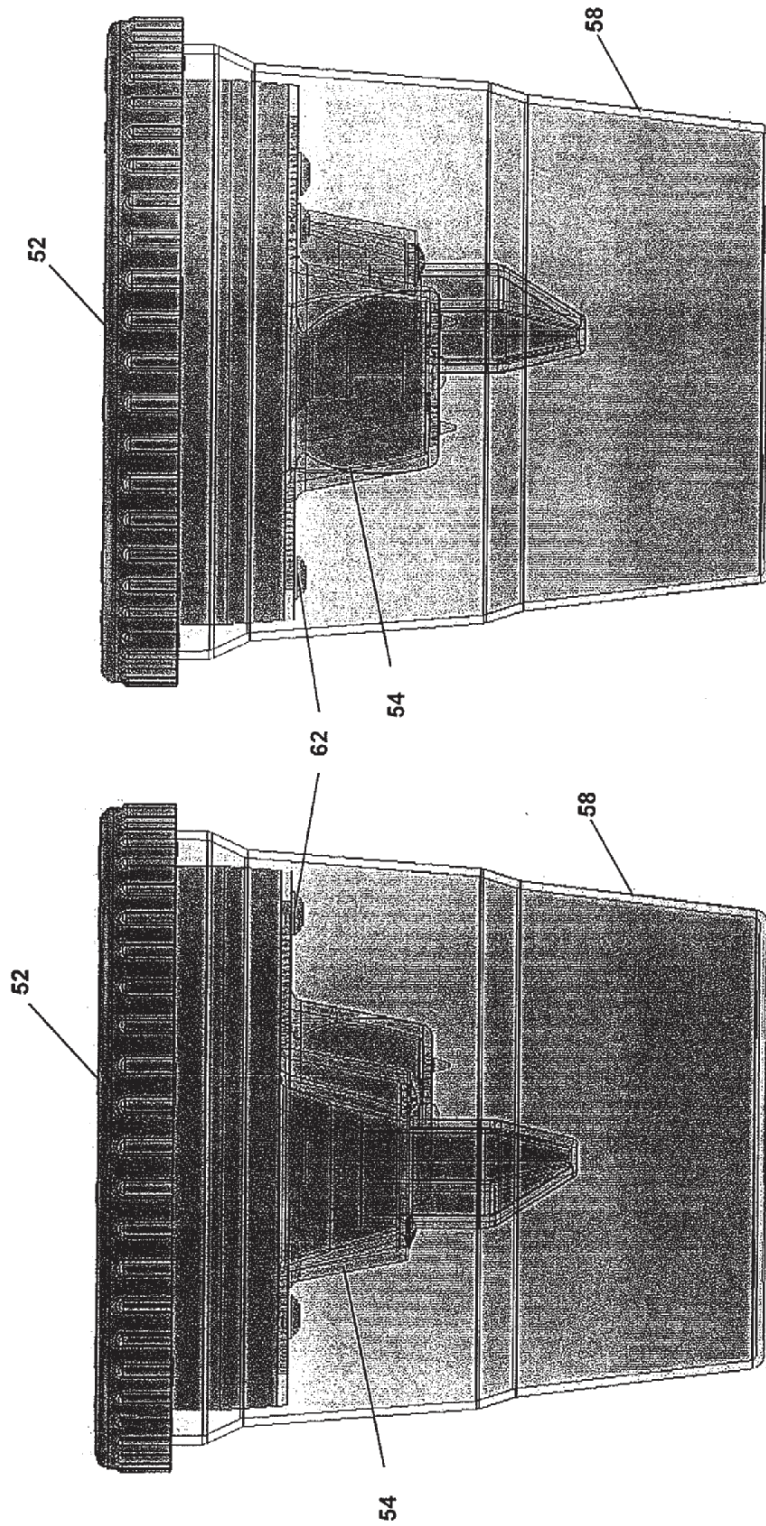


Figura 5C

Figura 5B

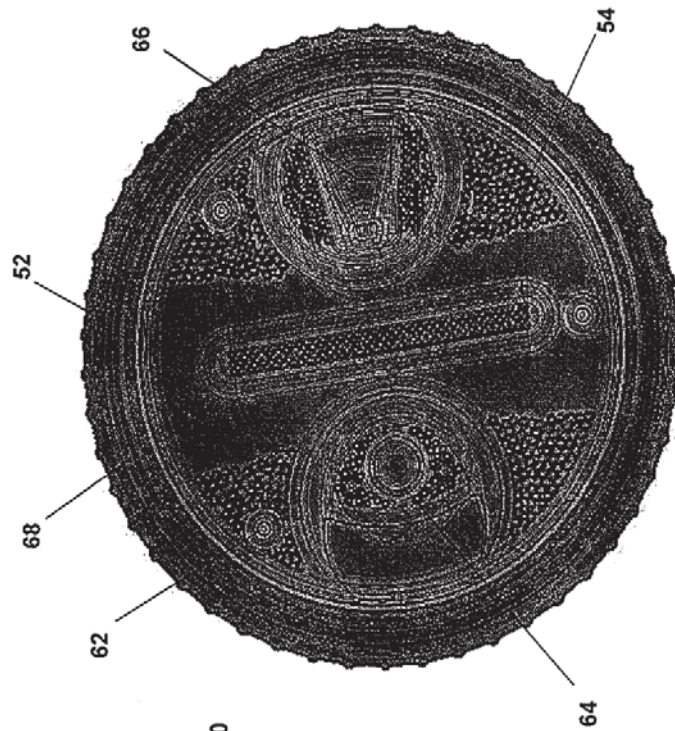


Figura 5E

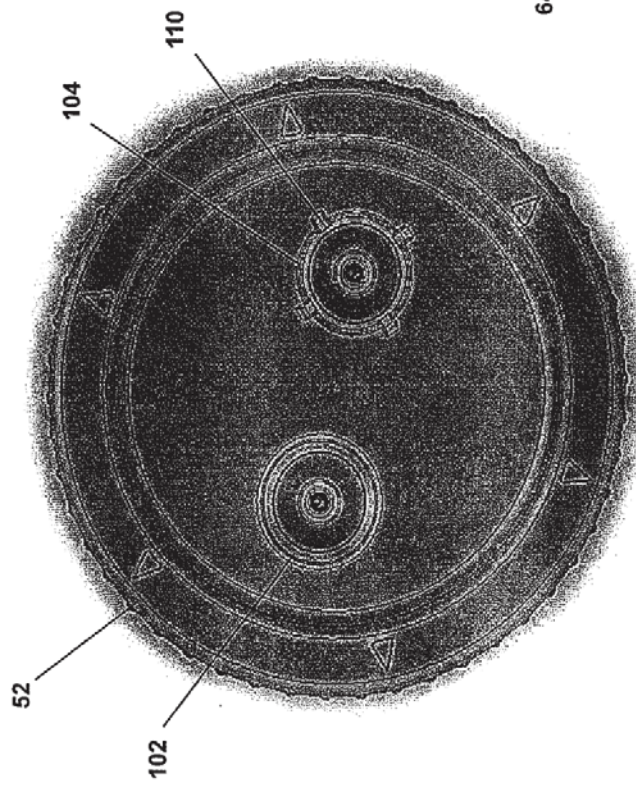


Figura 5D

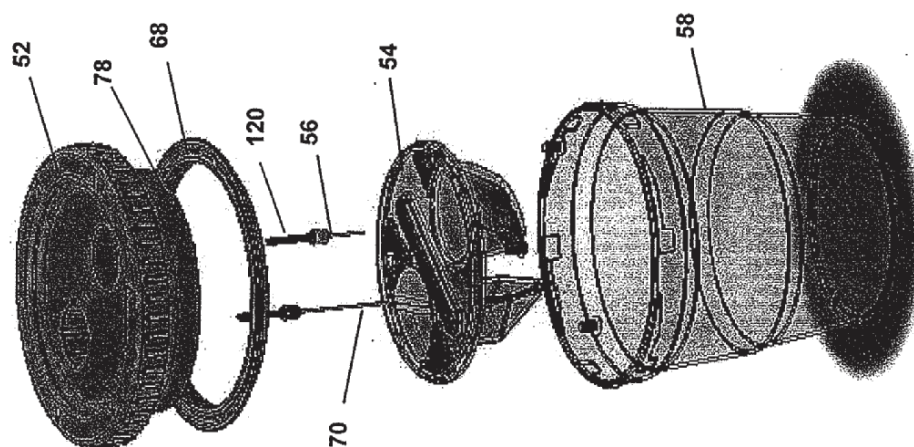


Figura 7

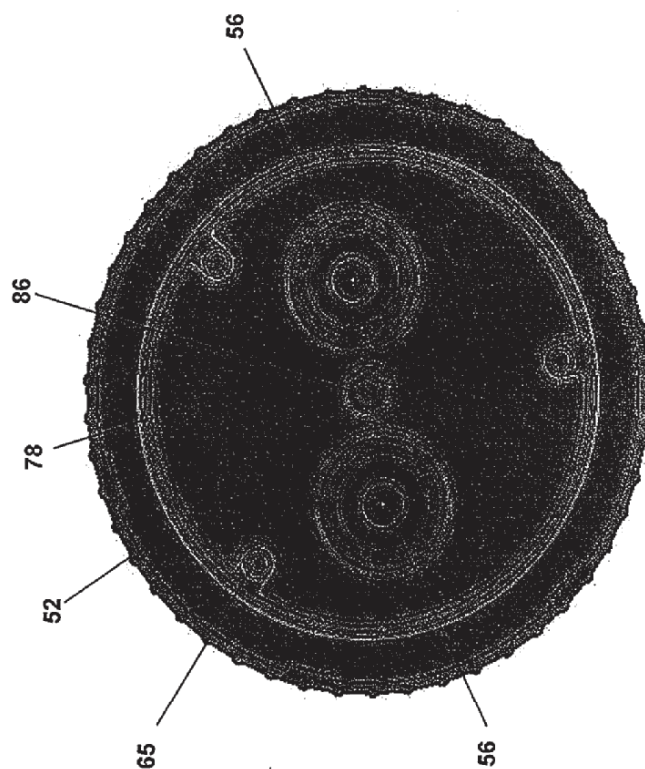


Figura 8

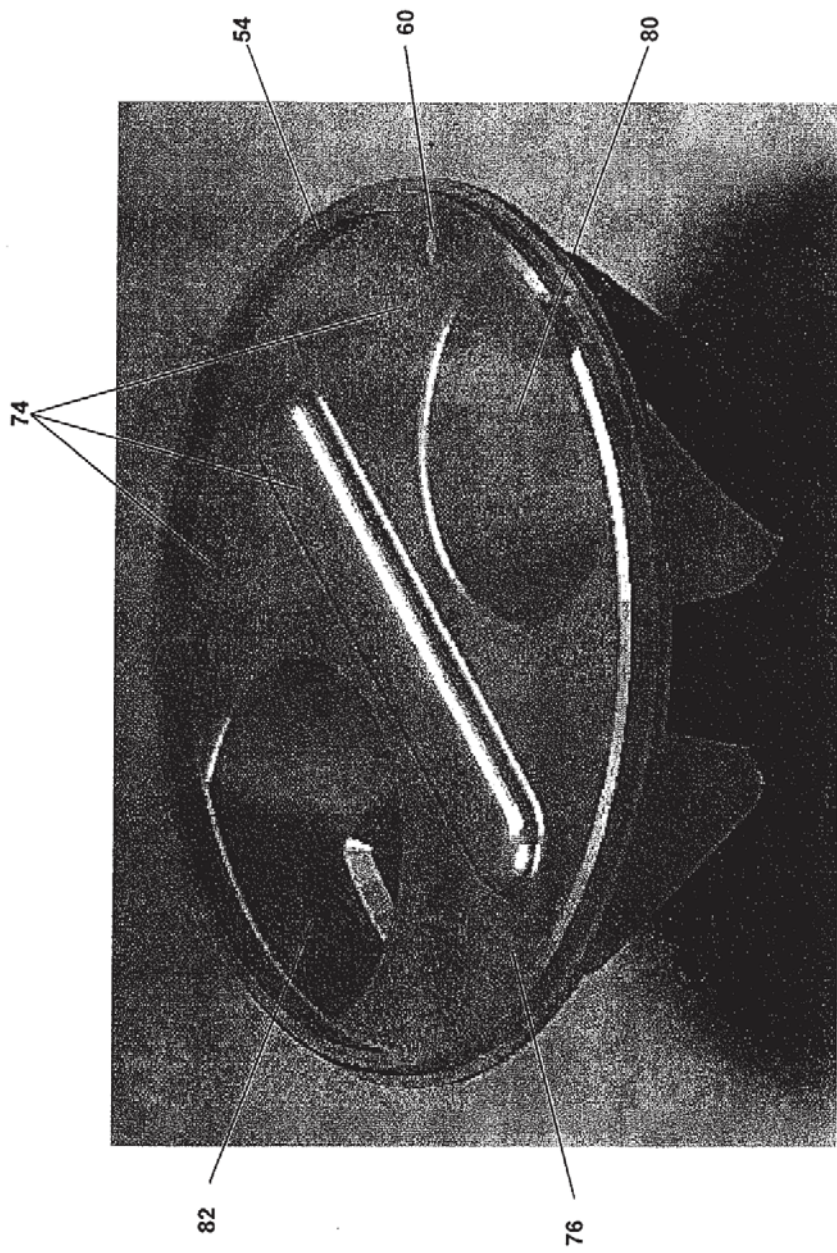


Figura 9A

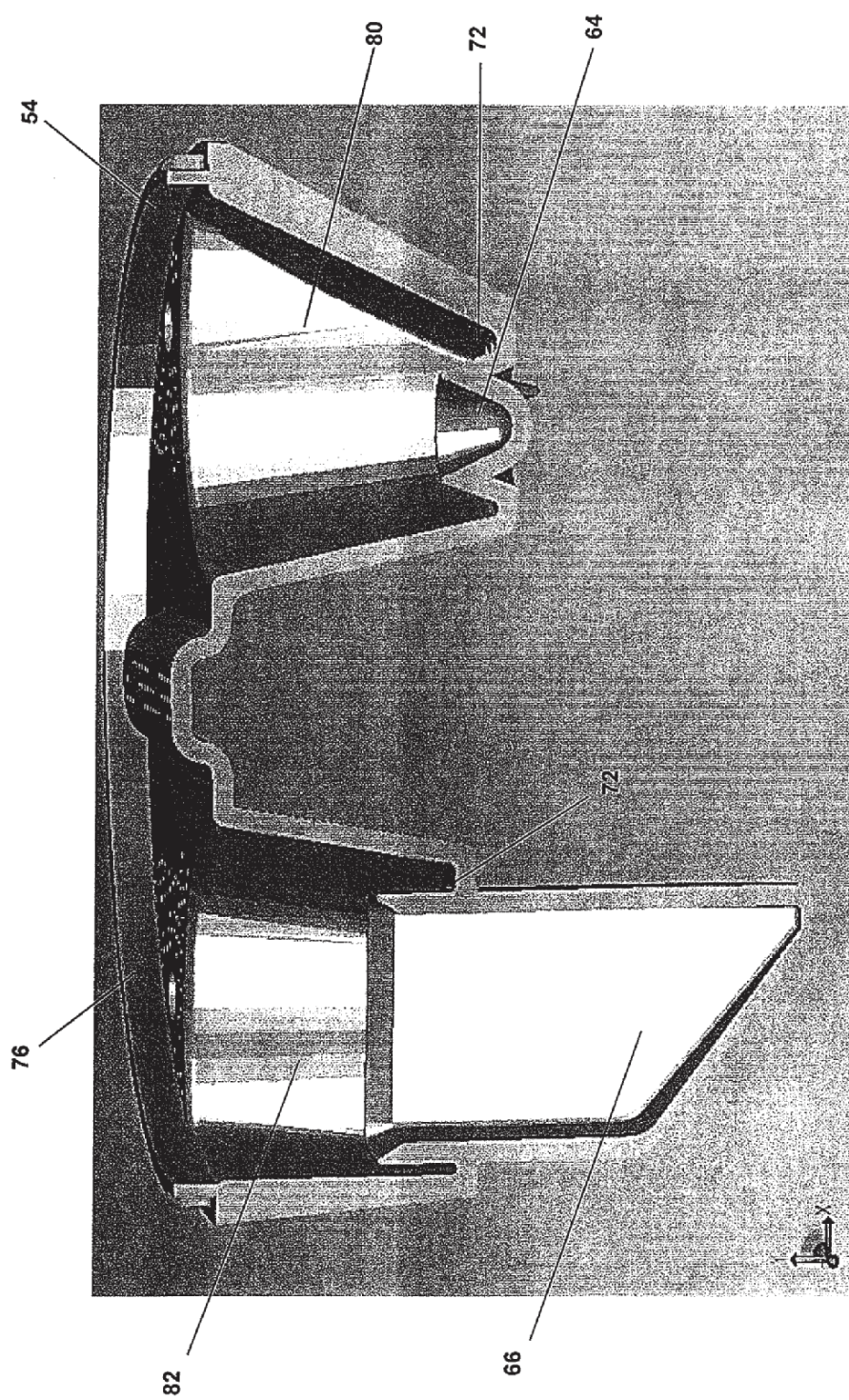


Figura 9B

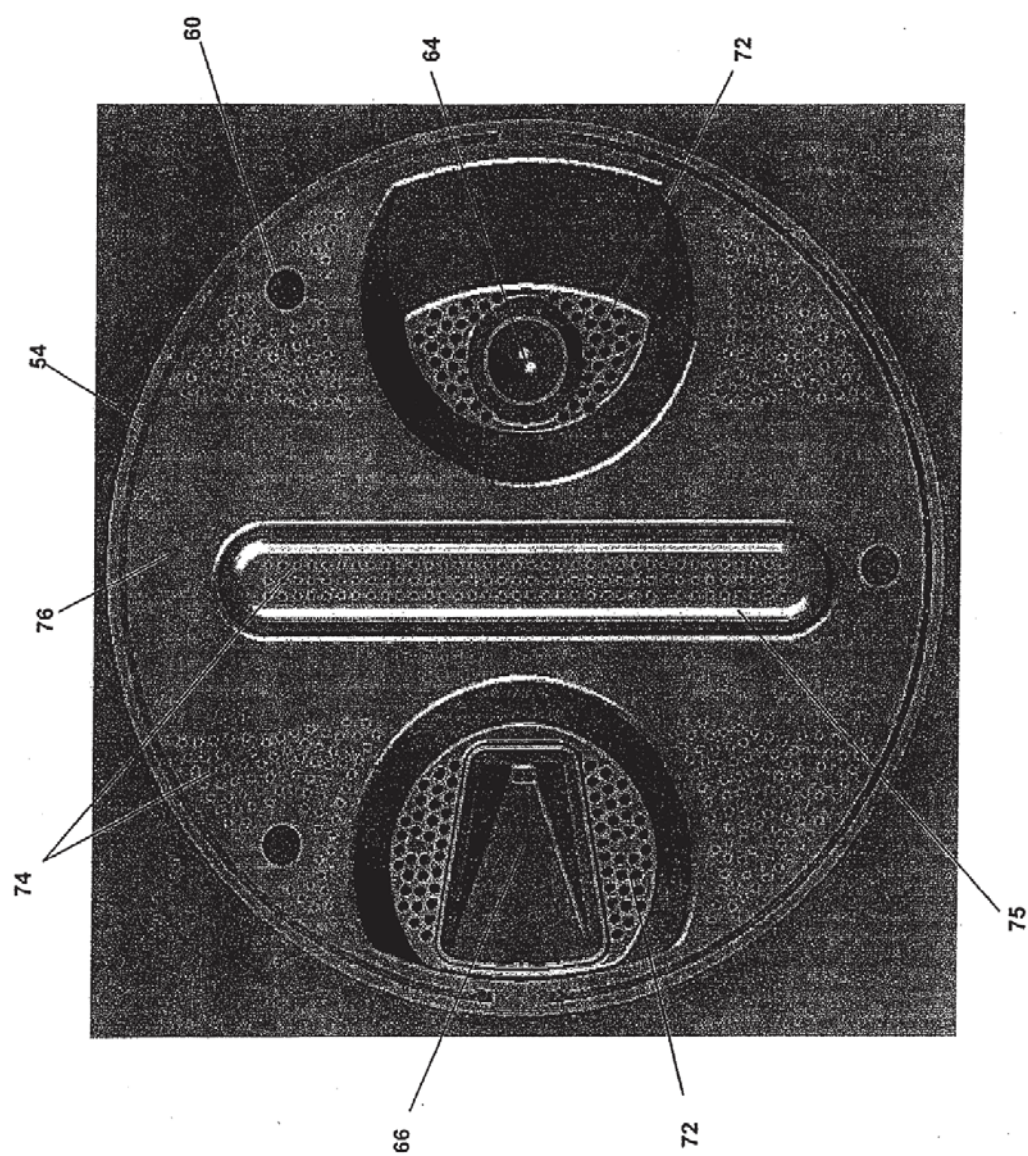


Figura 9C

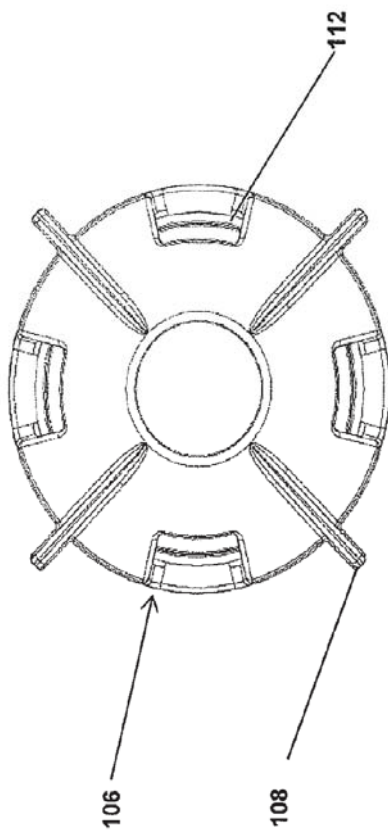


Figura 10A

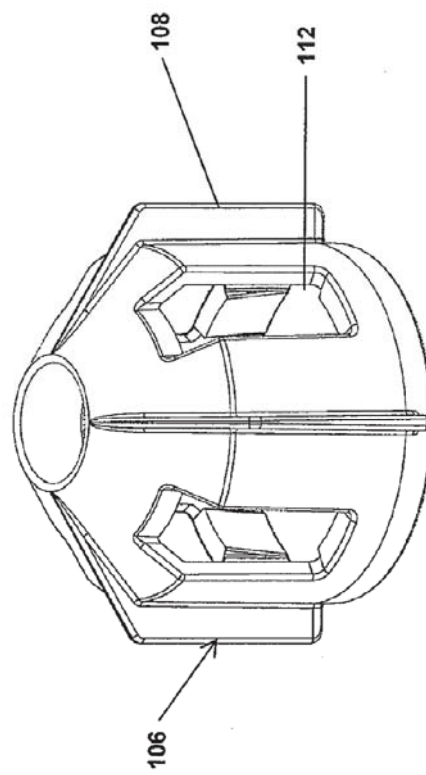


Figura 10B

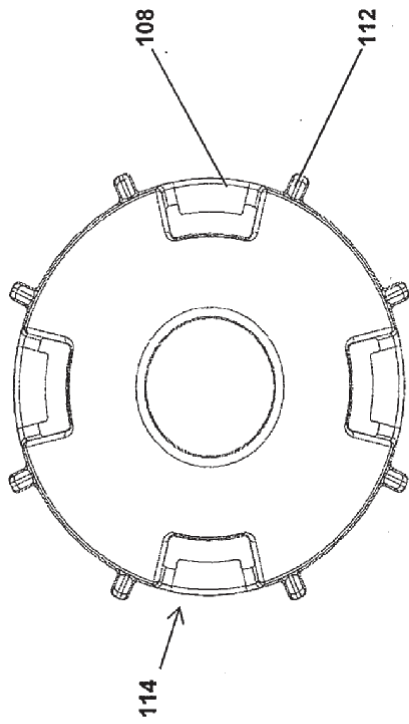


Figura 11A

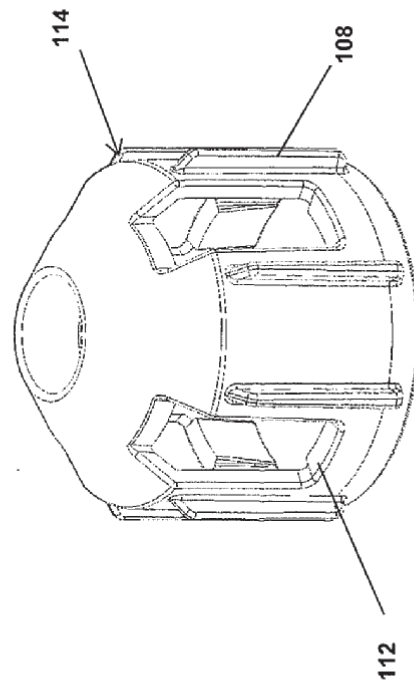


Figura 11B

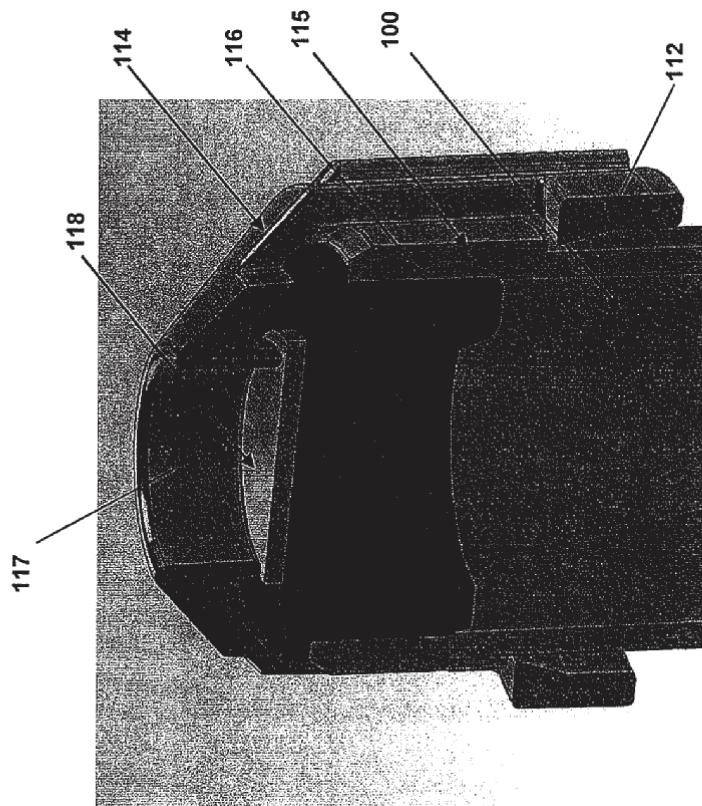


Figura 12

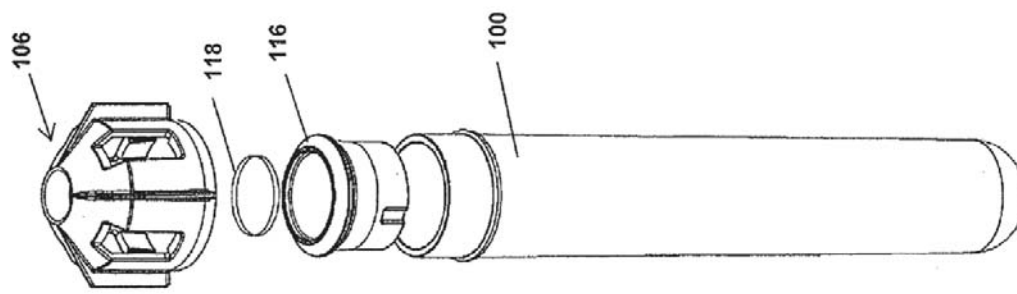


Figura 13B

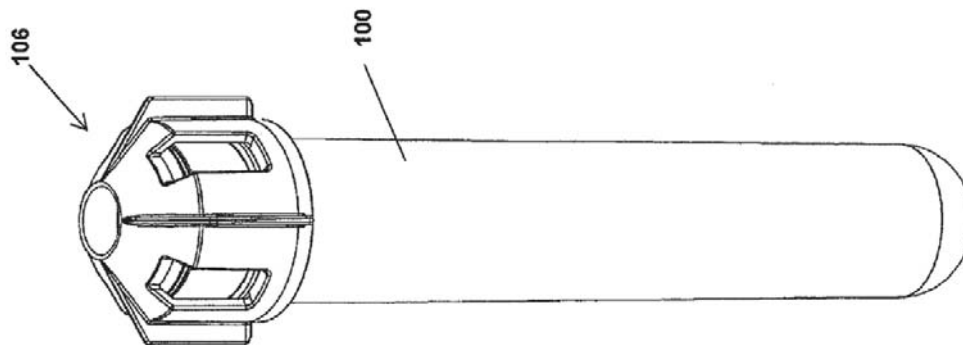


Figura 13A

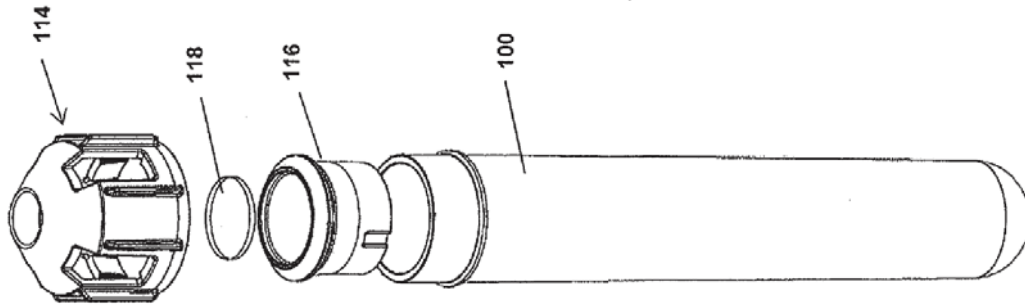


Figura 14B

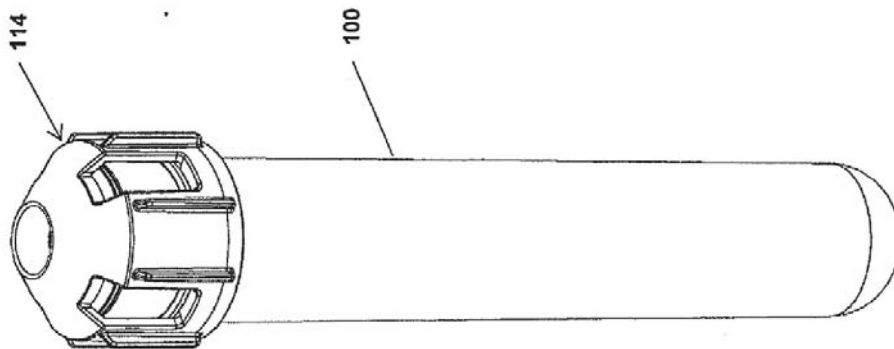


Figura 14A

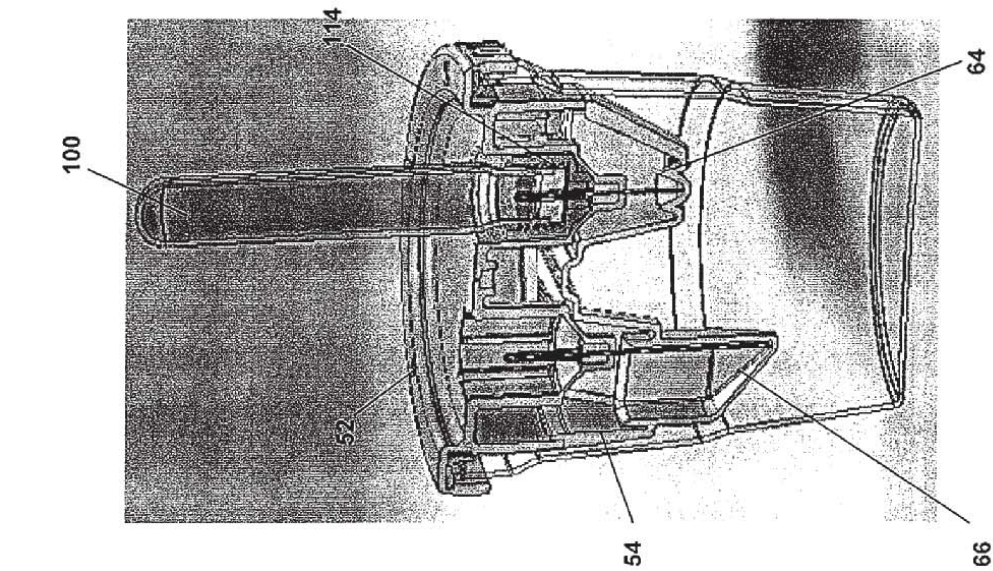


Figura 17

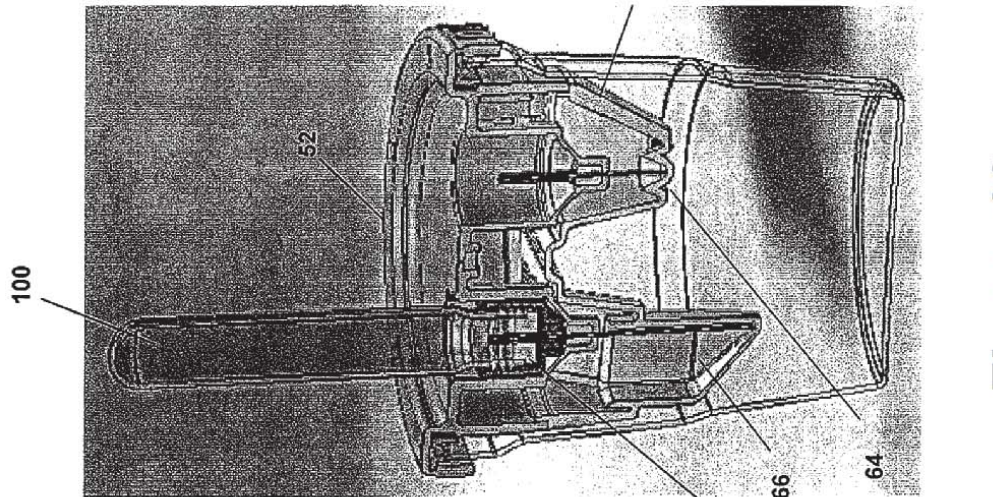


Figura 16

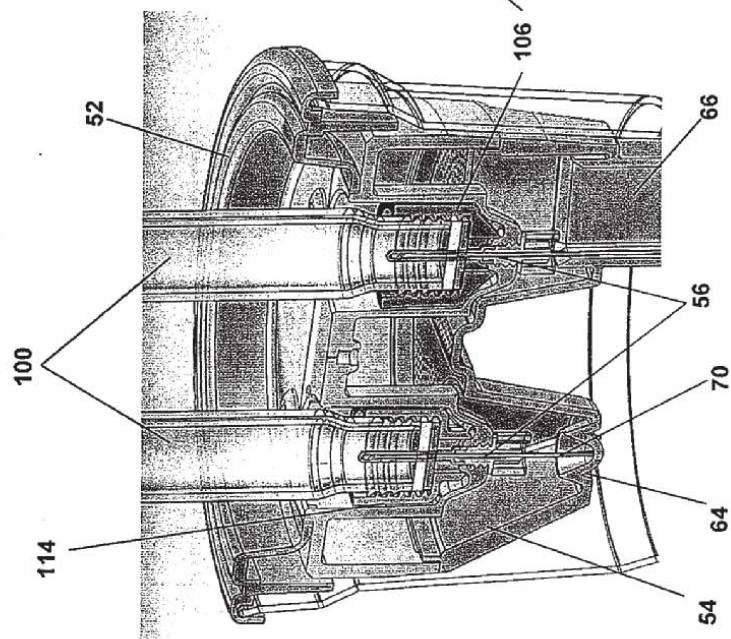


Figura 15

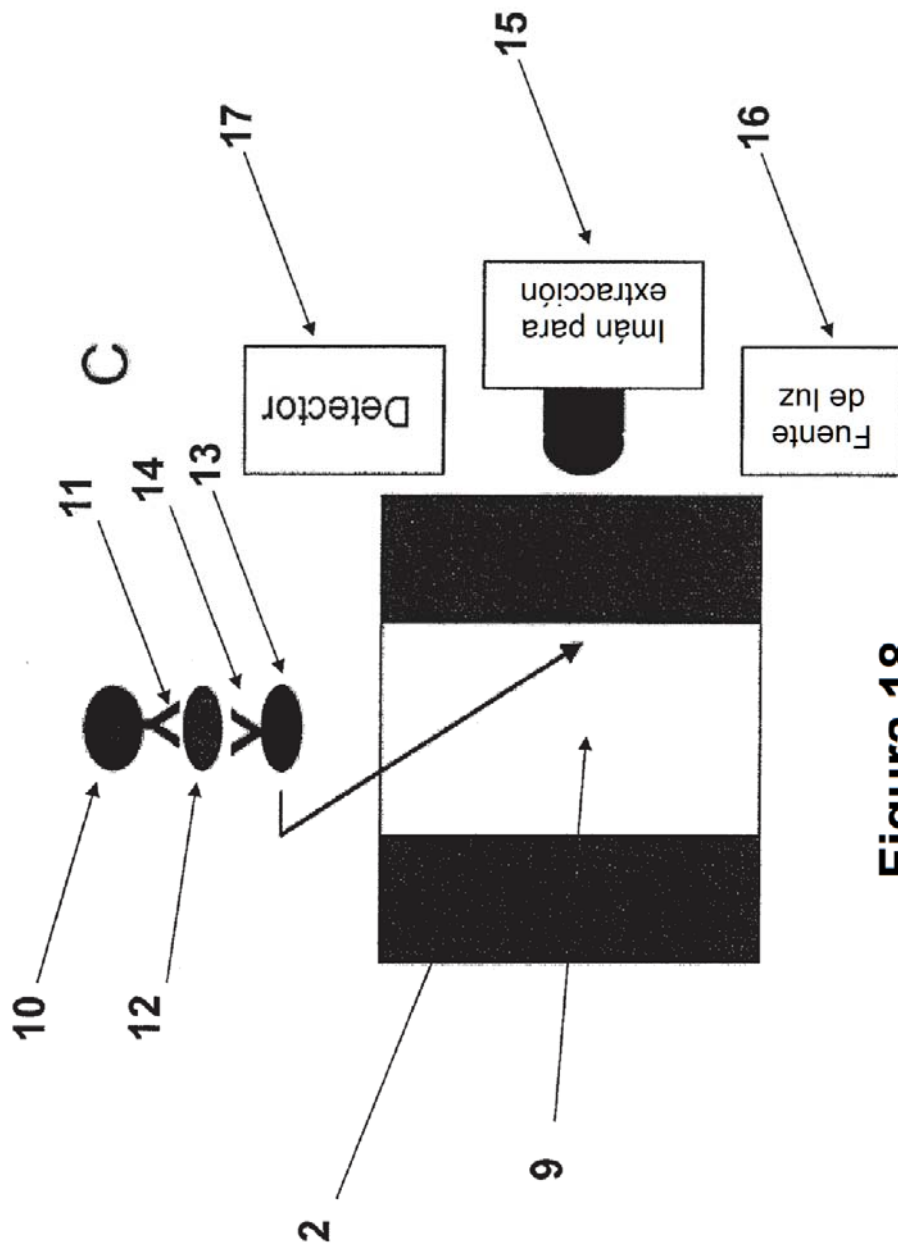


Figura 18

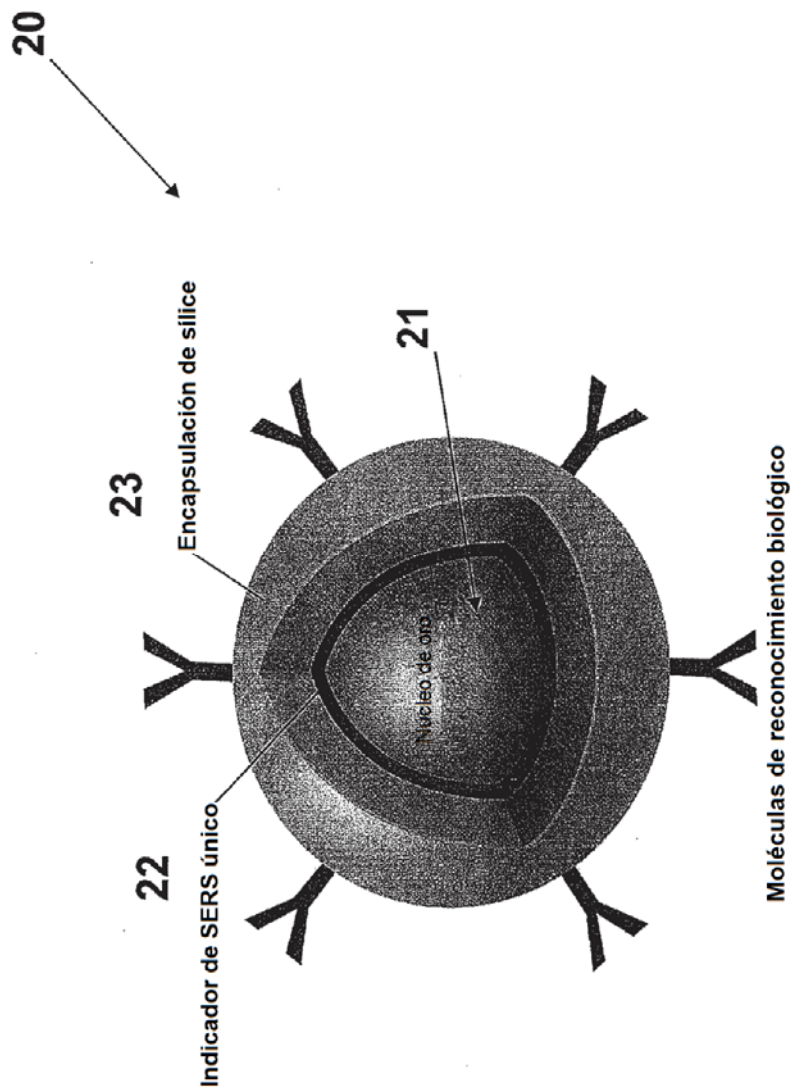


Figura 19

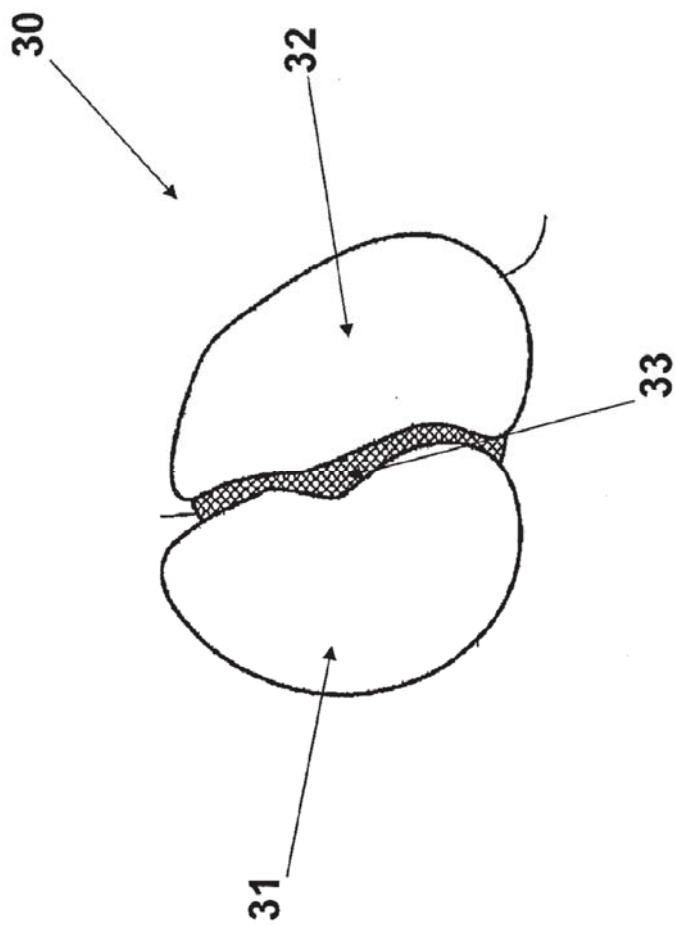


Figura 20

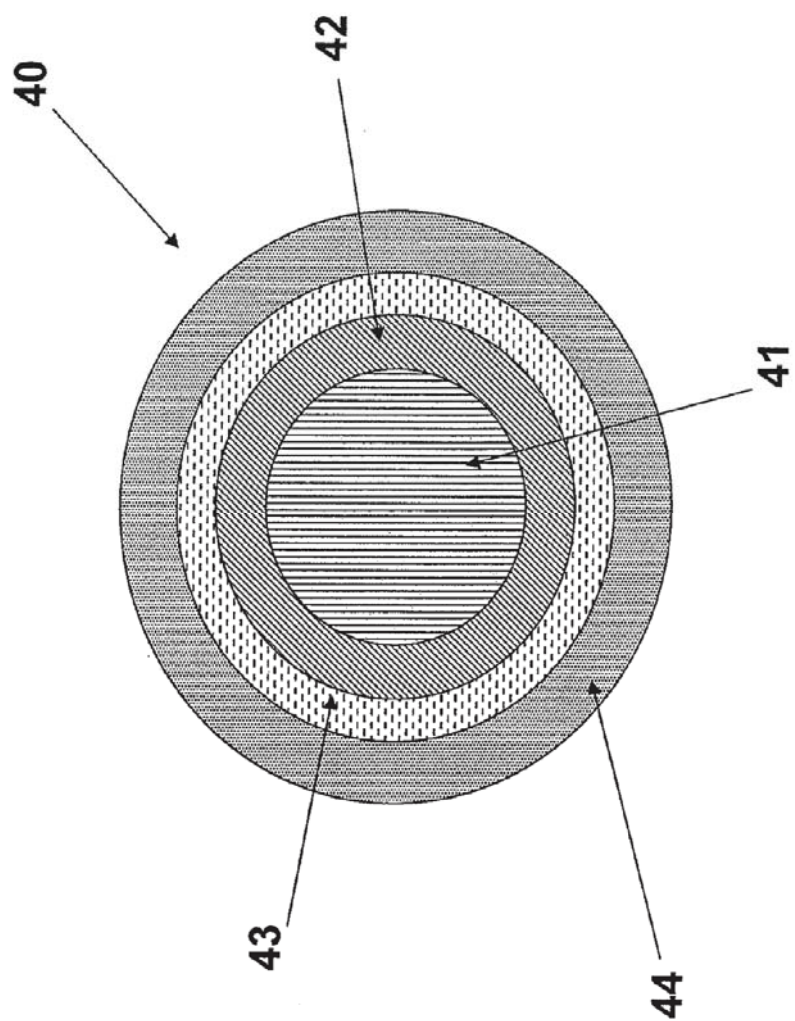


Figura 21

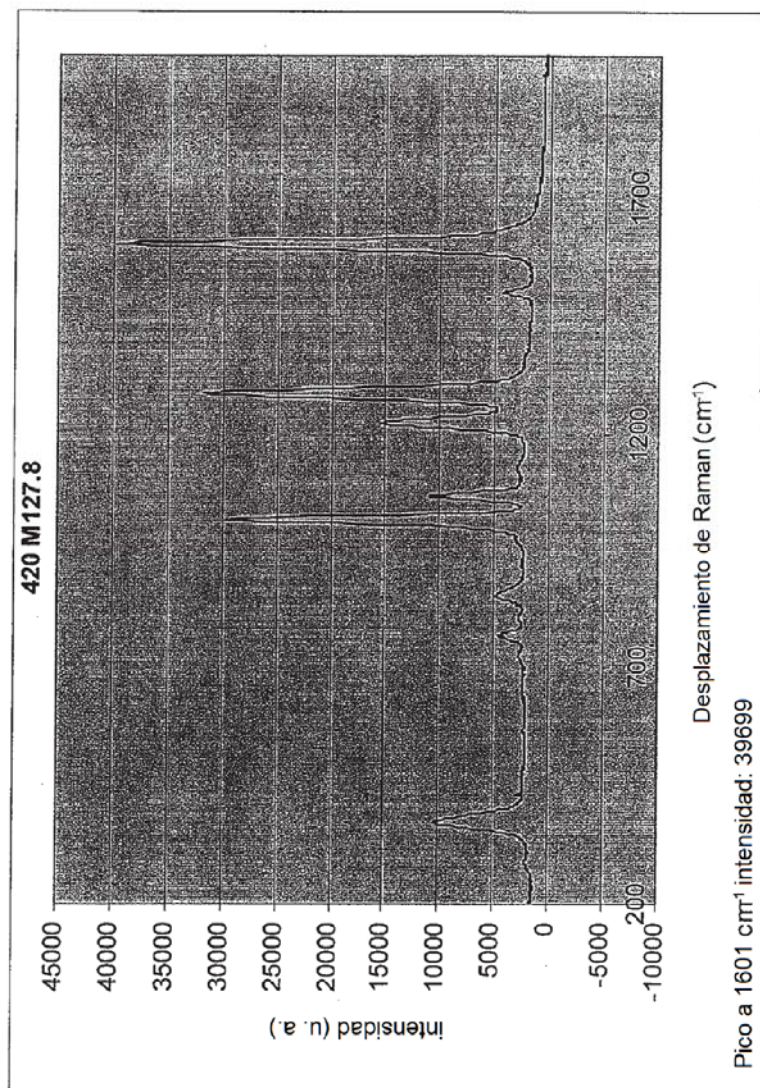


Figura 22

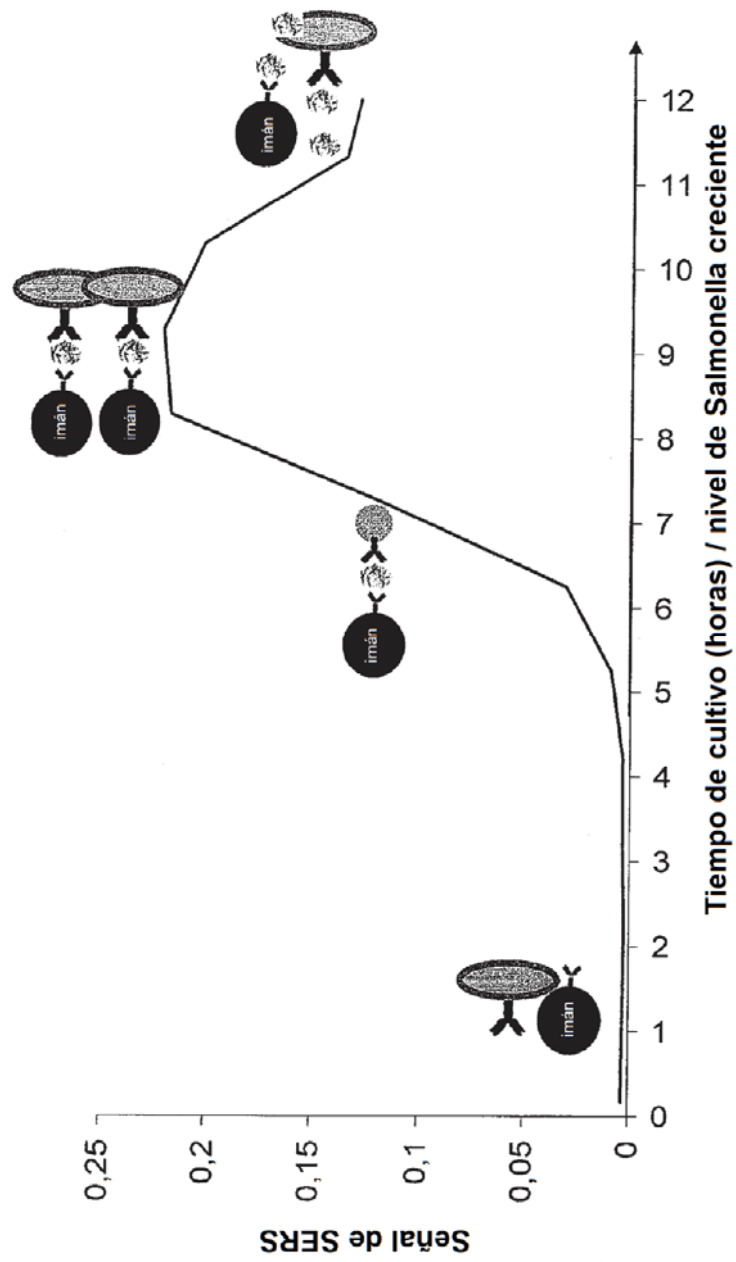


Figura 23

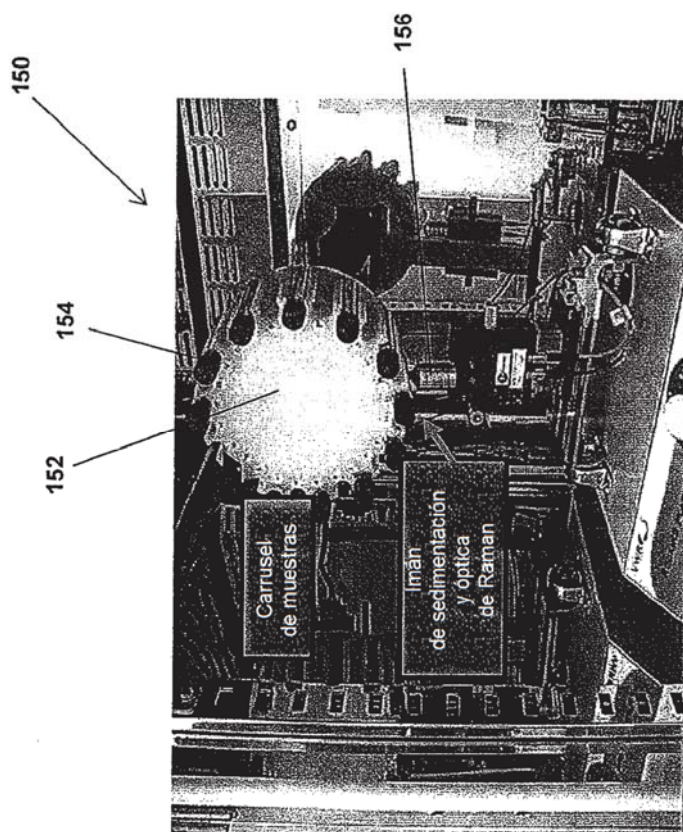


Figura 24

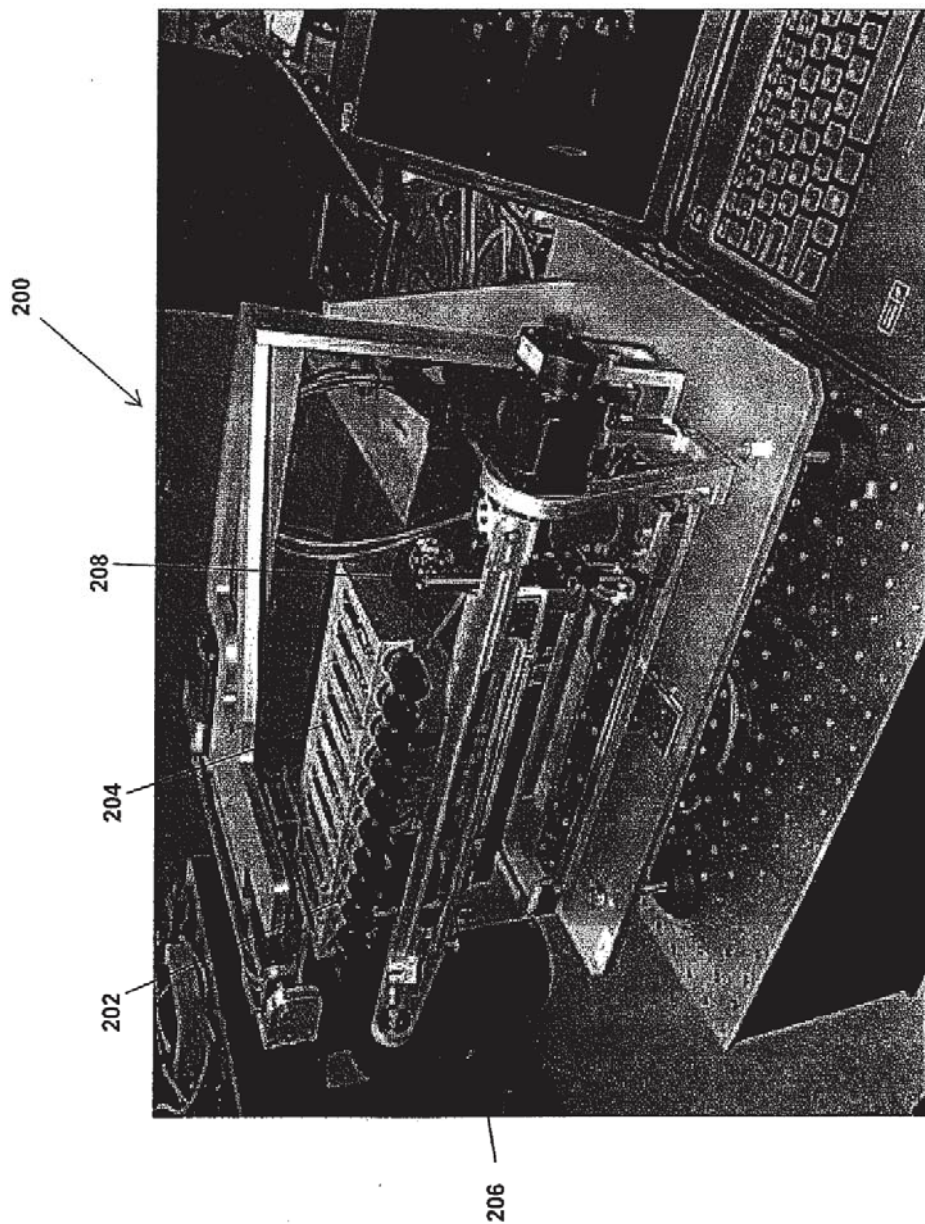


Figura 25

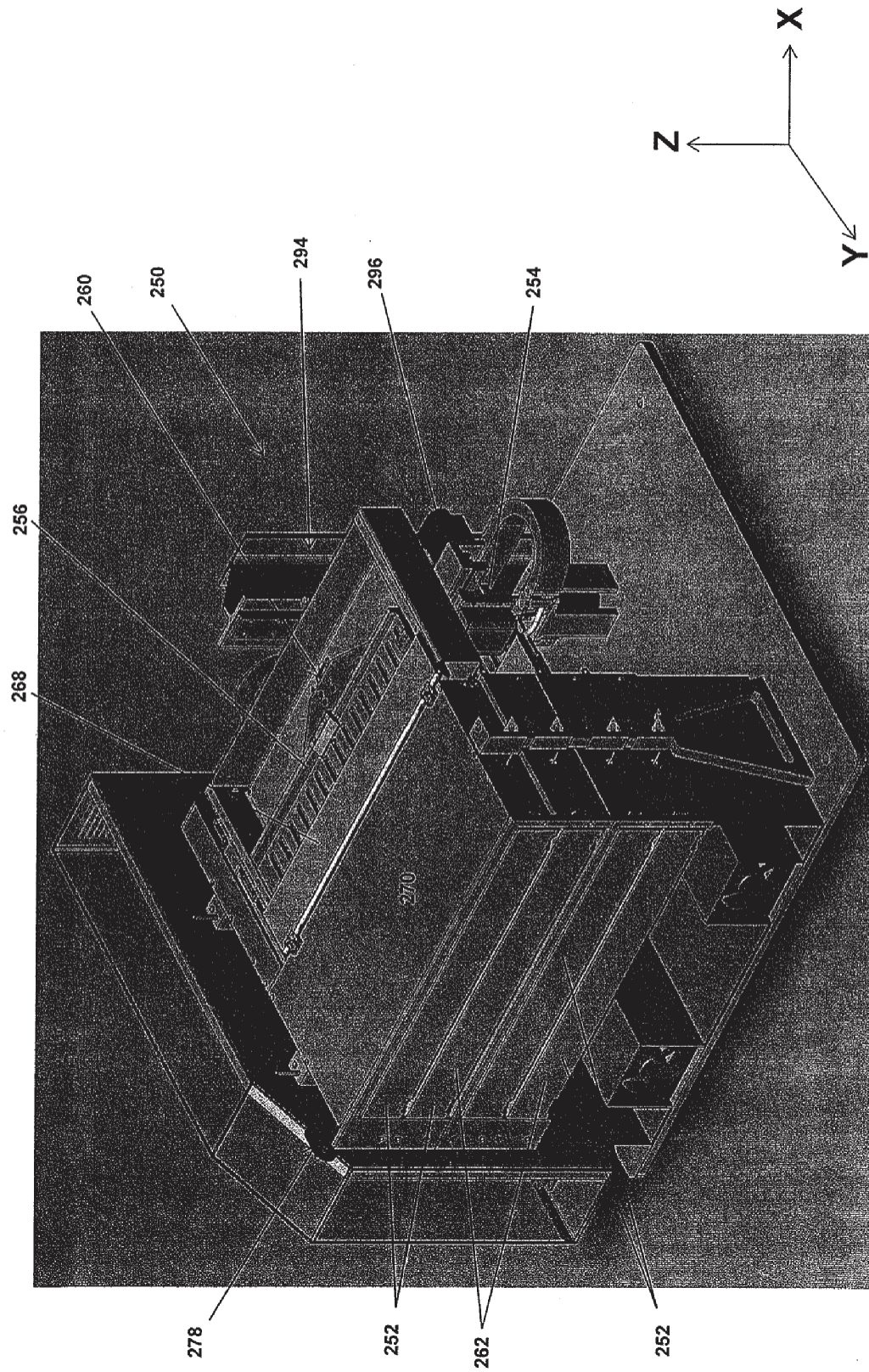


Figura 26

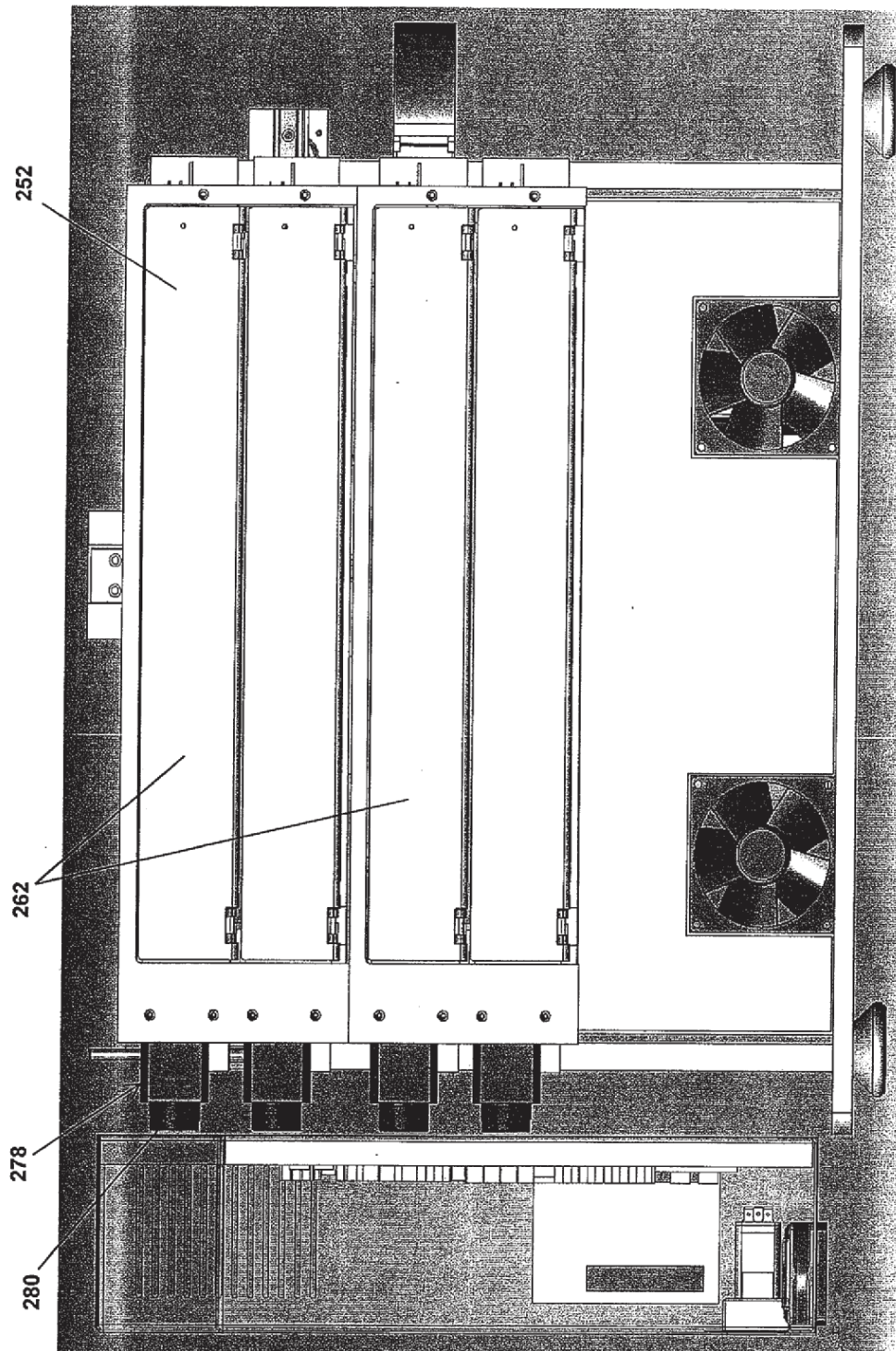


Figura 27

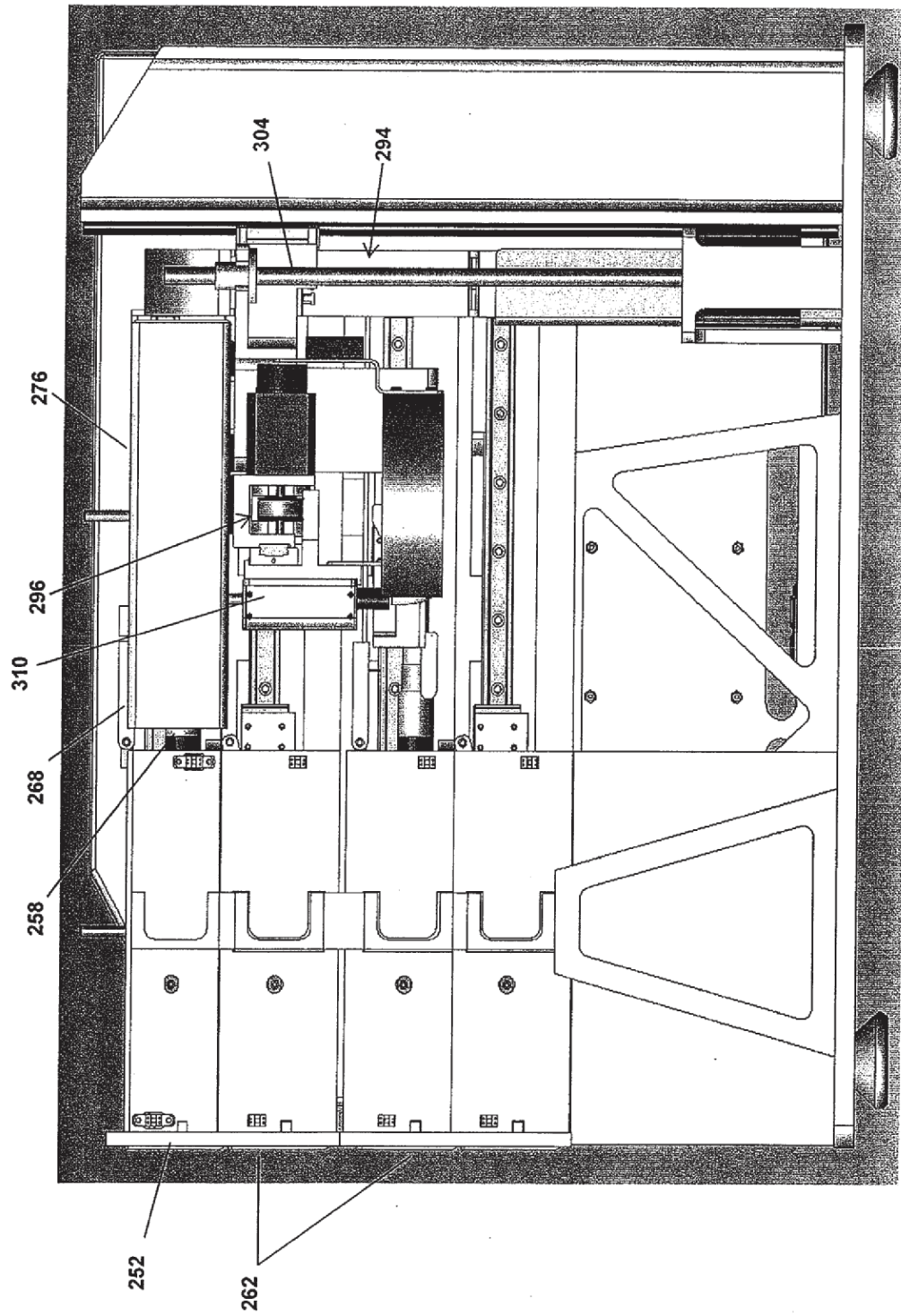


Figura 28

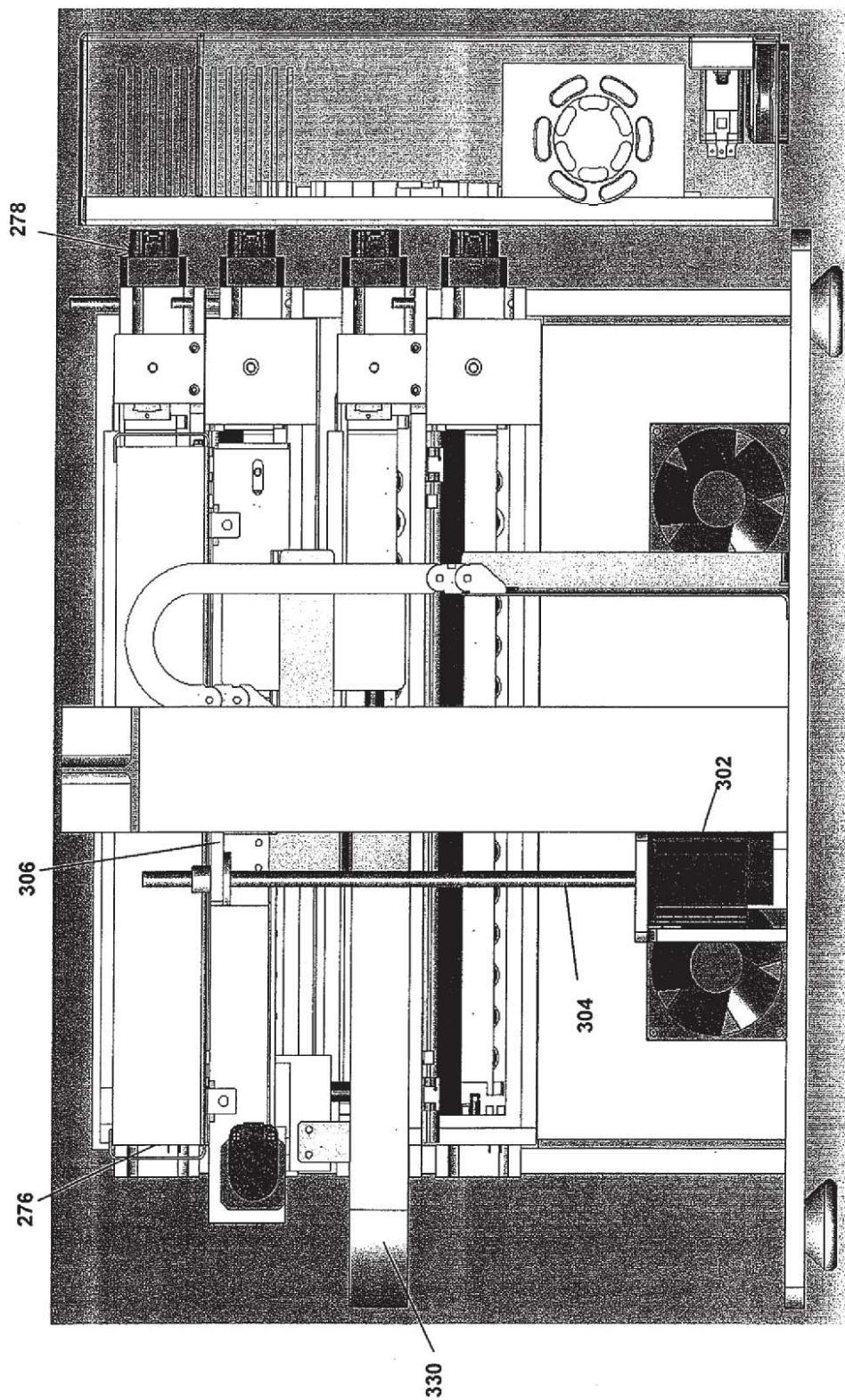


Figura 29

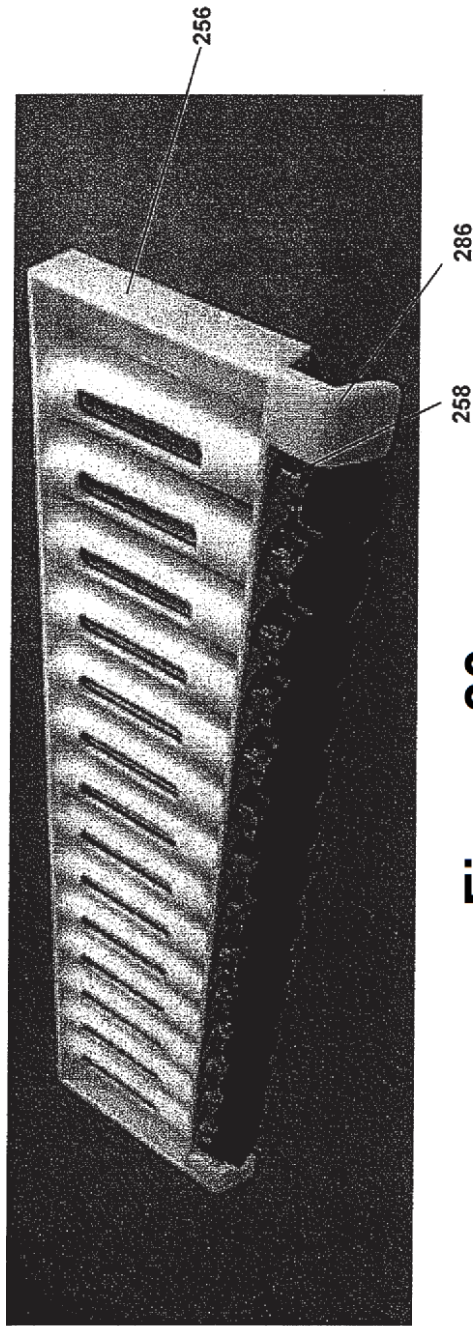


Figura 30



Figura 31

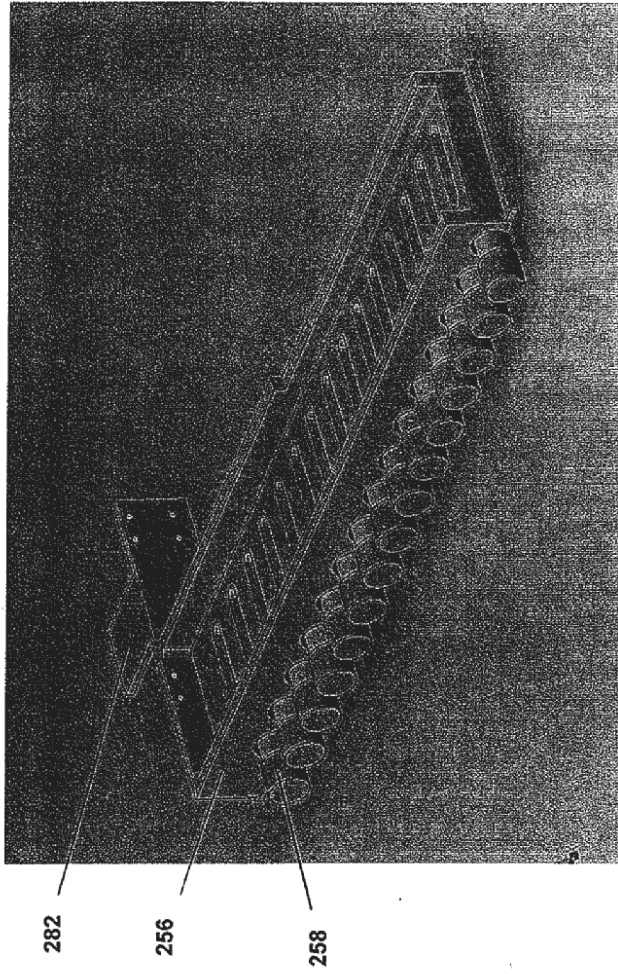


Figura 32

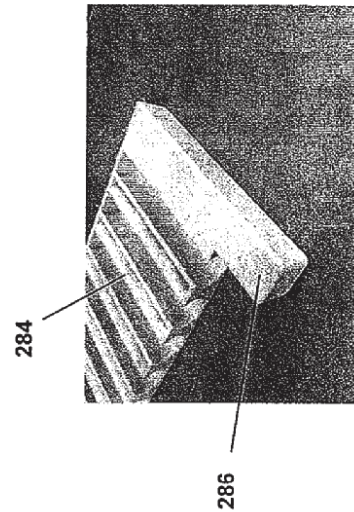


Figura 33A



Figura 33B

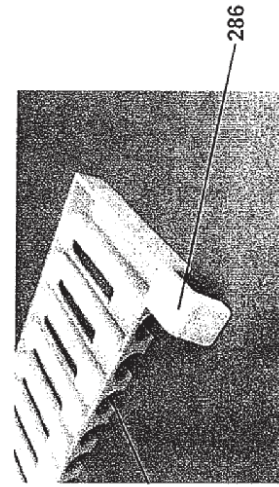


Figura 33C

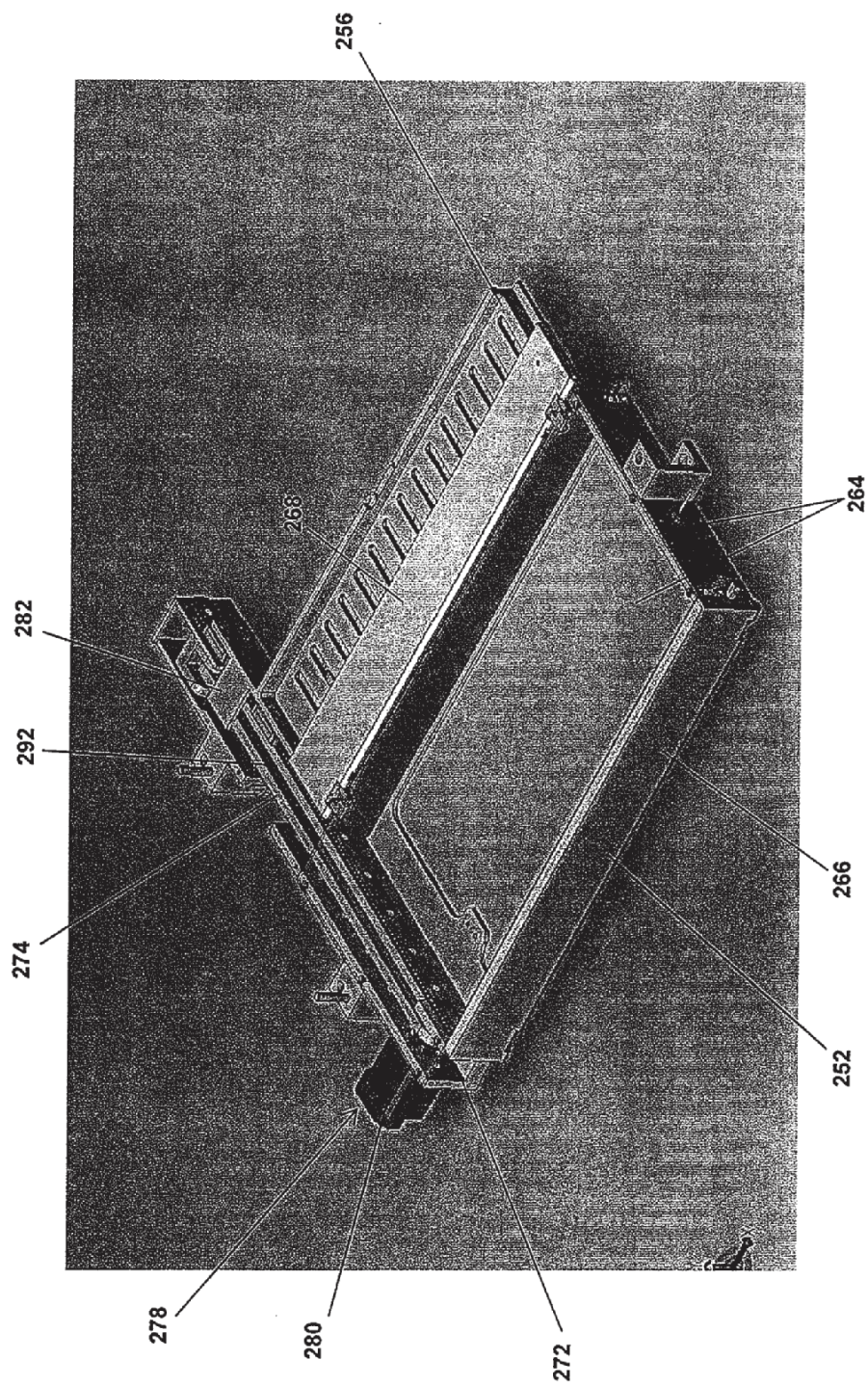


Figura 34

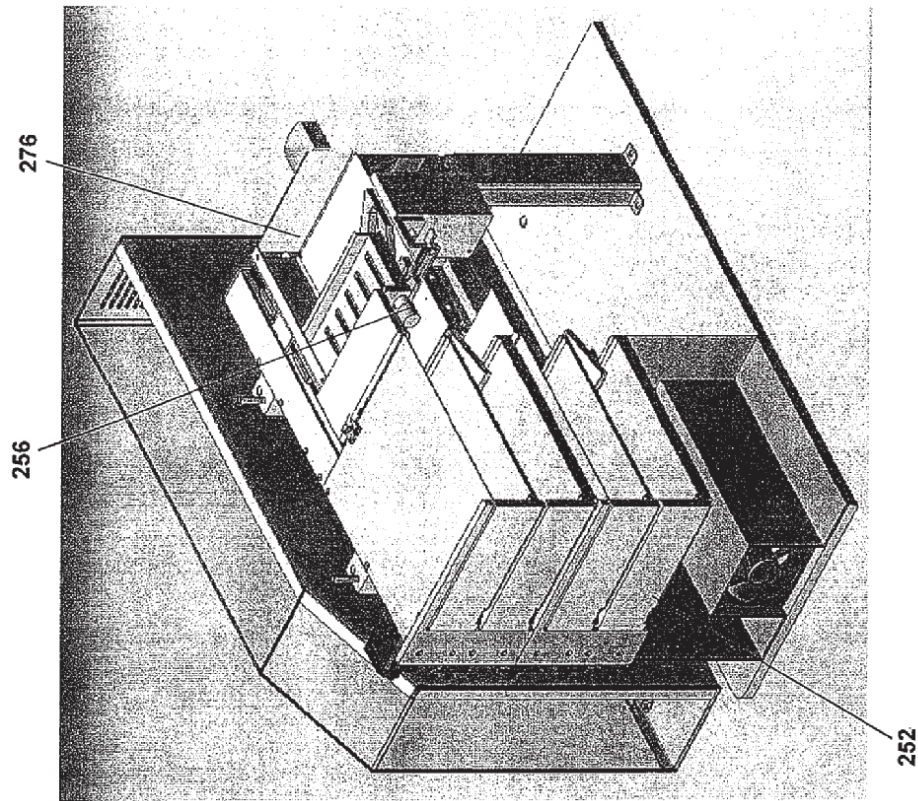


Figura 36

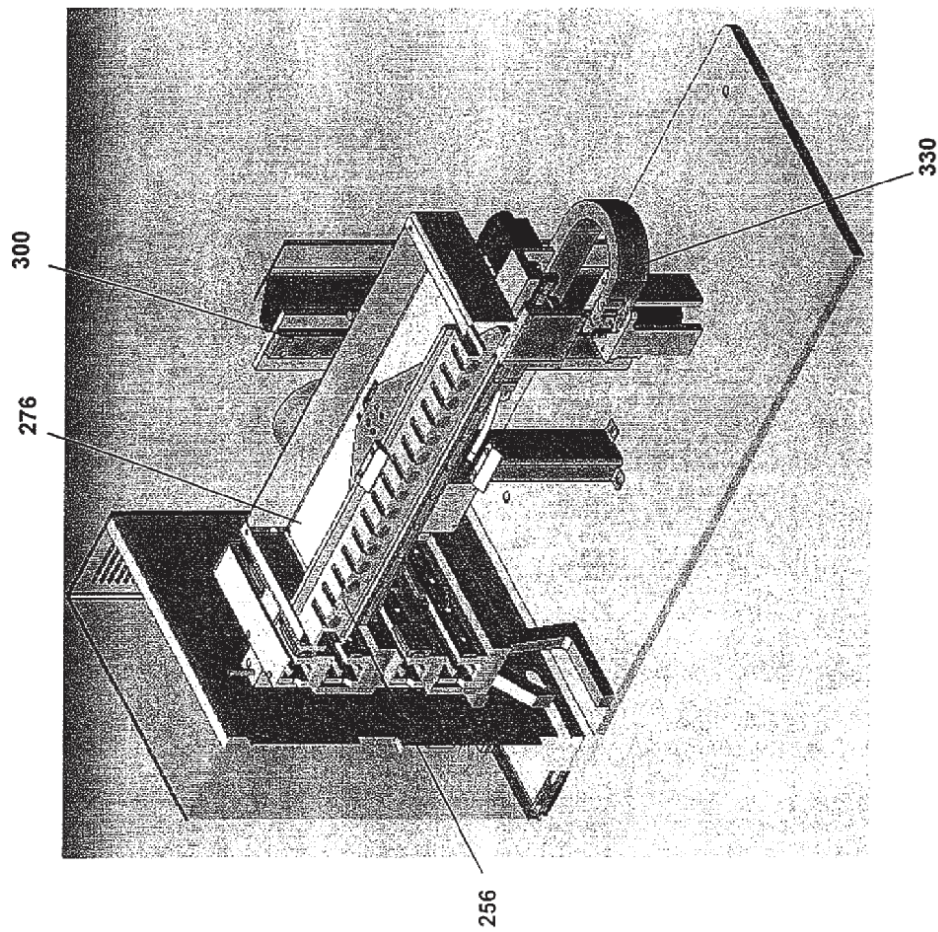


Figura 35

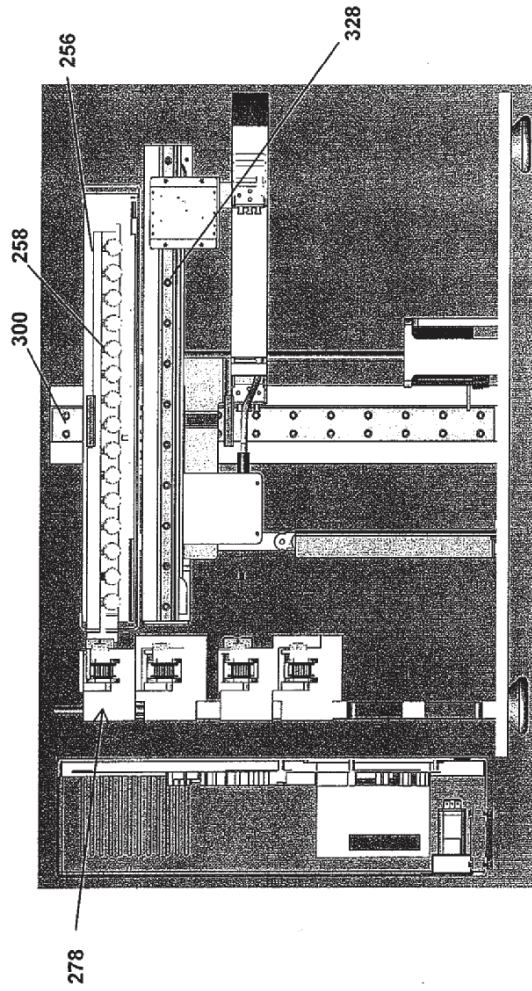


Figura 37

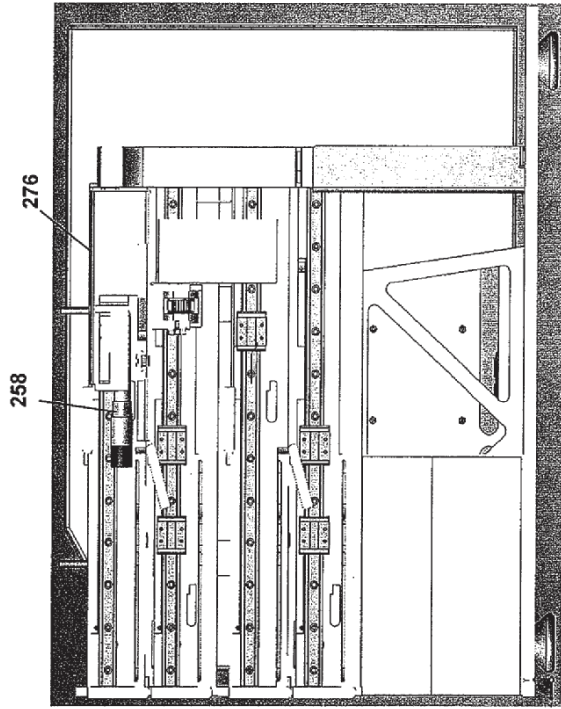


Figura 38

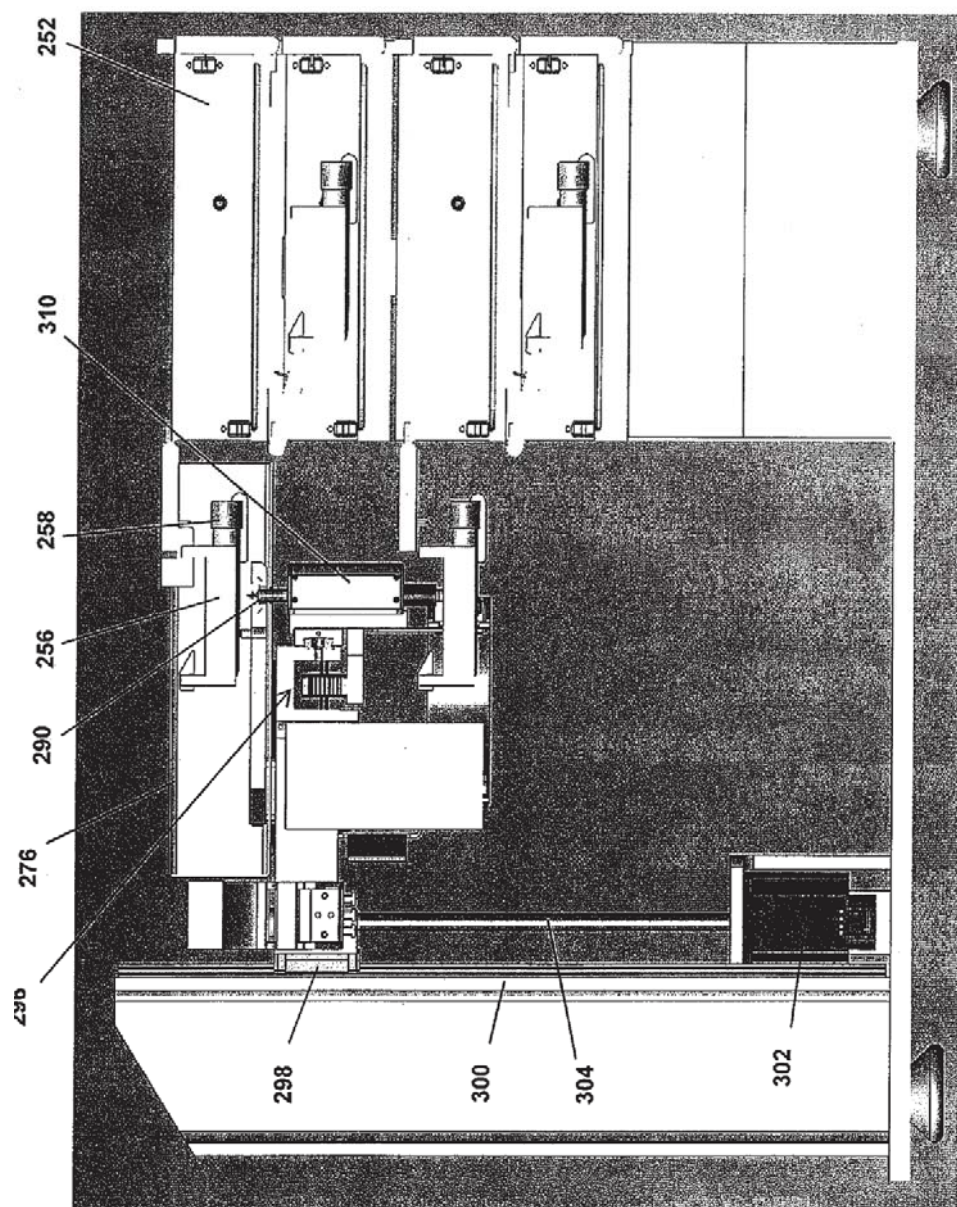


Figura 39

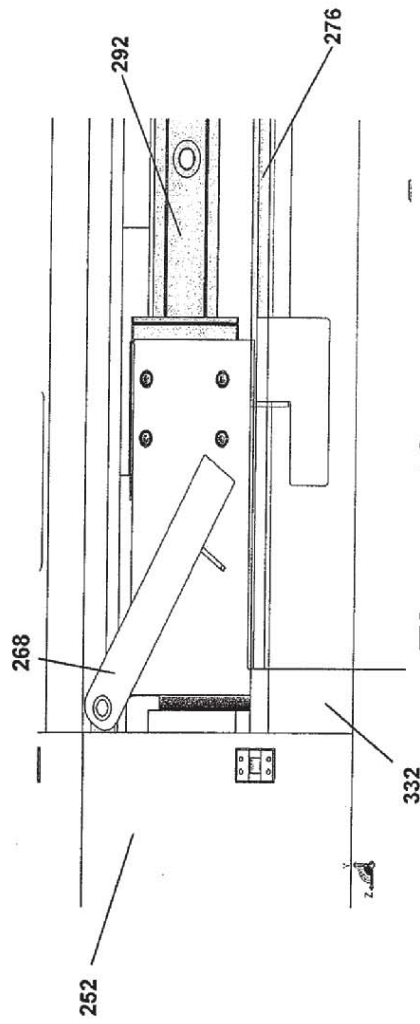


Figura 40

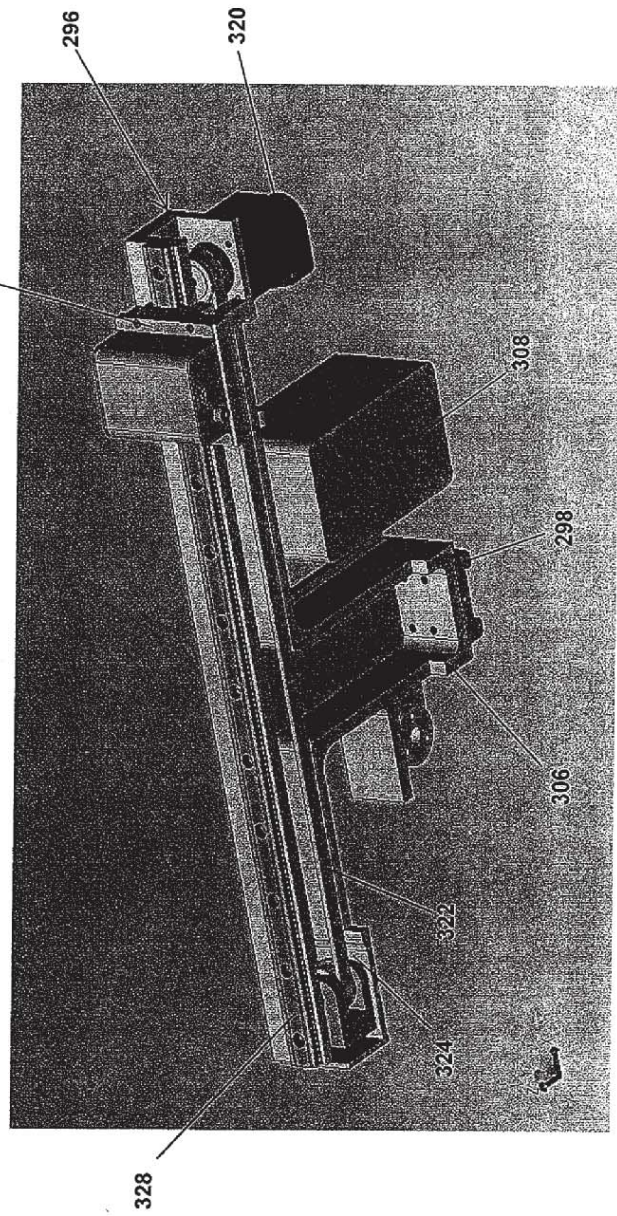


Figura 41

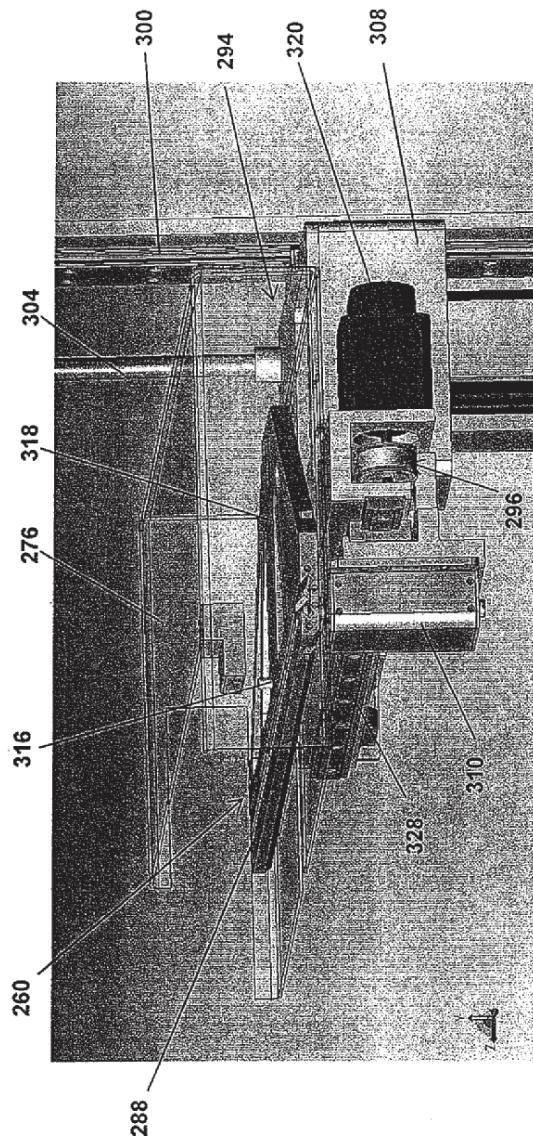


Figura 42

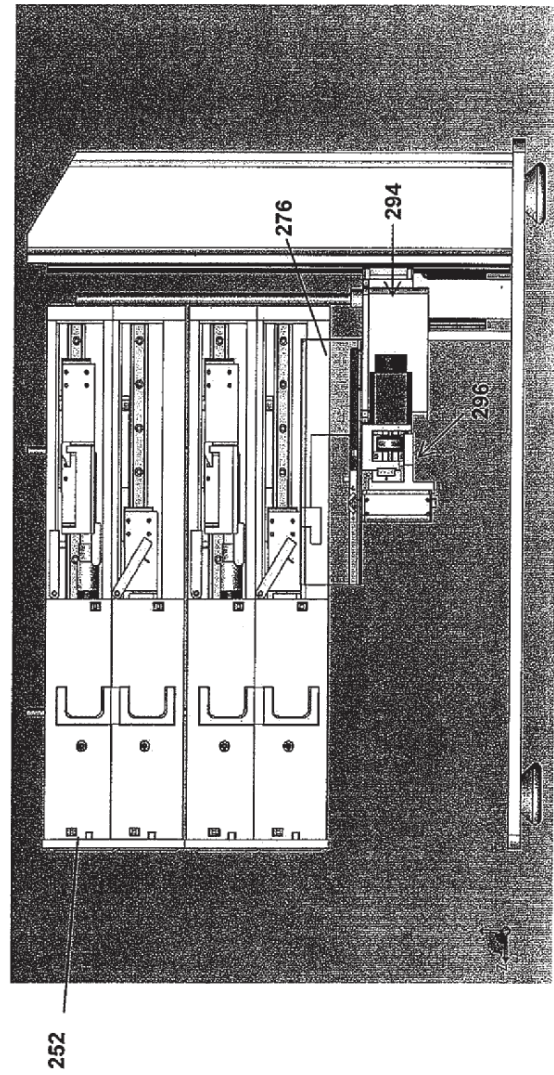


Figura 43

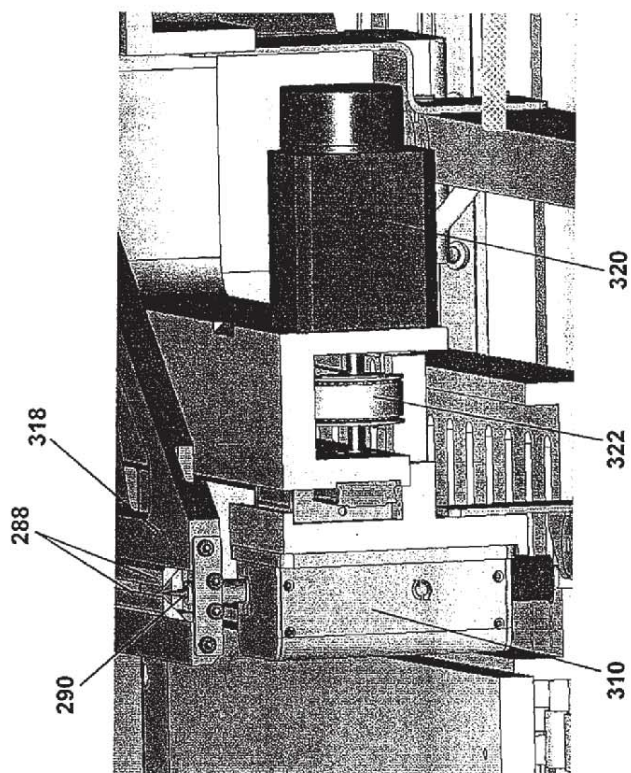


Figura 45

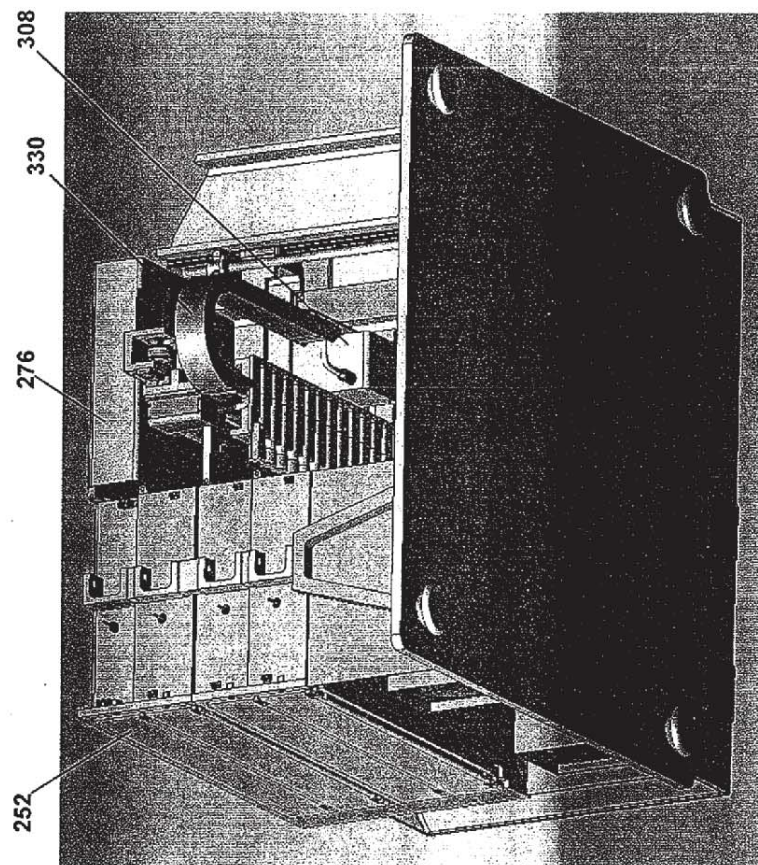
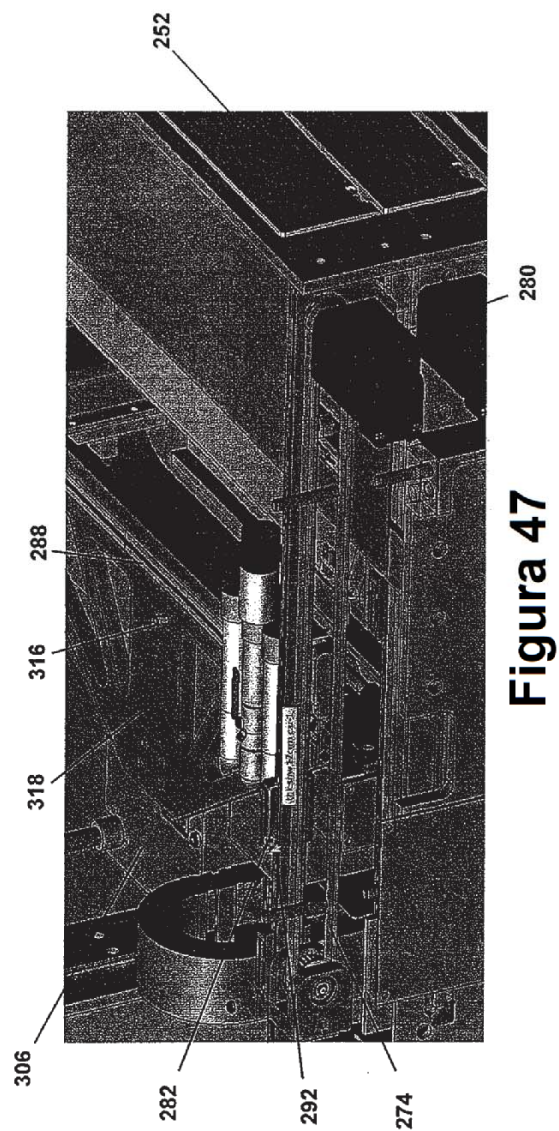
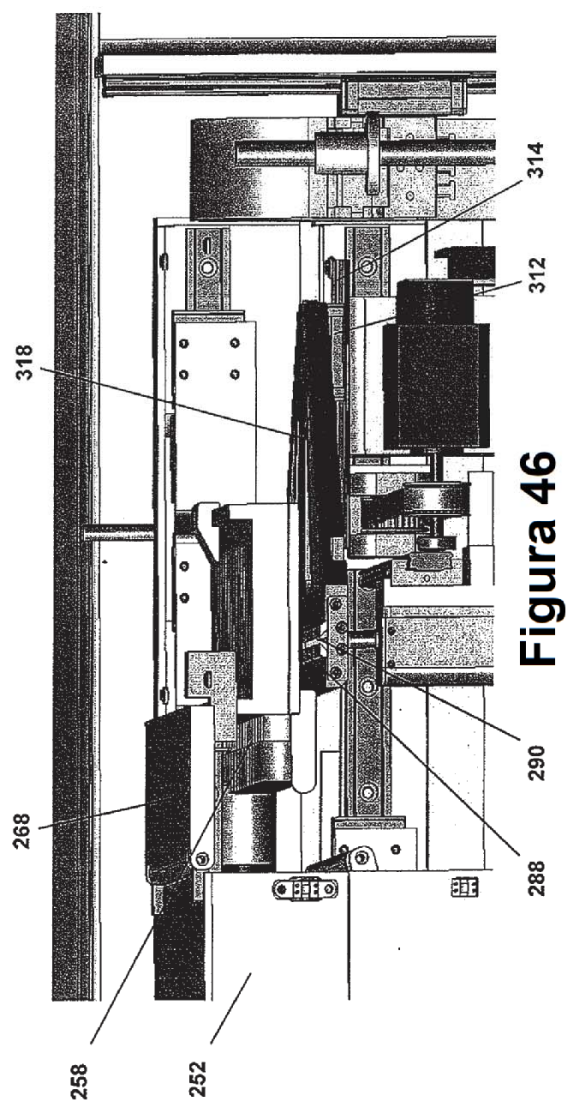


Figura 44



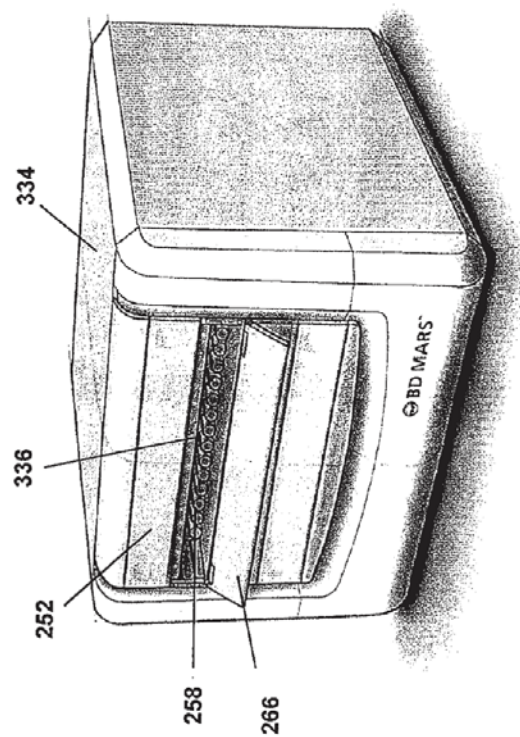


Figura 48B

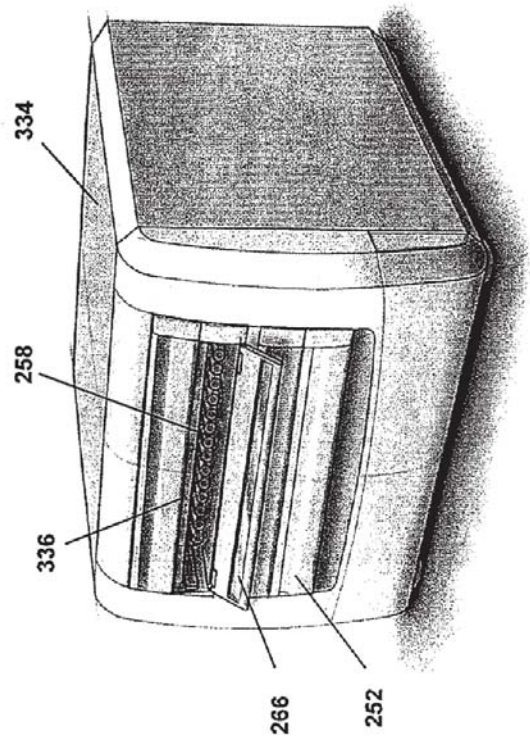


Figura 48A

Sedimentación y agitación para muestras de grandes volúmenes

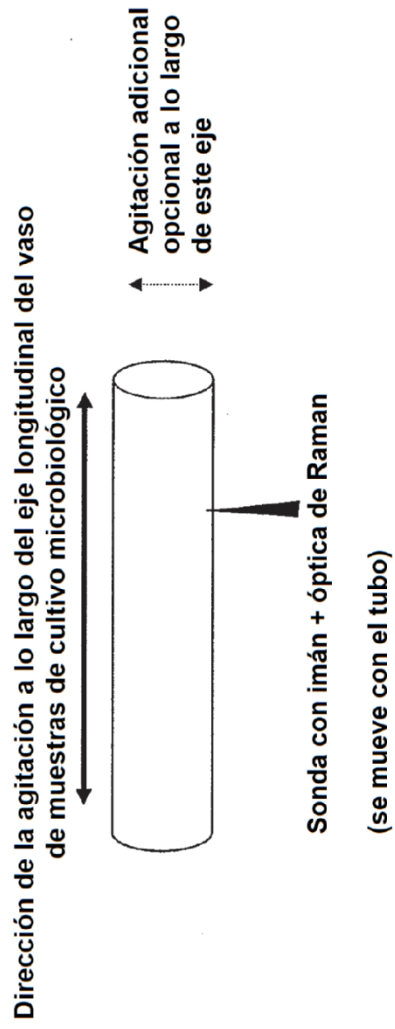


Figura 49

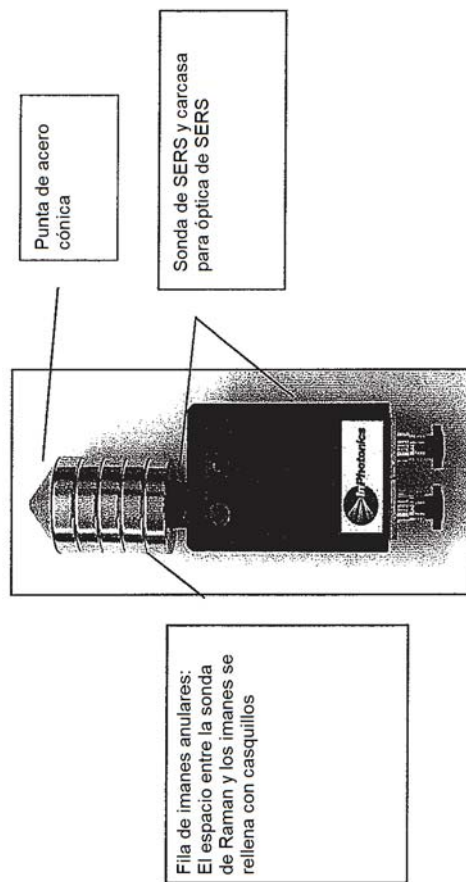


Figura 50

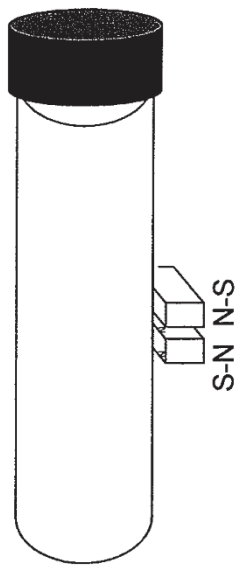


Figura 51

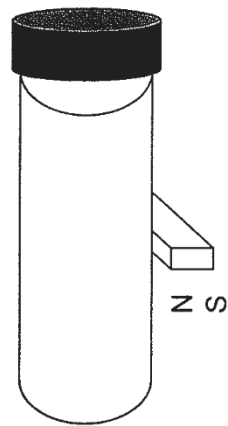


Figura 52

Detección múltiple de *S. aureus* y *S. epidermidis*

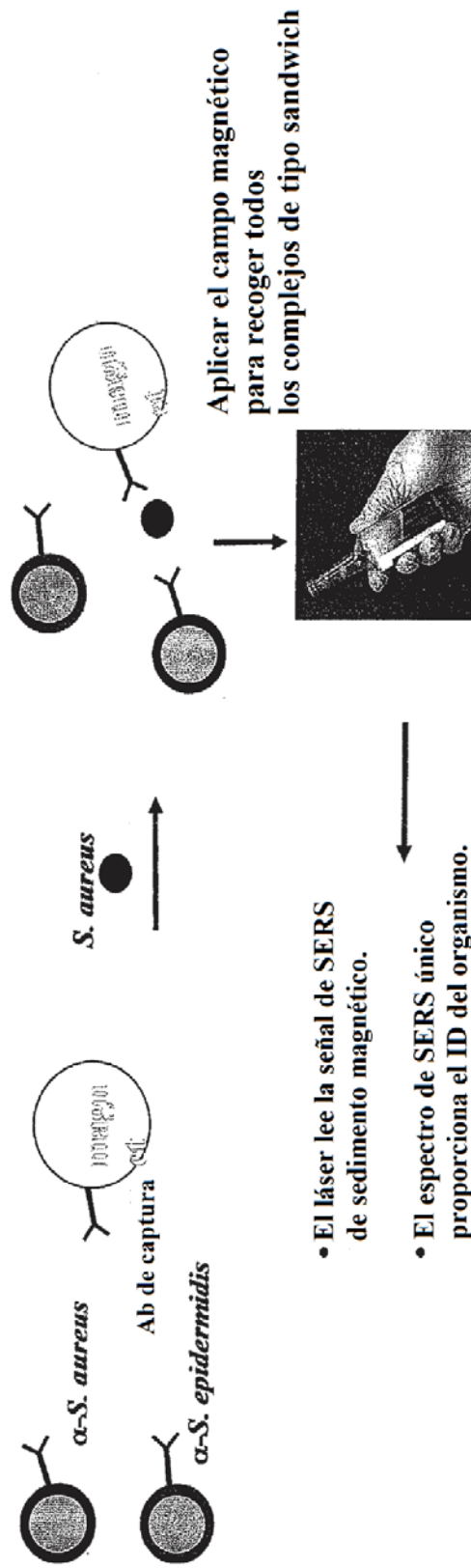


Figura 53

	Tiempo hasta la detección (horas)	
	Frasco 1	Frasco 2
Control negativo	Sin detección	Sin detección
Solamente partículas (control negativo)	Sin detección	Sin detección
Solamente E. Coli	11	10,7
E. Coli + partículas	10,8	10,5

Figura 54

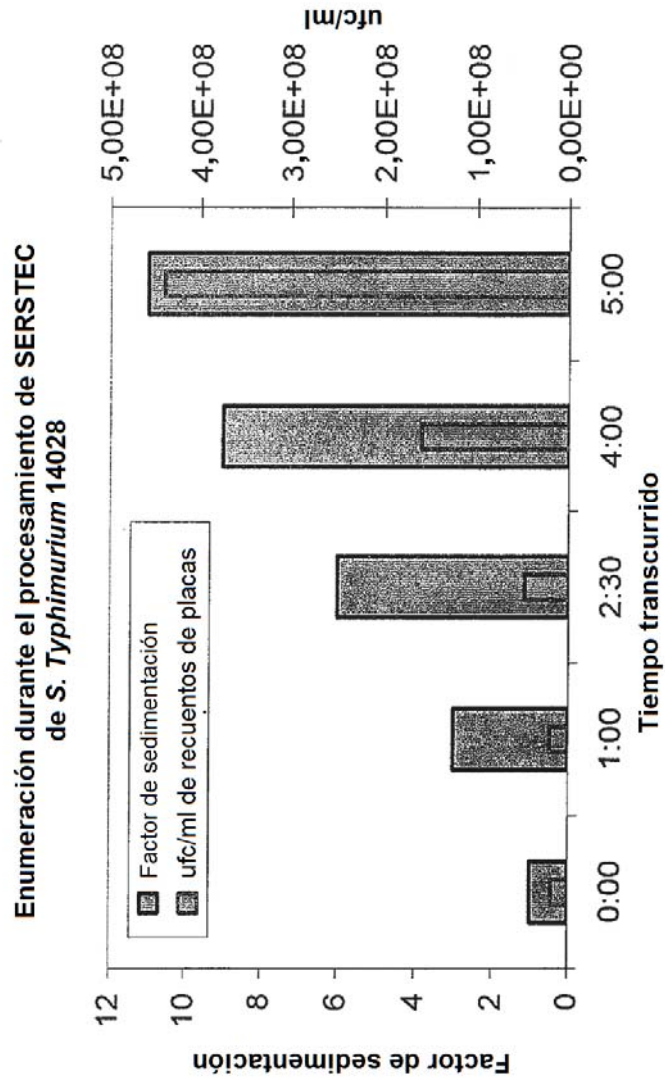


Figura 55

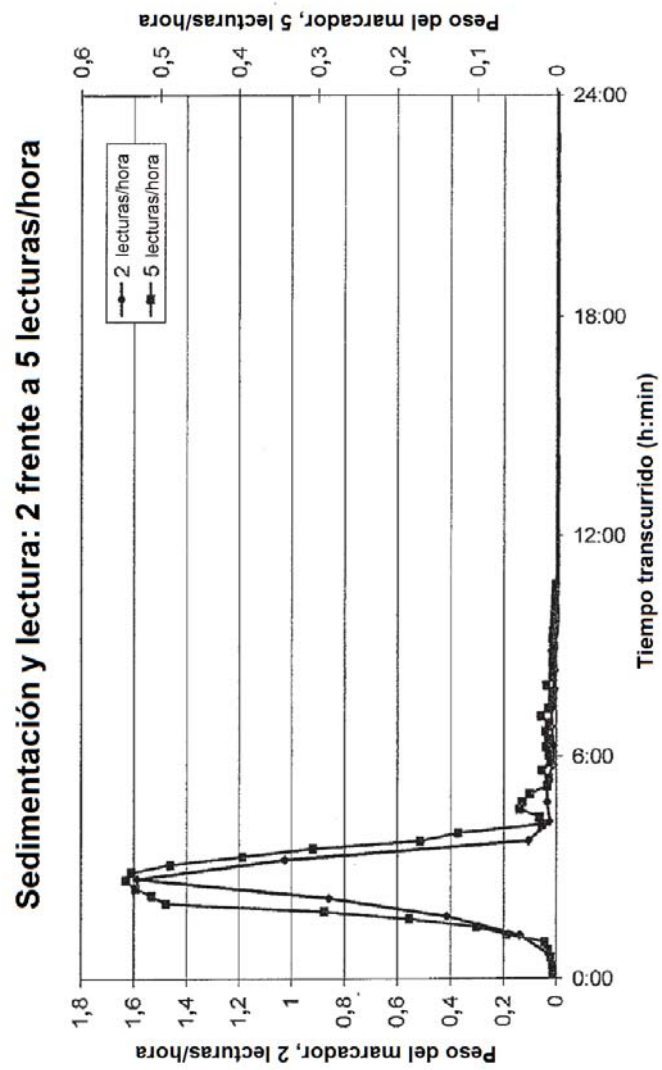


Figura 56

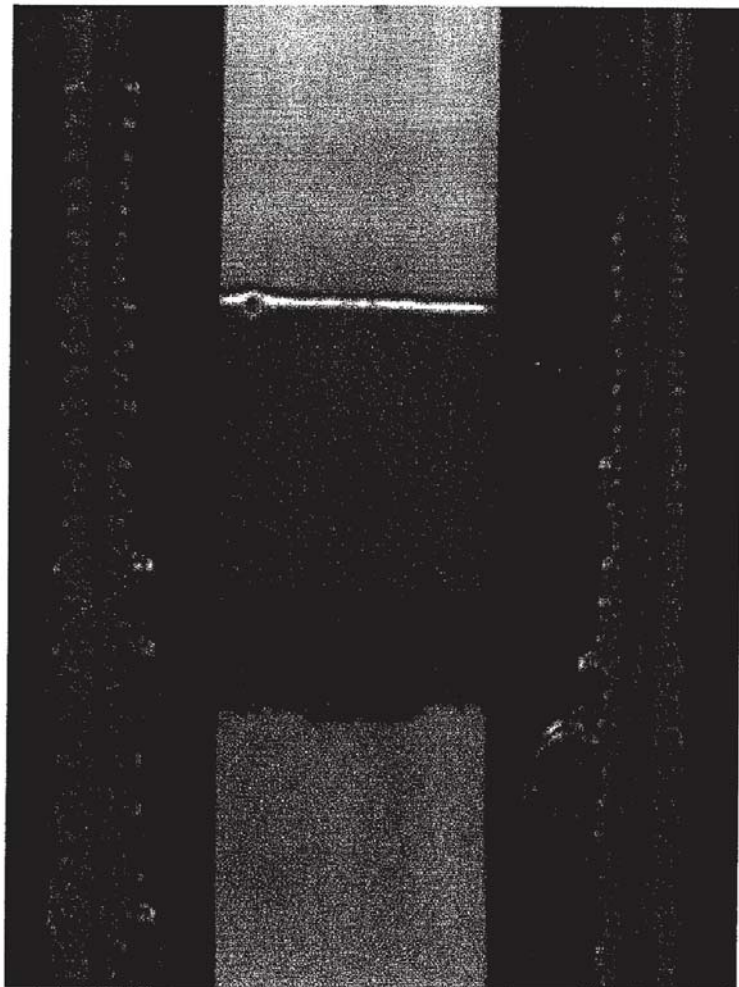


Figura 57



Figura 58B

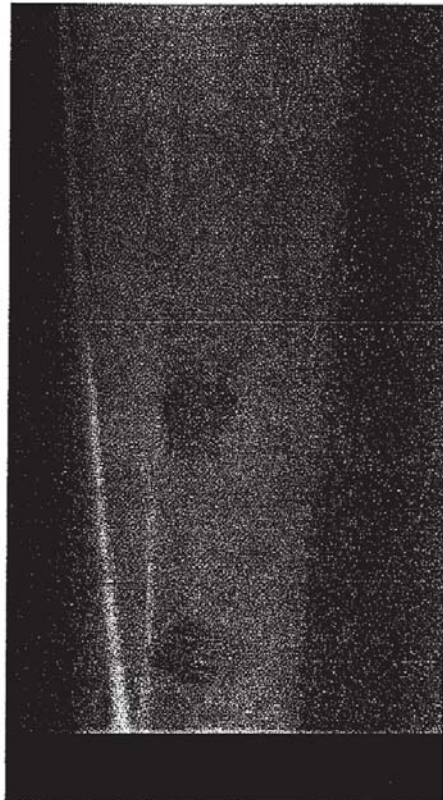


Figura 58A



Figura 59B

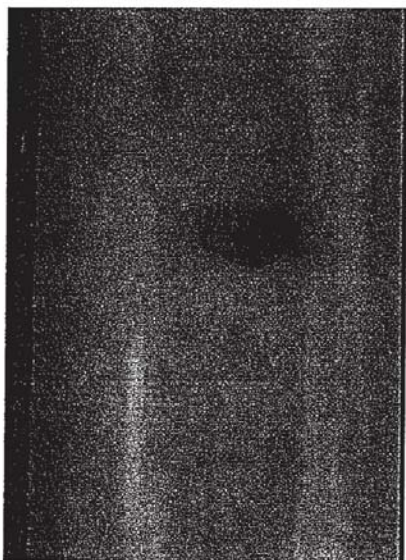


Figura 59A

Detección sencilla de *C. albicans* en sangre humana

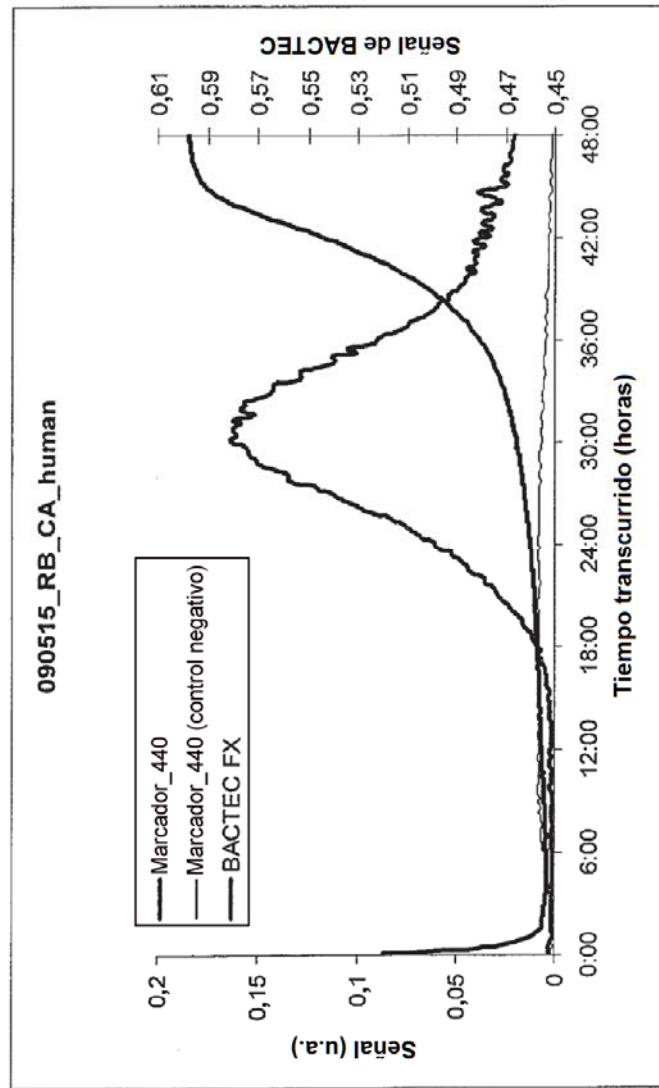


Figura 60

Detección de *C. albicans* en formato ensayo cuádruple

Modelo cuádruple: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. albicans* y *Staphylococcus (aureus y epidermidis)*

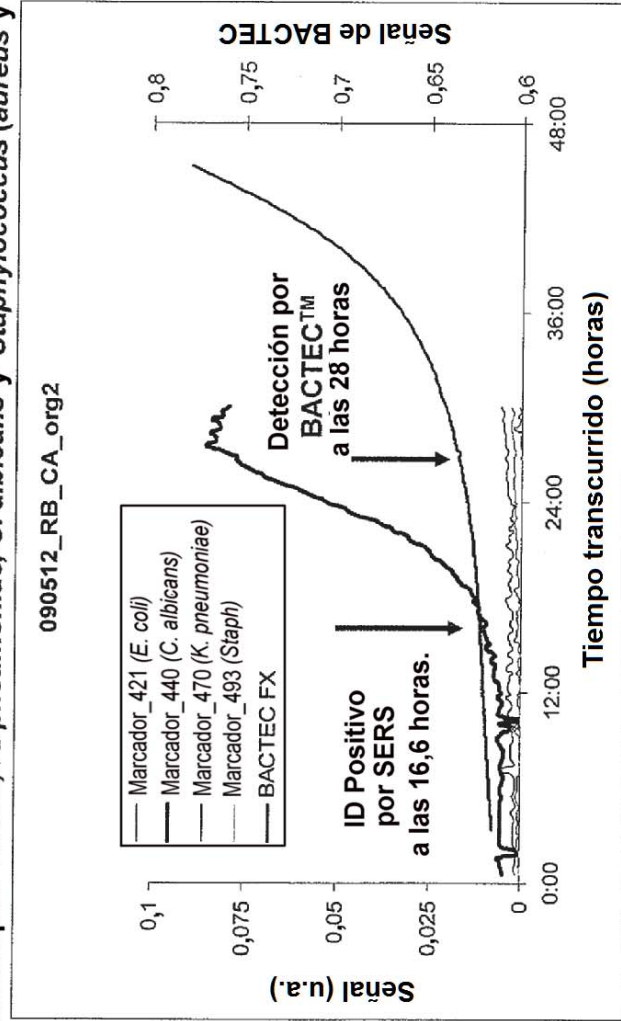


Figura 61

Detección múltiple de coinfección

Detección de coinfección por *E. coli* y *S. epidermidis* en sangre de conejo

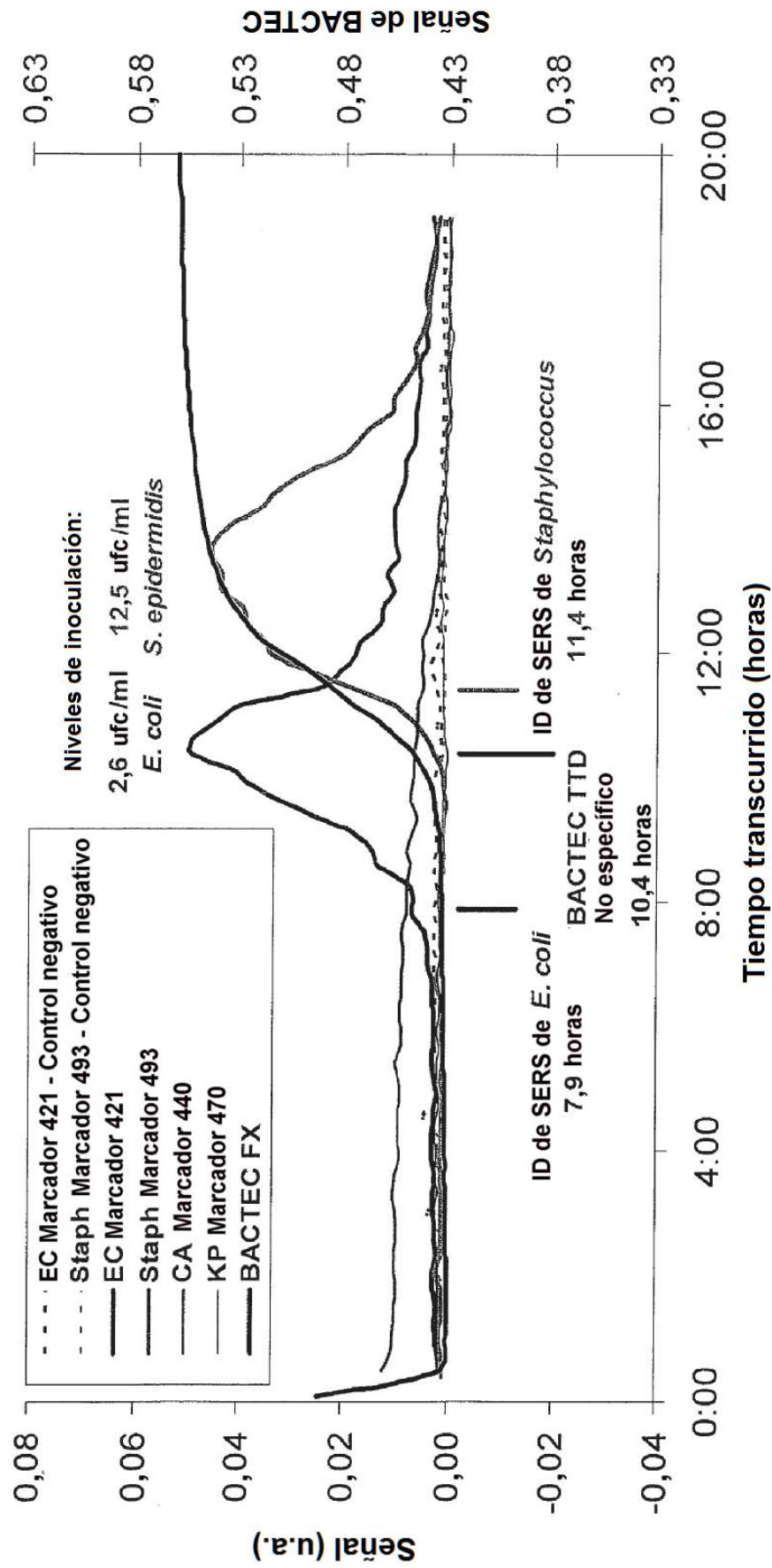


Figura 62

***E. coli* en sangre + medio aeróbico plus**

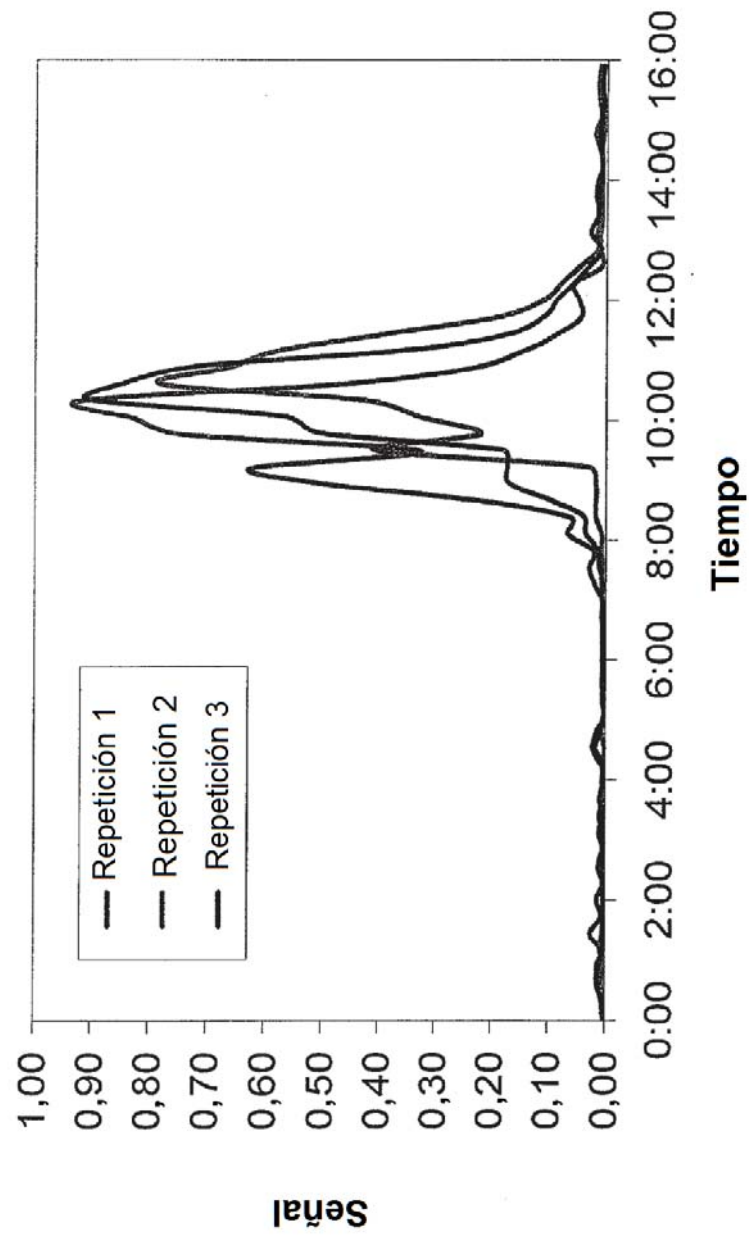


Figura 63

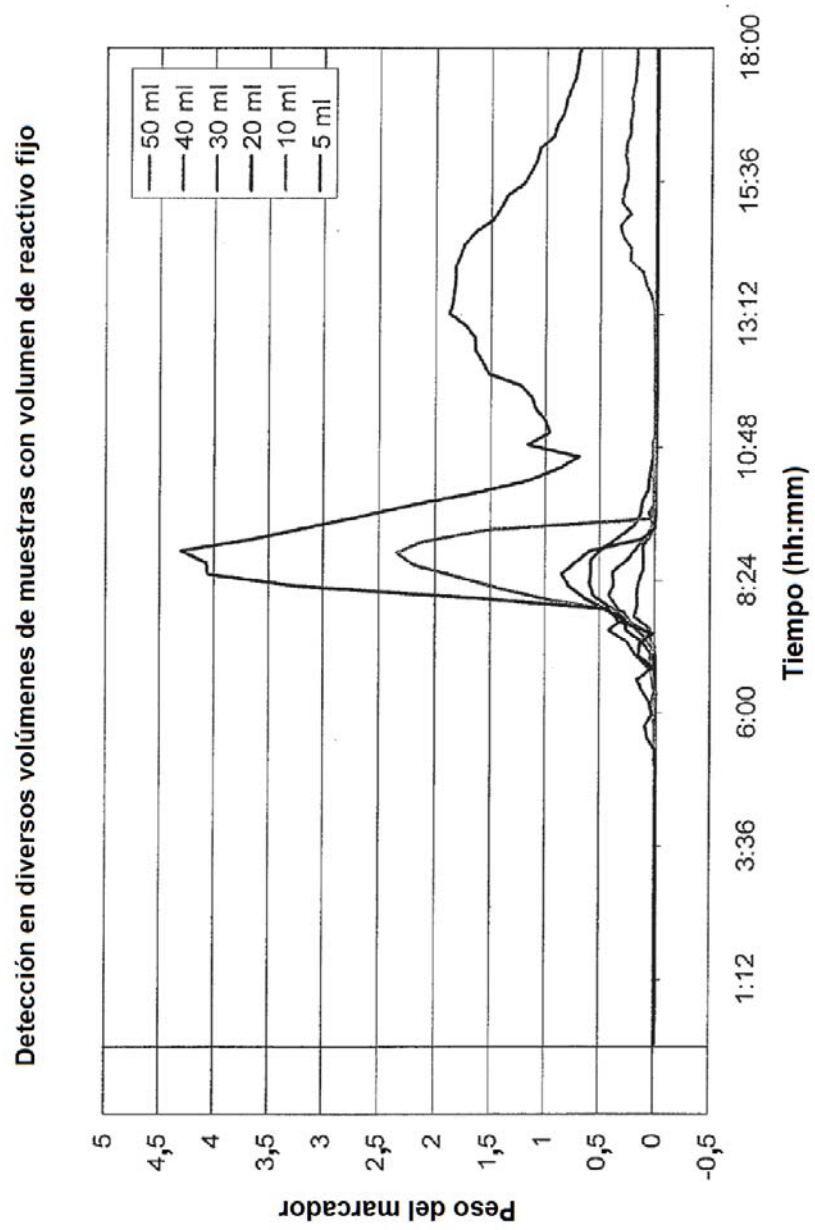


Figura 64

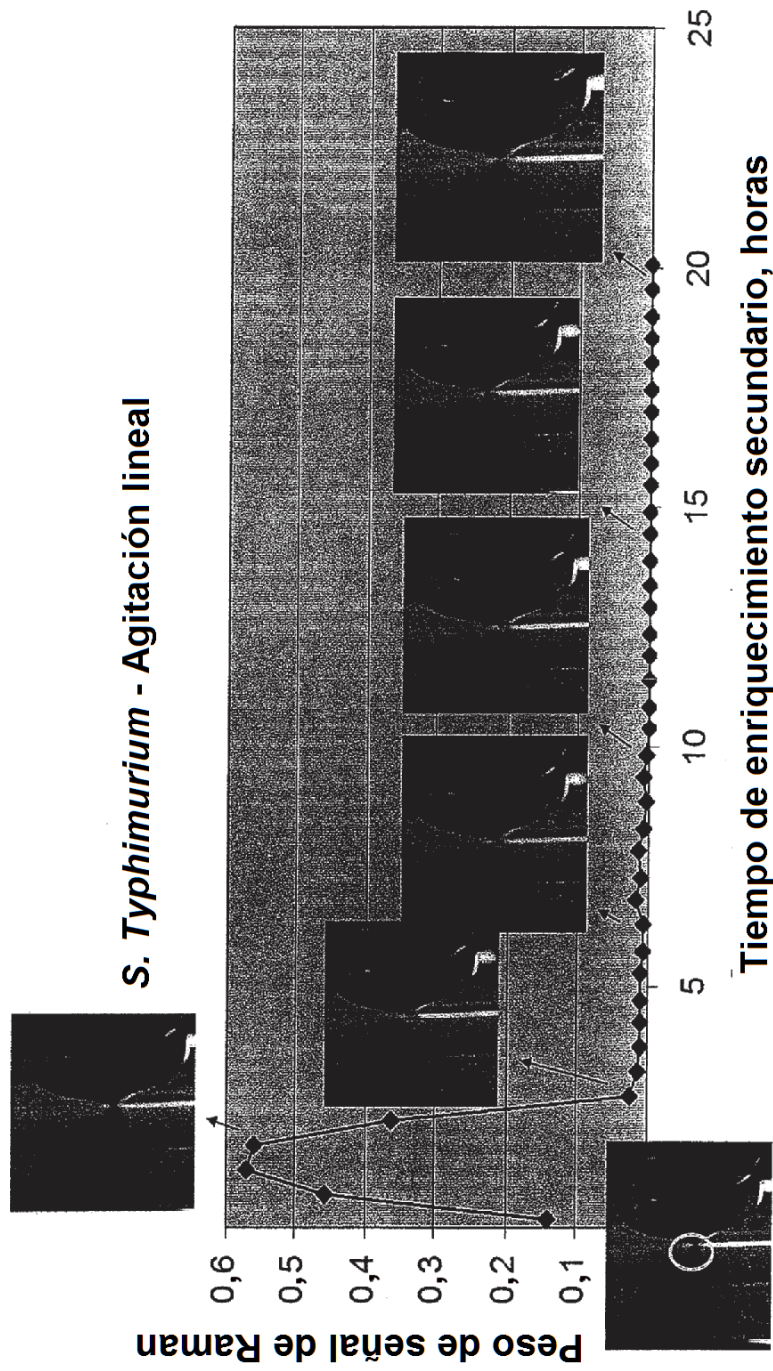


Figura 65A

Muestra negativa - sin patógeno

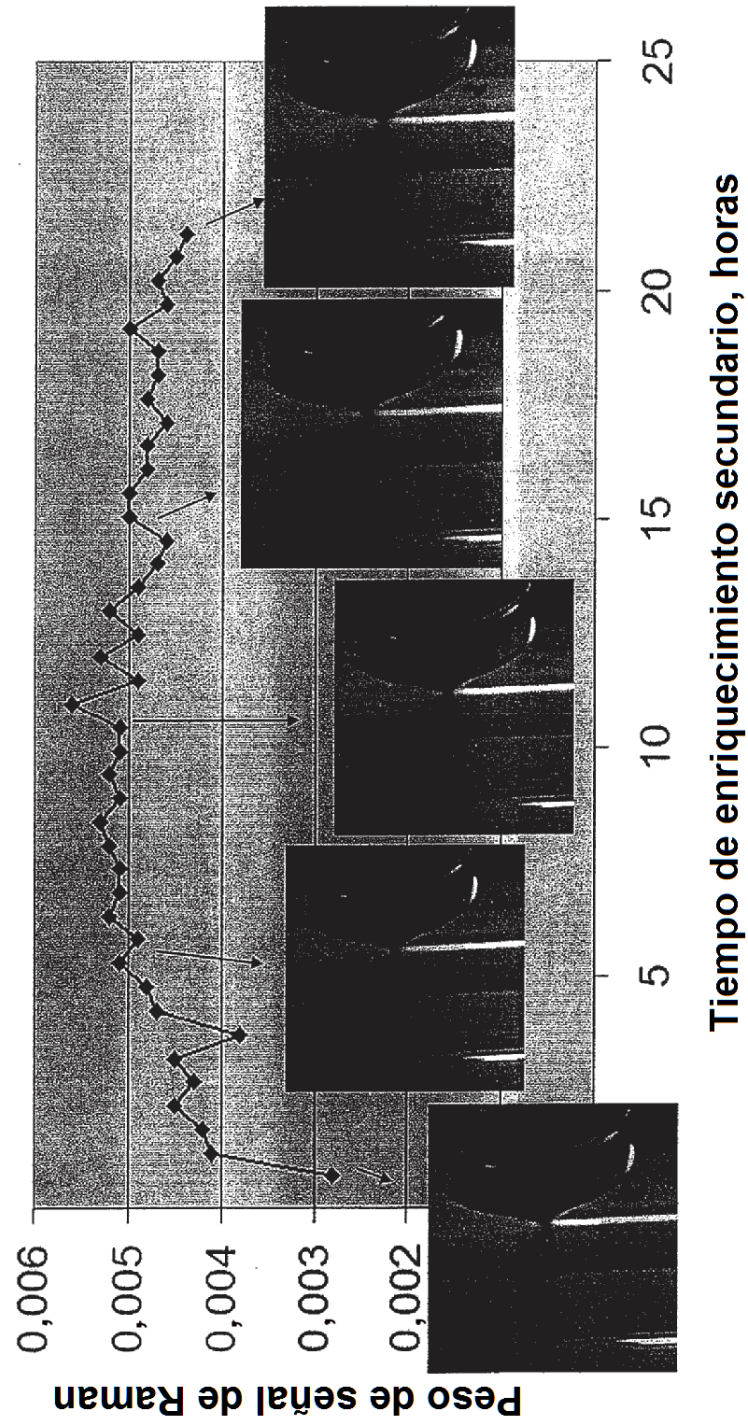
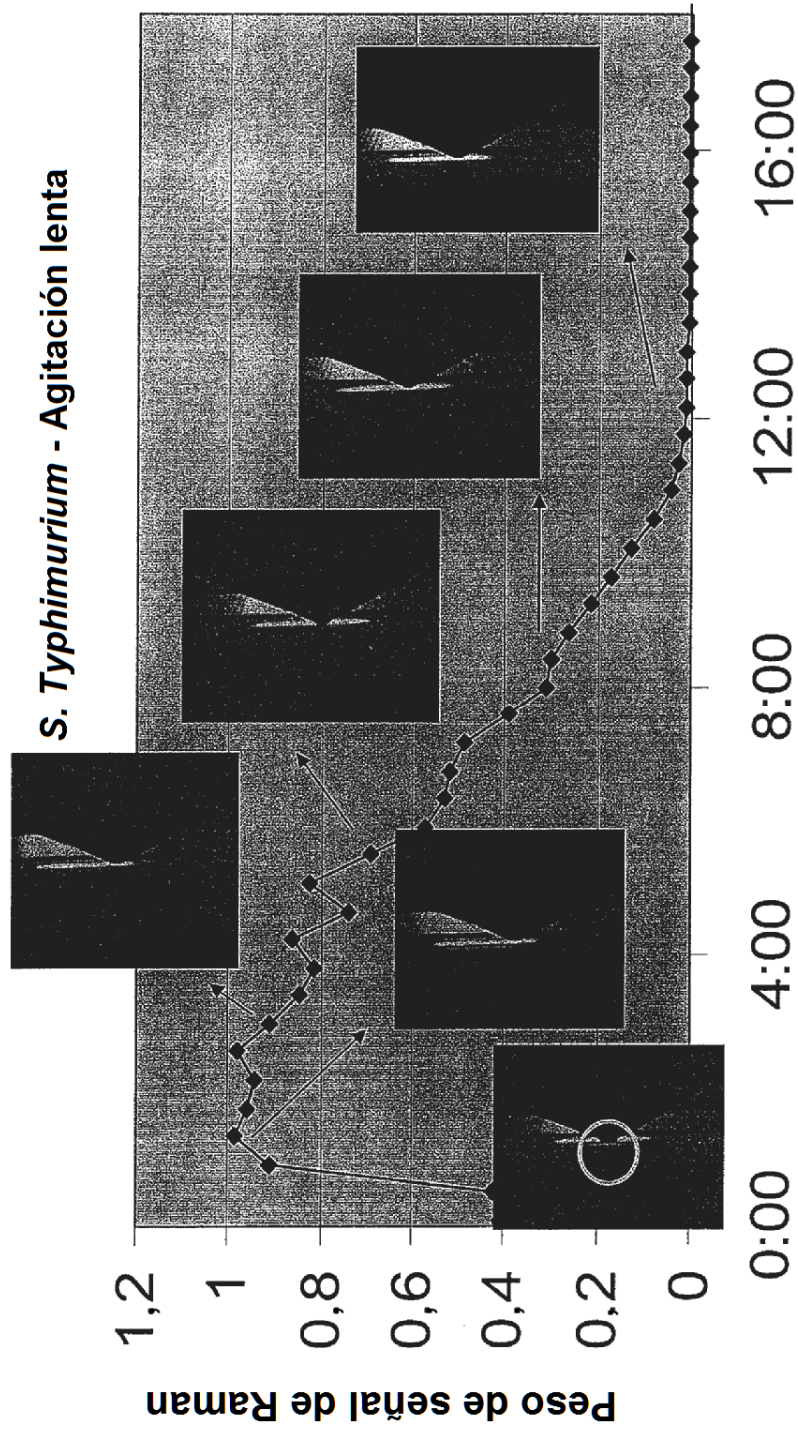


Figura 65B



Tiempo de enriquecimiento secundario, horas

Figura 65C

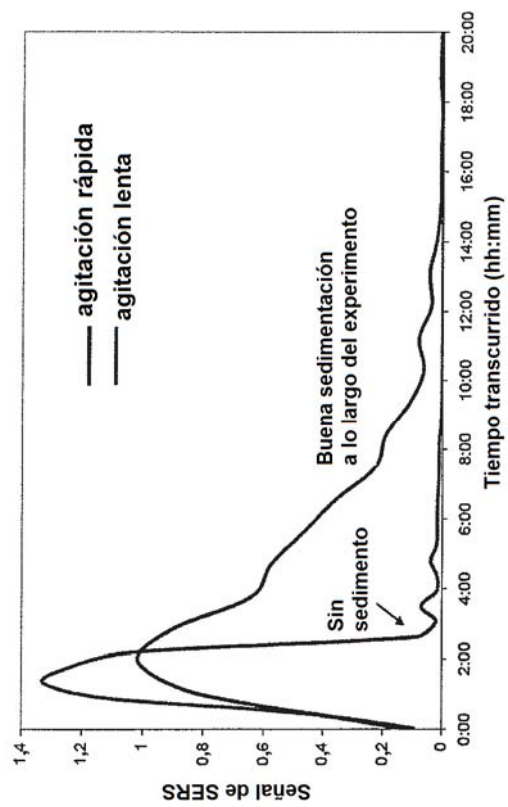


Figura 66

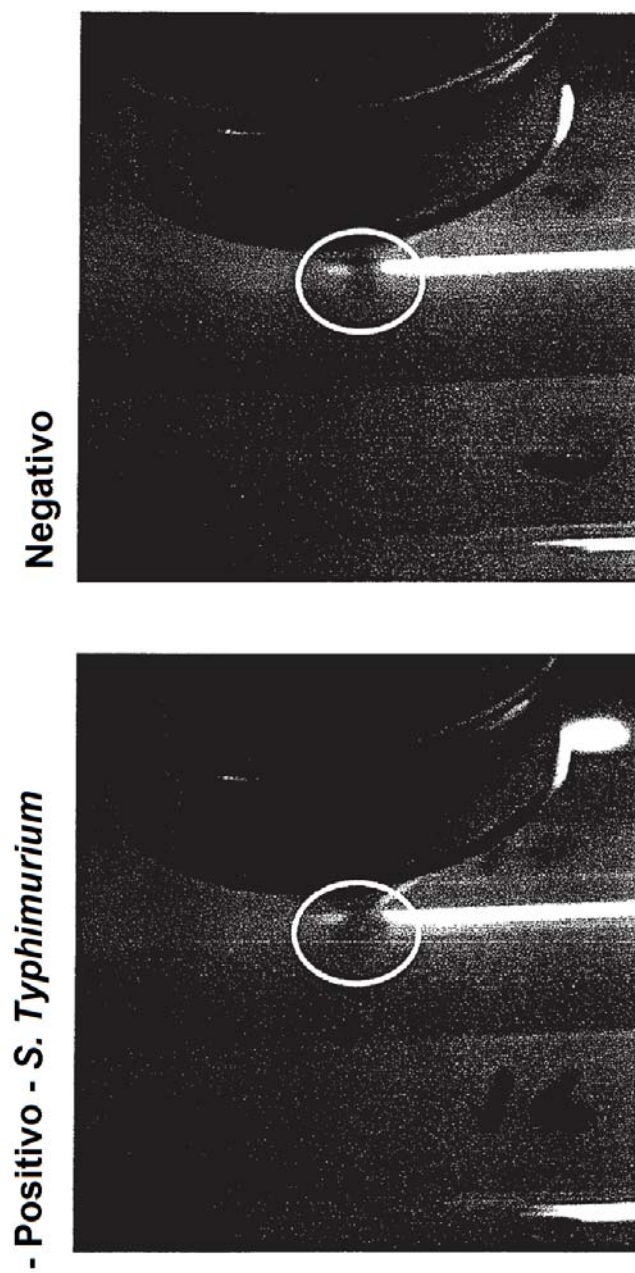


Figura 67

Detección en tiempo real de *E. coli* 0157:H7 durante el cultivo en muestras alimentarias

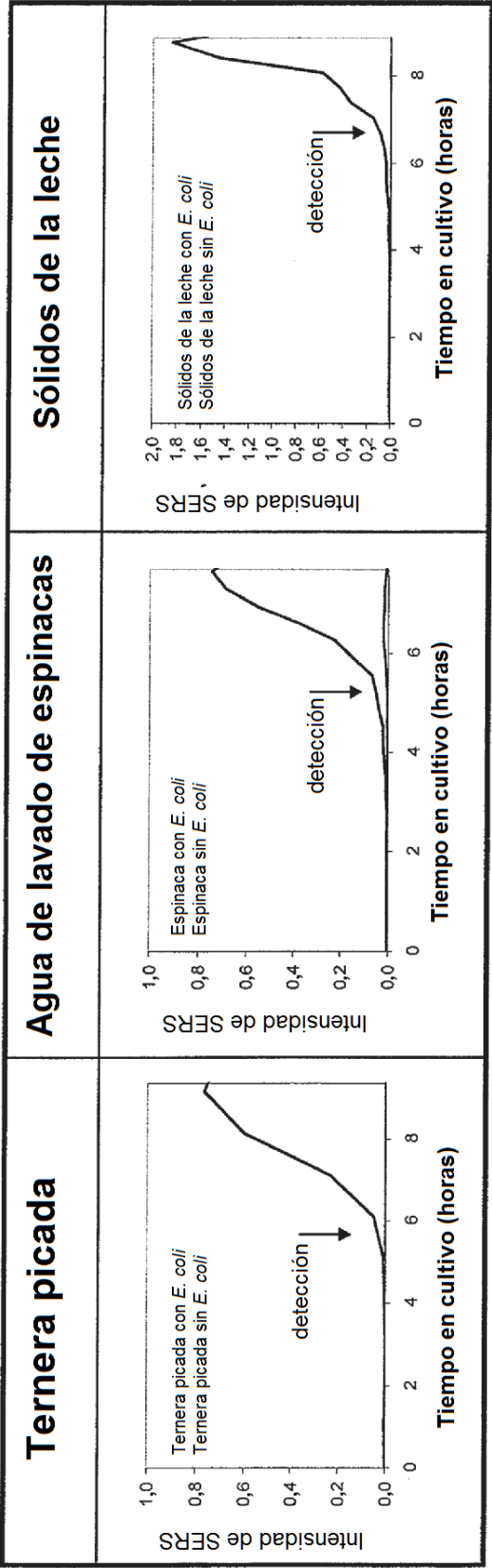


Figura 68A

Figura 68B

Figura 68C

S. Enteriditis sometida tensión térmica: 20 ufc/25 g de ternera picada

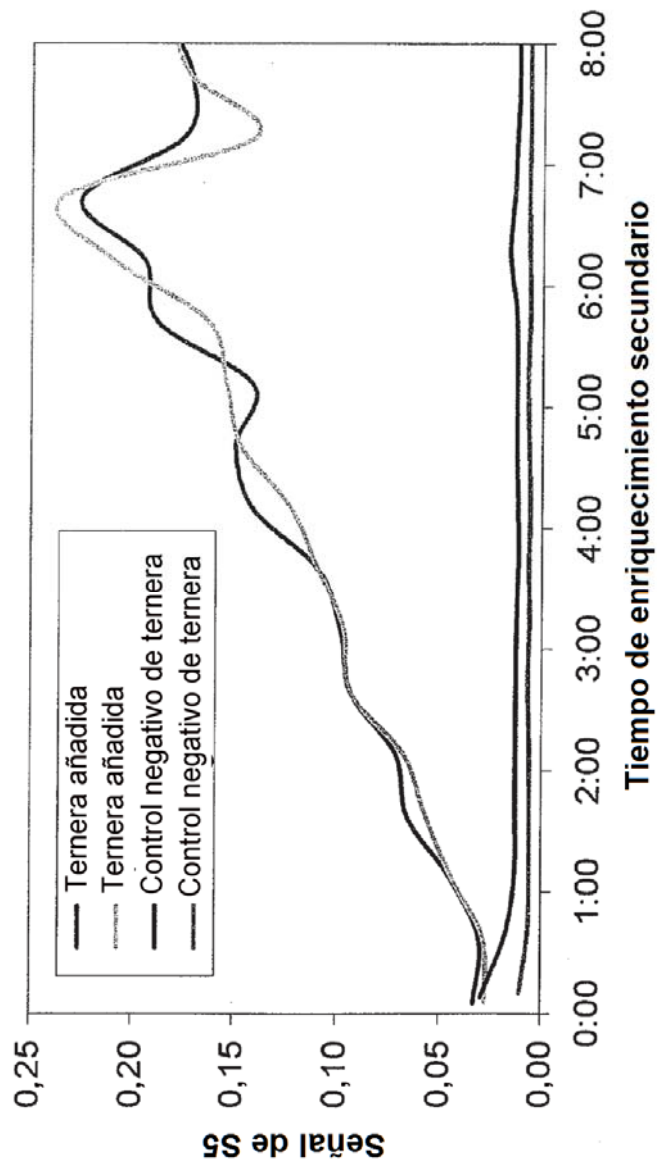


Figura 69

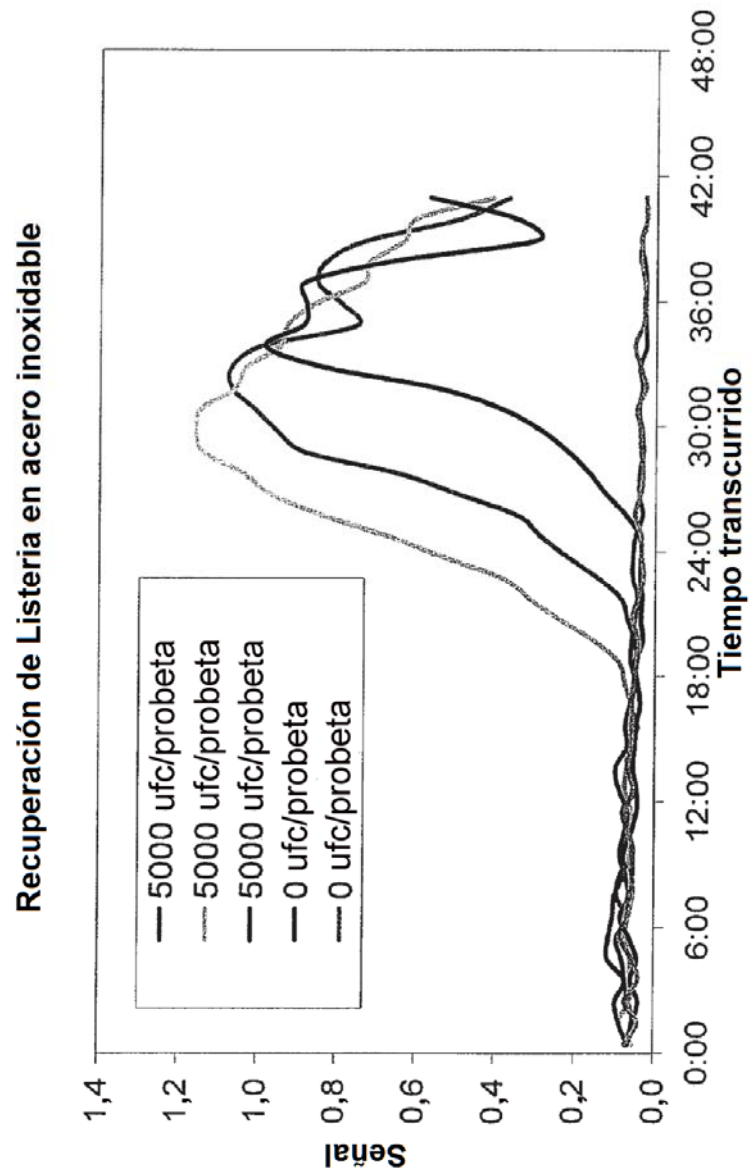


Figura 70

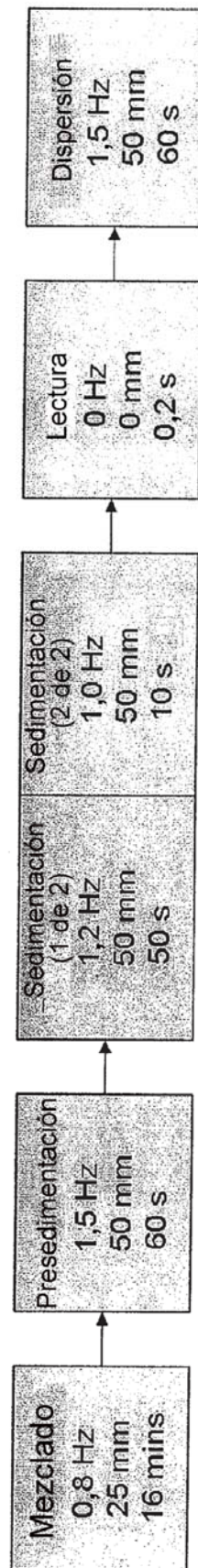


Figura 71

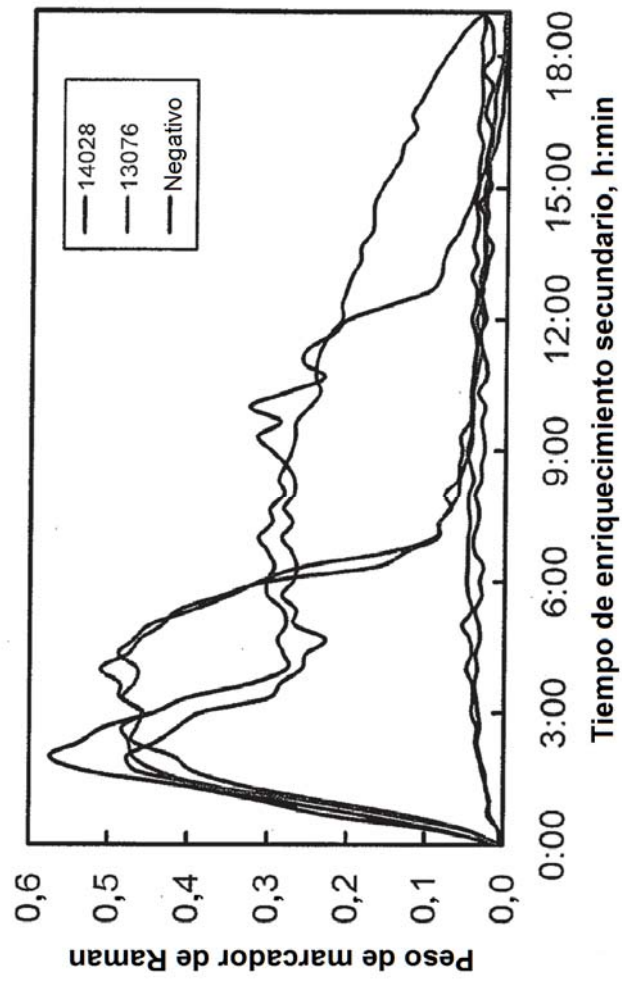


Figura 72

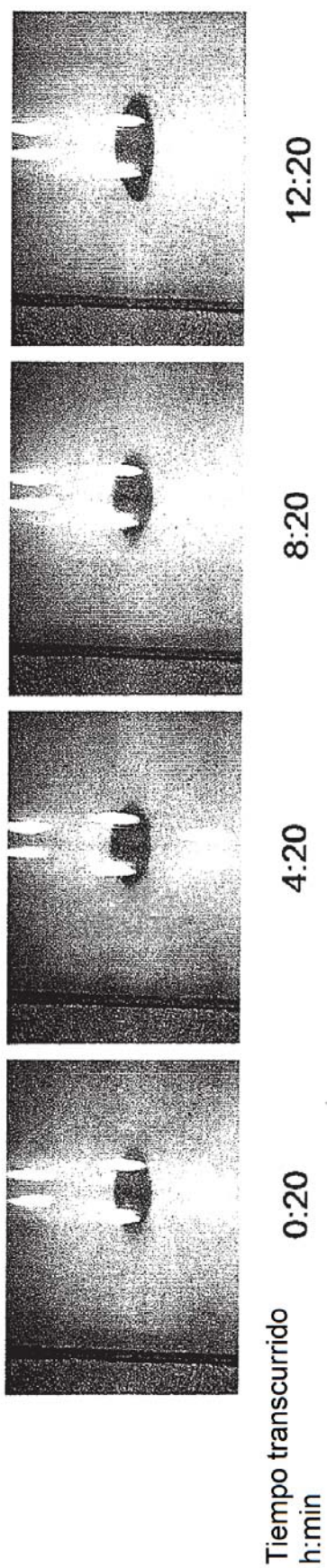


Figura 73

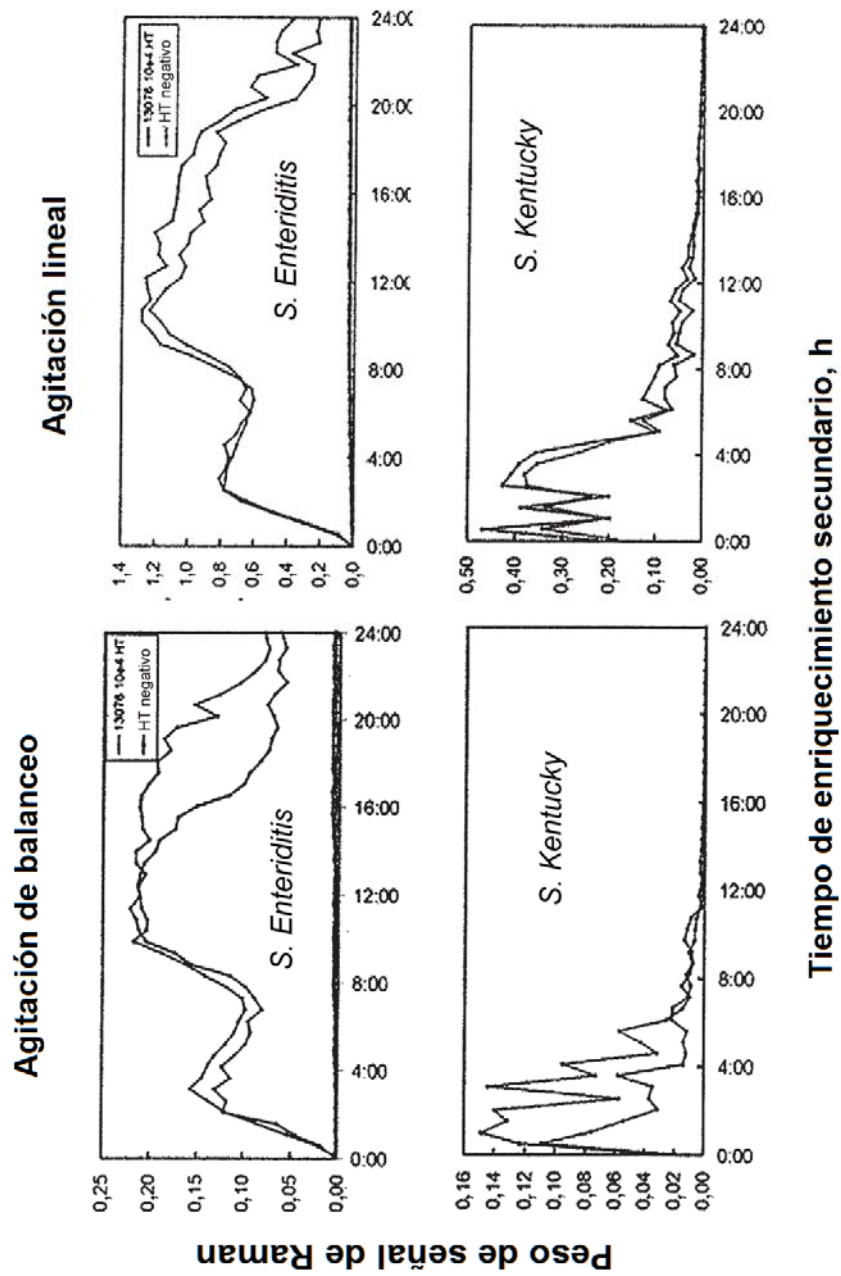


Figura 74

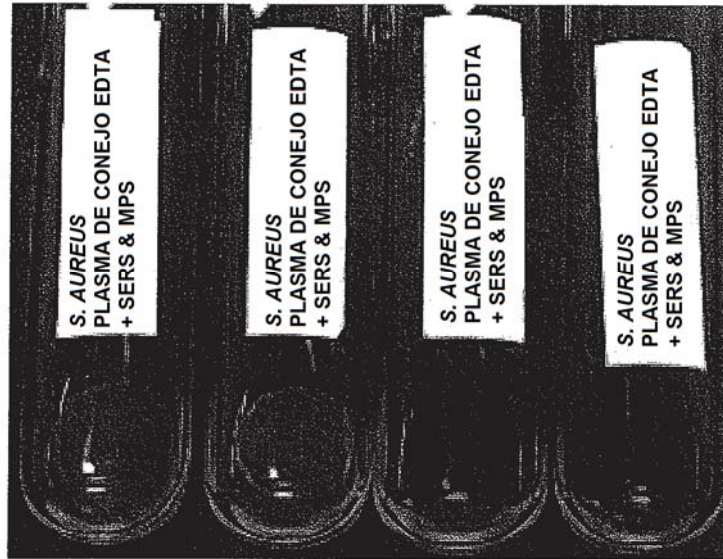


Figura 75

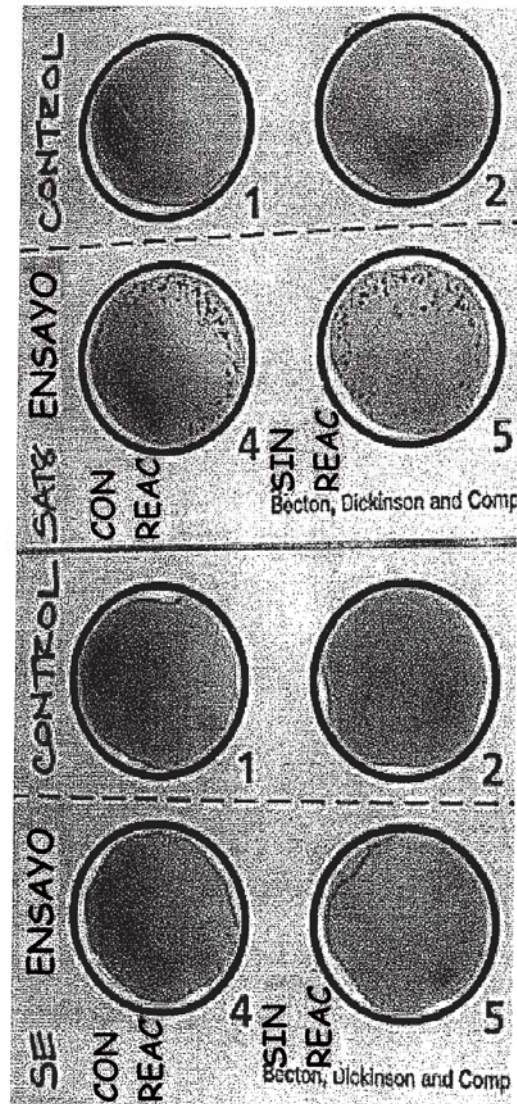


Figura 76

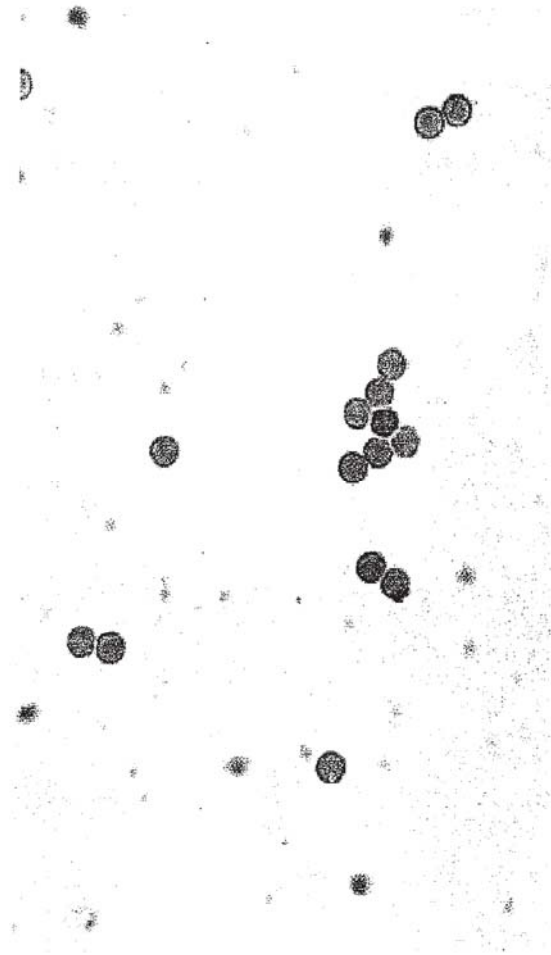


Figura 77

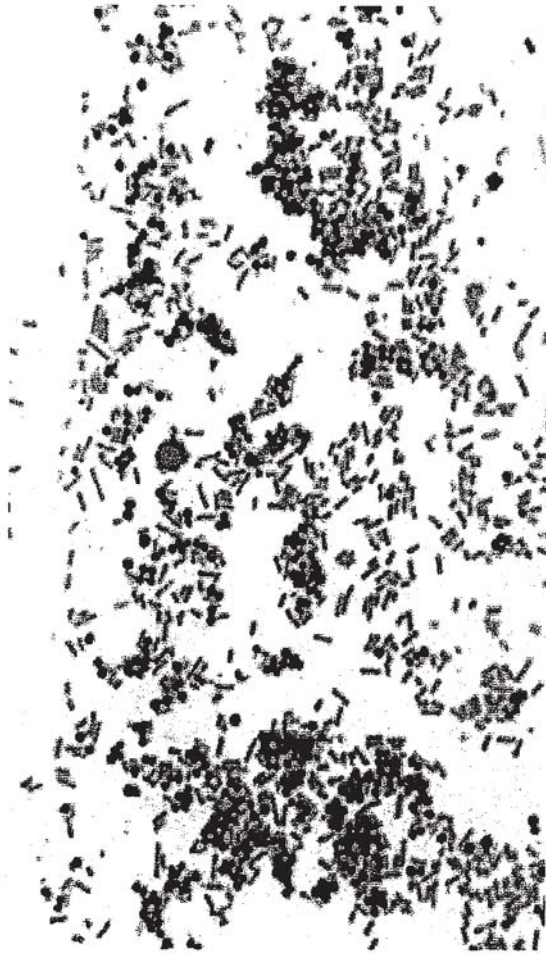


Figura 78

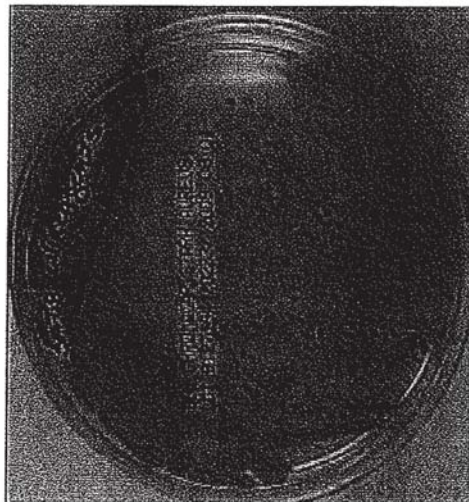


Figura 79

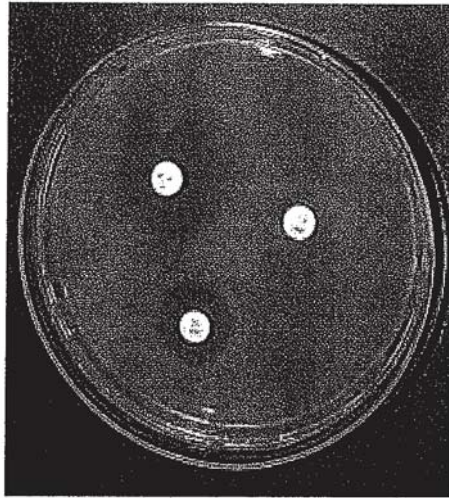


Figura 80

Antibiótico	Resistente/inhibidor/sensible				<i>E. coli</i>	
		R (mm)	I (mm)	S (mm)	Sin Reac	Con Reac
Vancomicina	R	-	-	-	6	6
Clindamicina	R	-	-	-	6	6
Oxacilina	R	-	-	-	6	6
Cefoxitina	S	≤14	15-17	≥18	25	26
Meropenemo	S	≤13	14-15	≥16	26	28
Ceftriaxona	S	≤13	14-20	≥21	28	29
Ampicilina	S	≤13	14-16	≥17	18	17
Eritromicina	R	-	-	-	10	10
Levofloxacina	S	≤13	14-16	≥17	28	28
Cefotaxima	S	≤14	15-22	≥23	28	28

Figura 81

Especie	ATCC N.º	Resultados coincidentes para +/- reactivos de SERS
<i>E. coli</i>	25922	✓
<i>E. coli</i>	35218	✓
<i>E. coli</i> O157	700728	✓
<i>K. pneumoniae</i>	700603	✓
<i>K. pneumoniae</i>	29011	✓
<i>S. epidermidis</i>	12228	✓
<i>S. epidermidis</i>	55133	✓
<i>S. aureus</i>	25923	✓
<i>S. aureus</i>	29213	✓
<i>C. albicans</i>	10231	✓

Figura 82

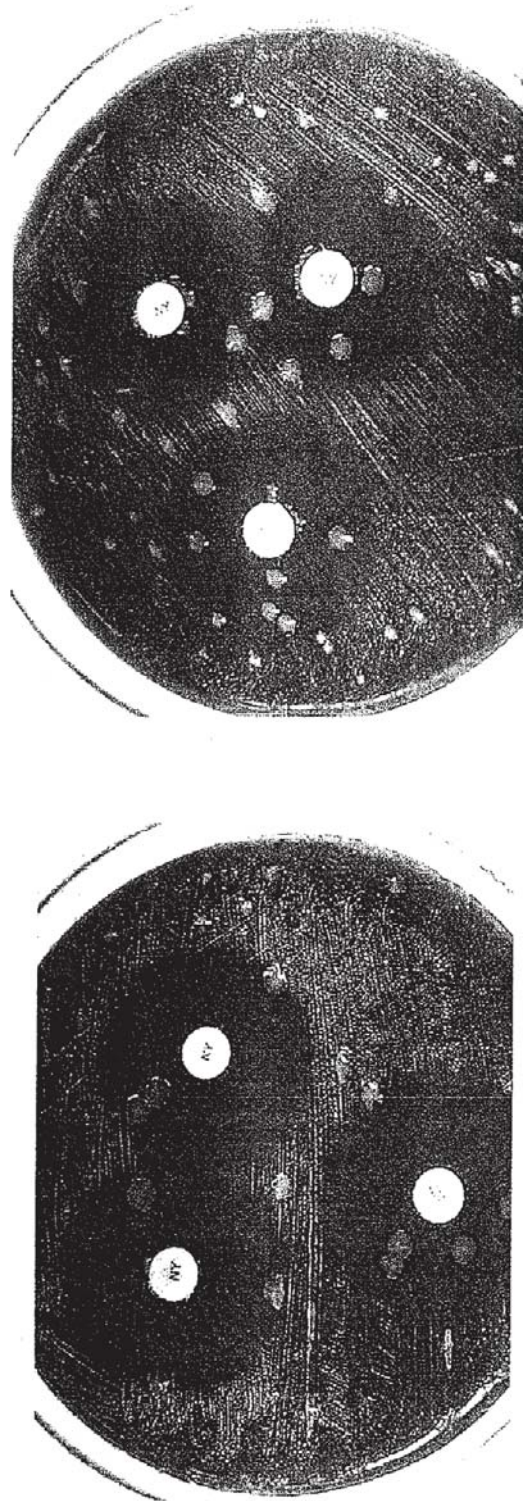


Figura 83

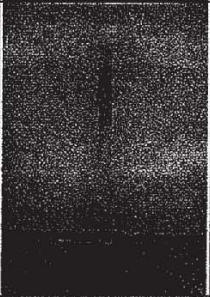
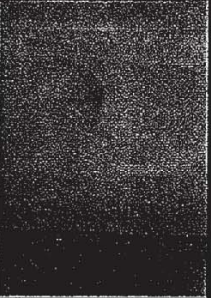
Tiempo de sedimentación Agitación	30 segundos	60 segundos	90 segundos
0,7 Hz			
1,0 Hz			
1,3 Hz			

Figura 84

Alcance (mm)	Frecuencia medida (Hz)	Tiempo hasta la dispersión (segundos)
25	1,4	70
25	2,0	50
25	2,5*	30
25	3,0*	28
25	3,4*	20
50	1,2	44
50	1,5*	28
50	2,0*	15

Figura 85

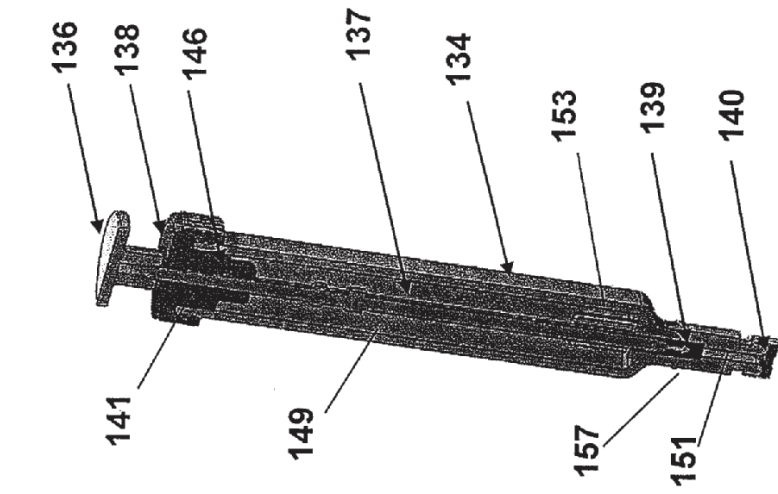


Figura 87

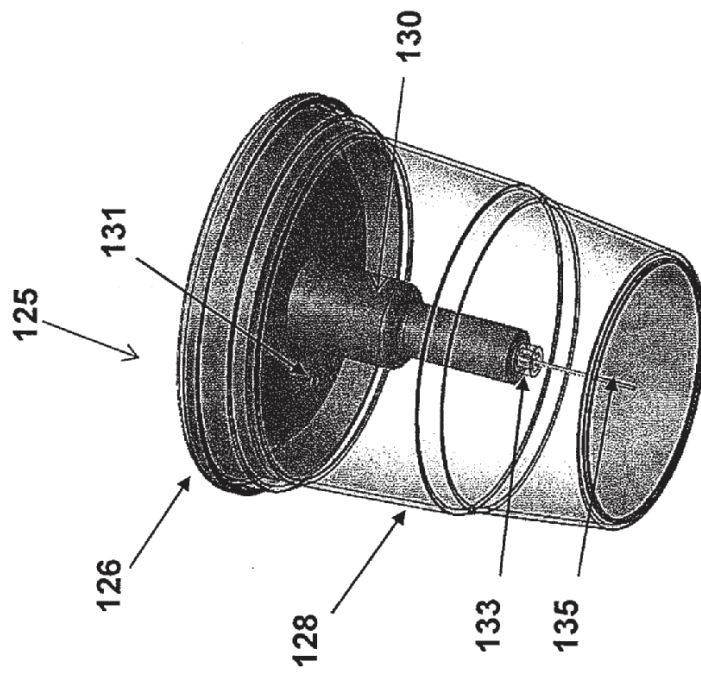


Figura 86

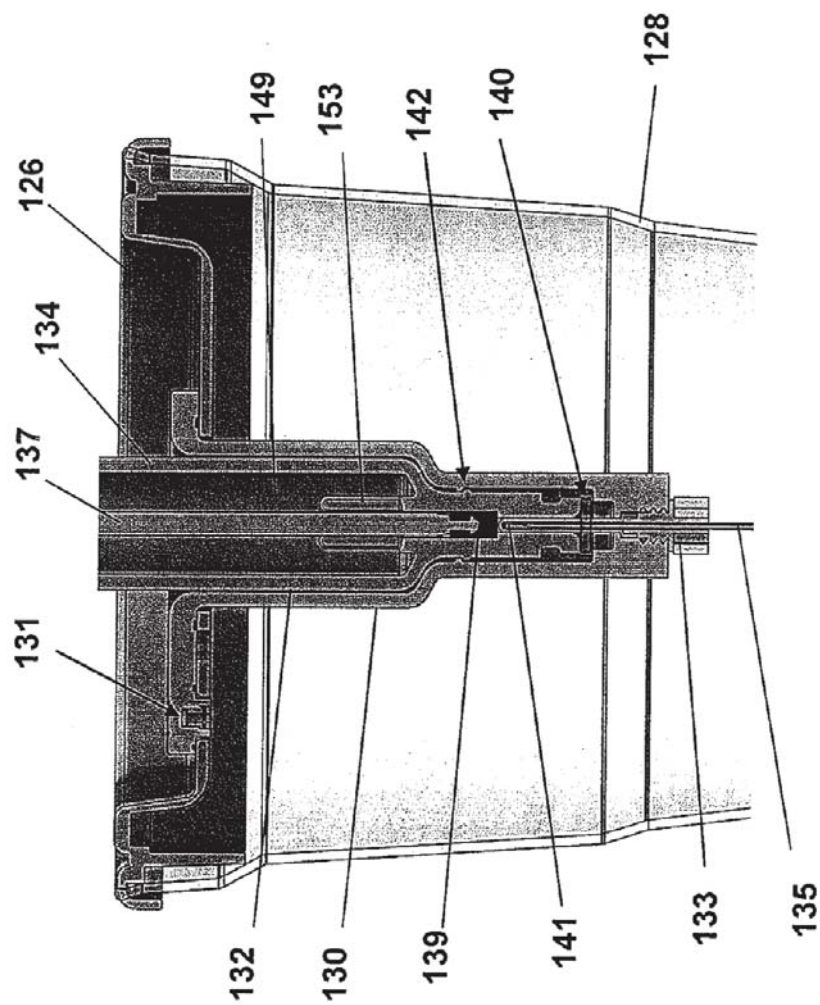


Figura 88

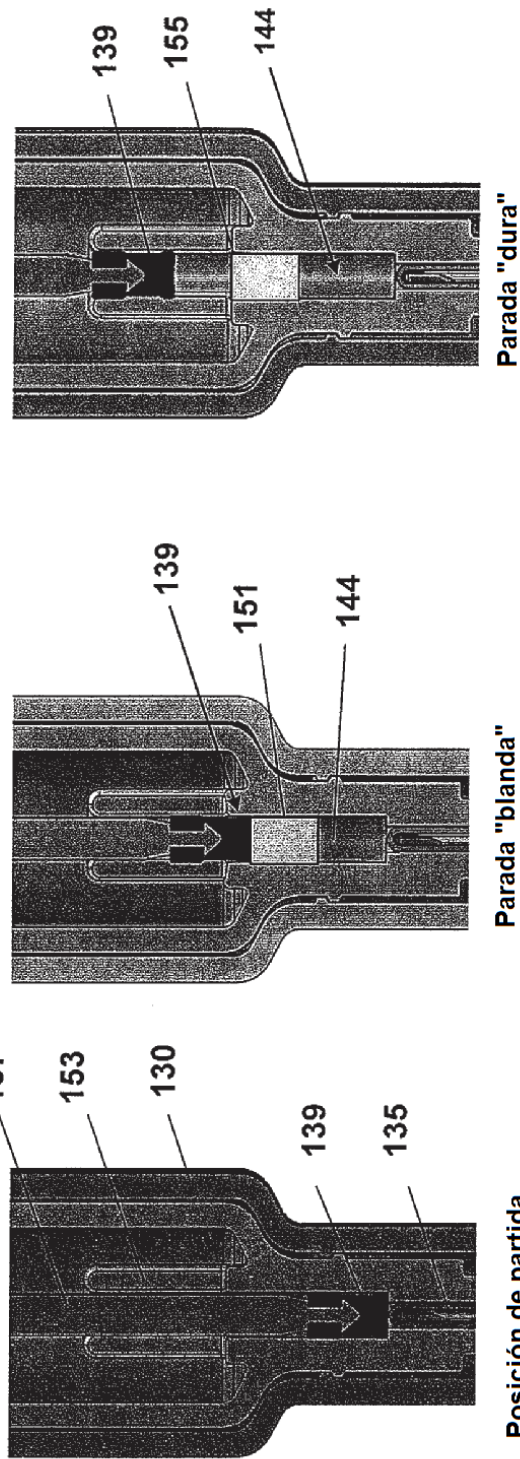
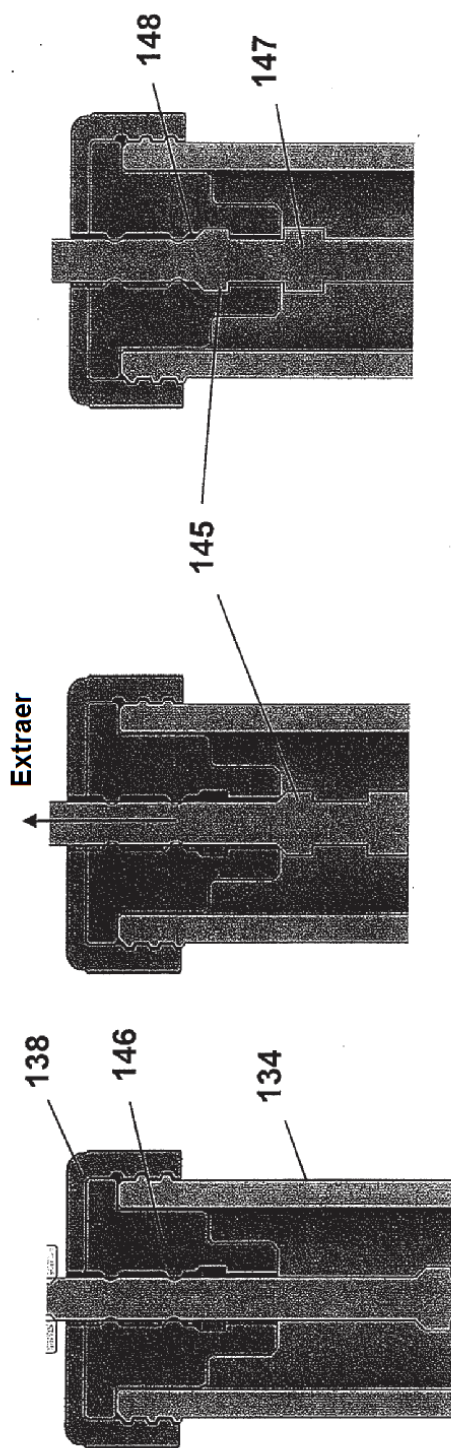


Figura 89A

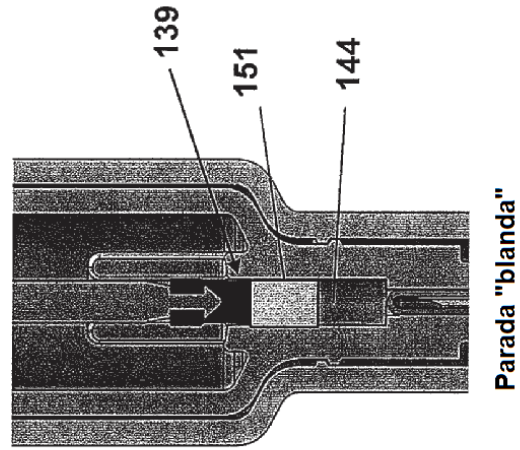


Figura 89B

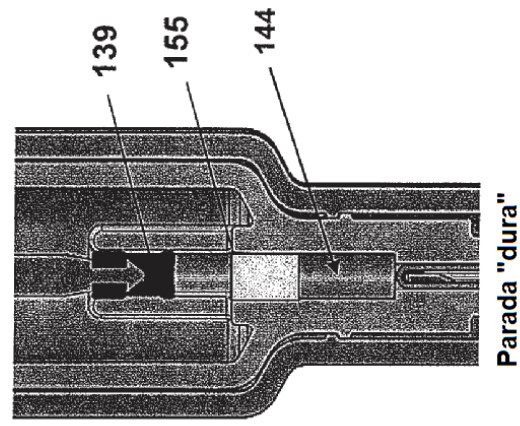


Figura 89C

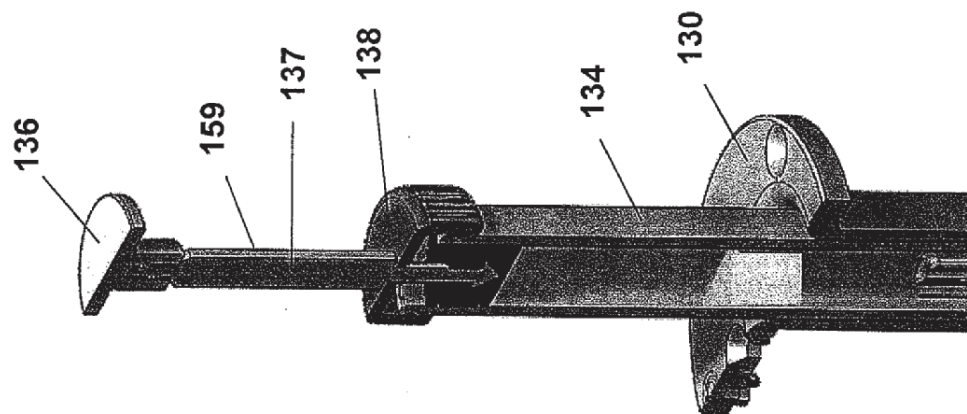


Figura 90B

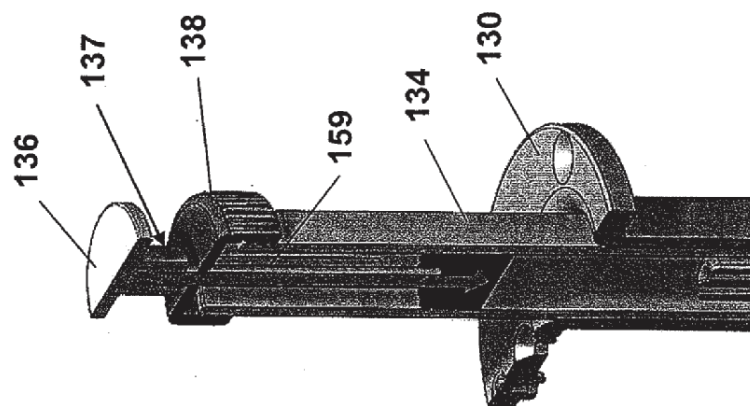


Figura 90A

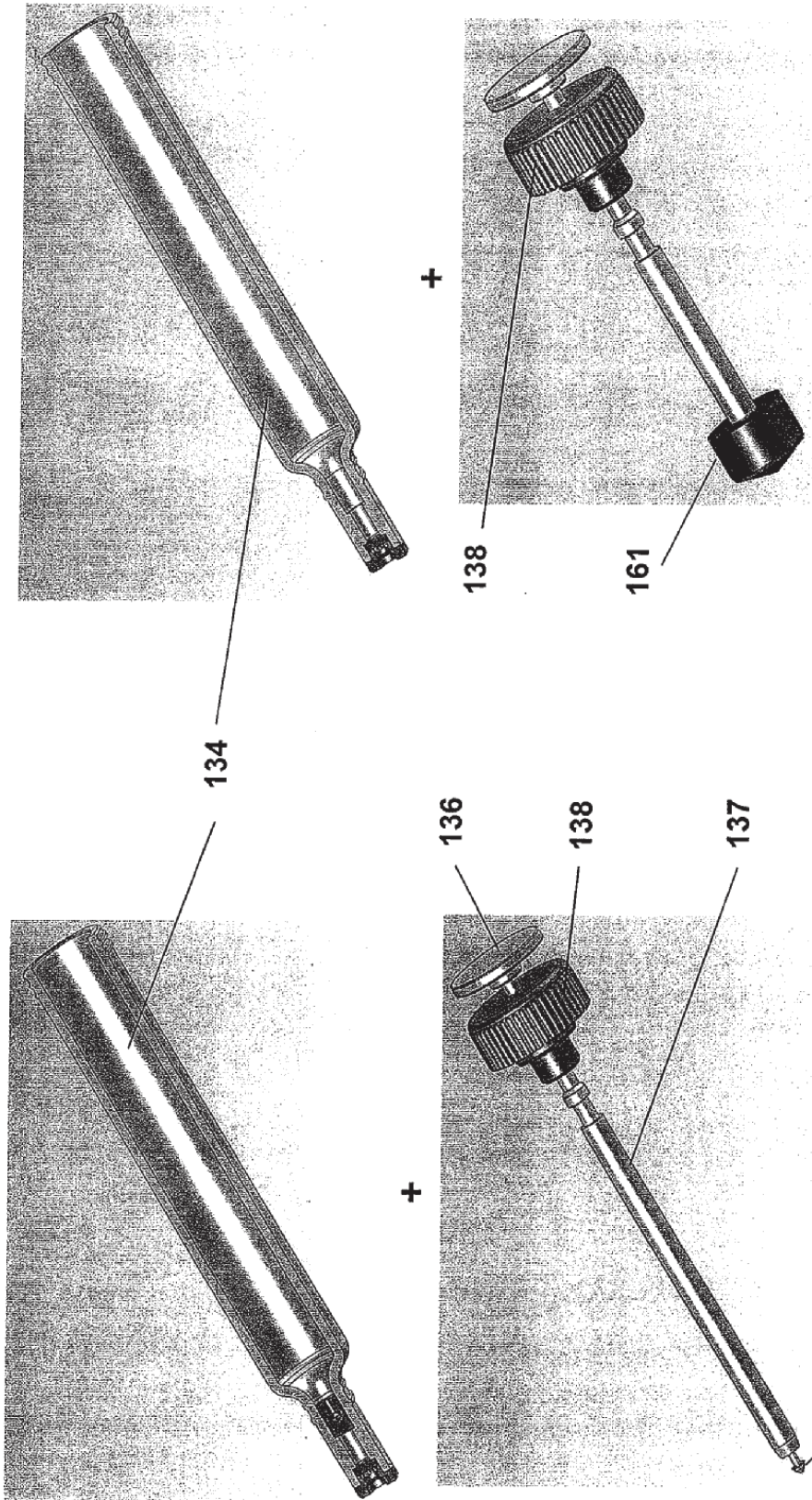


Figura 91

Figura 92

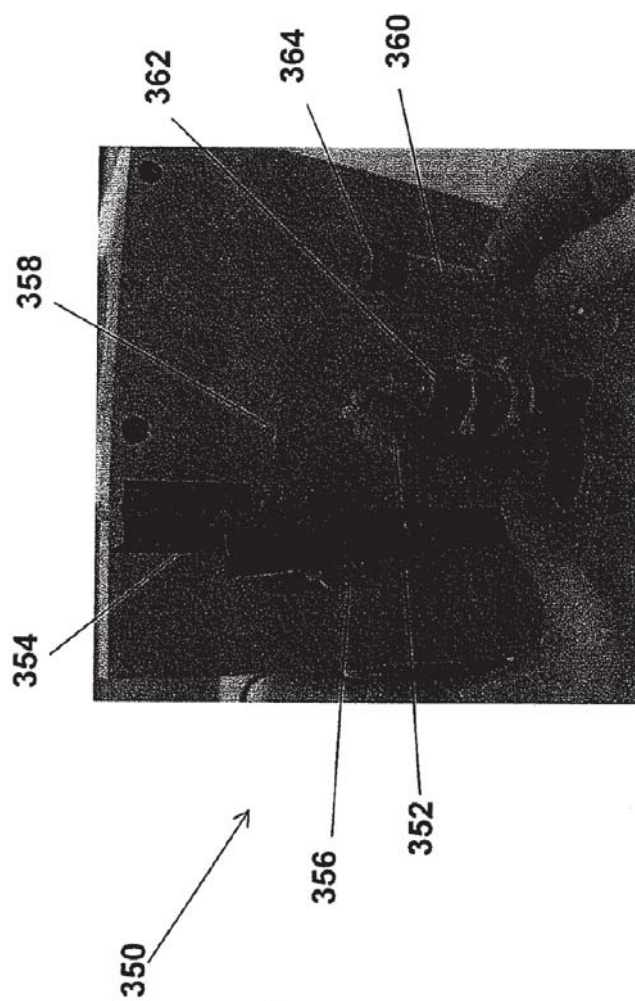


Figura 93

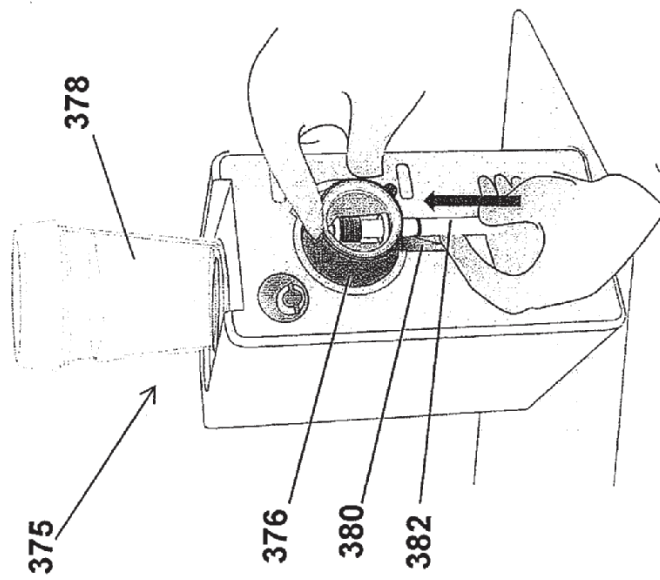


Figura 94

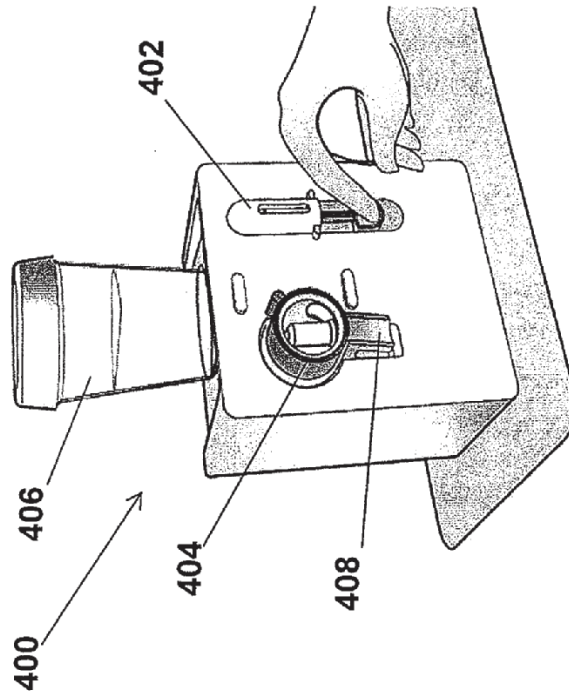


Figura 95

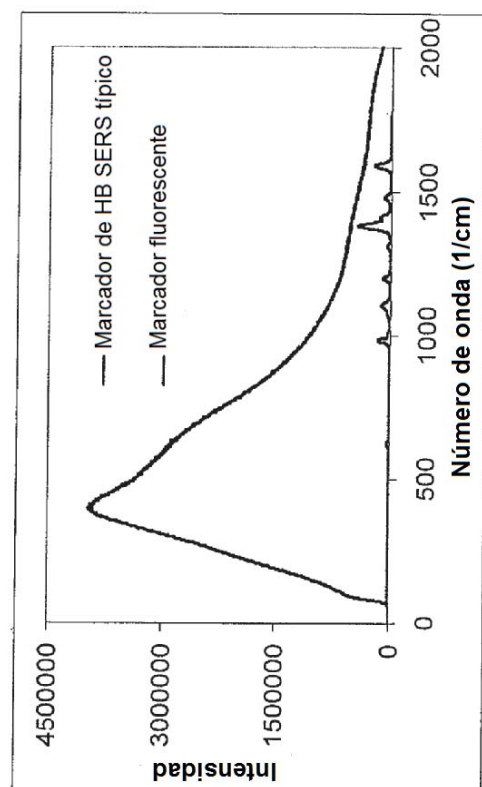


Figura 97

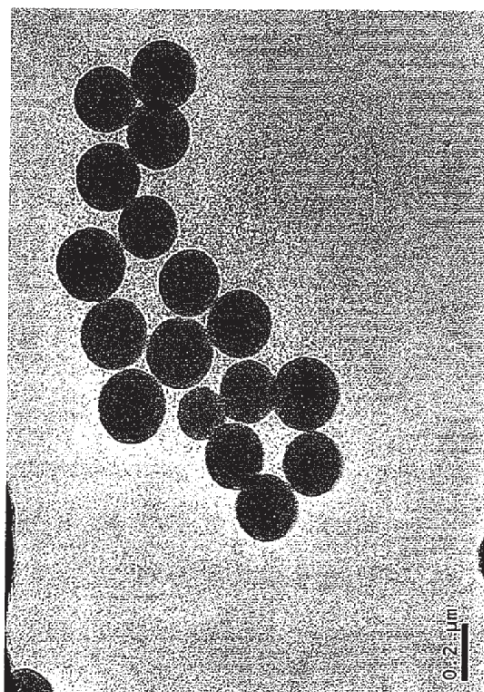


Figura 96

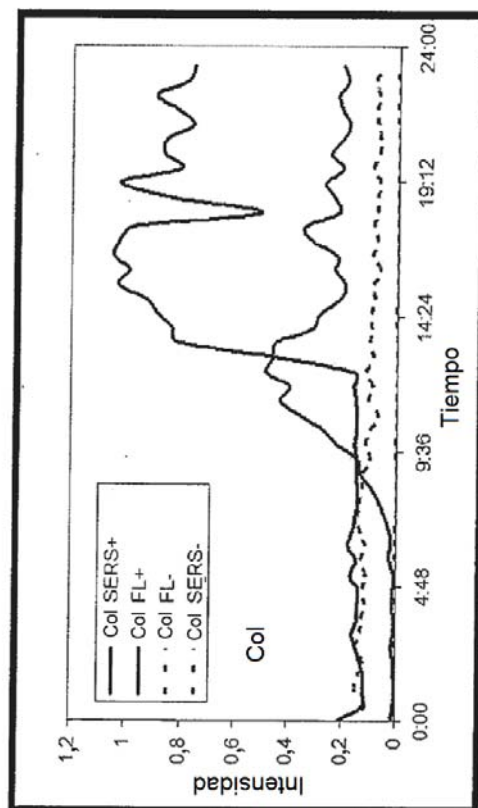


Figura 99

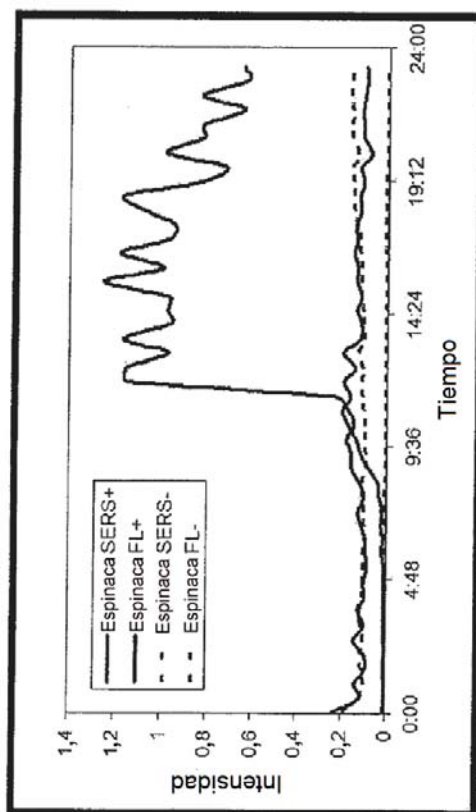


Figura 98

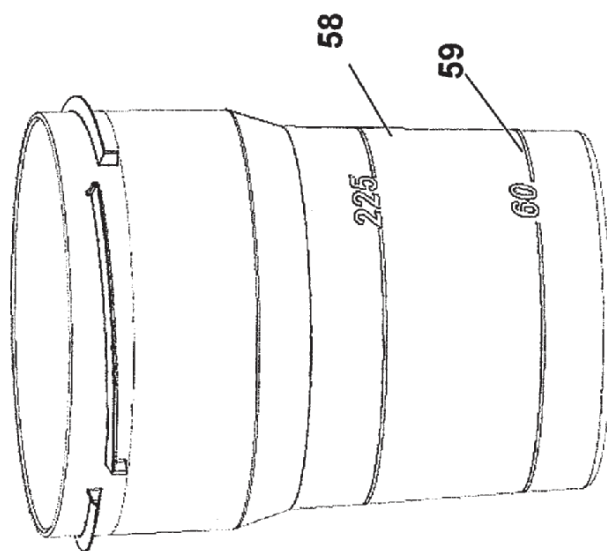


Figure 100

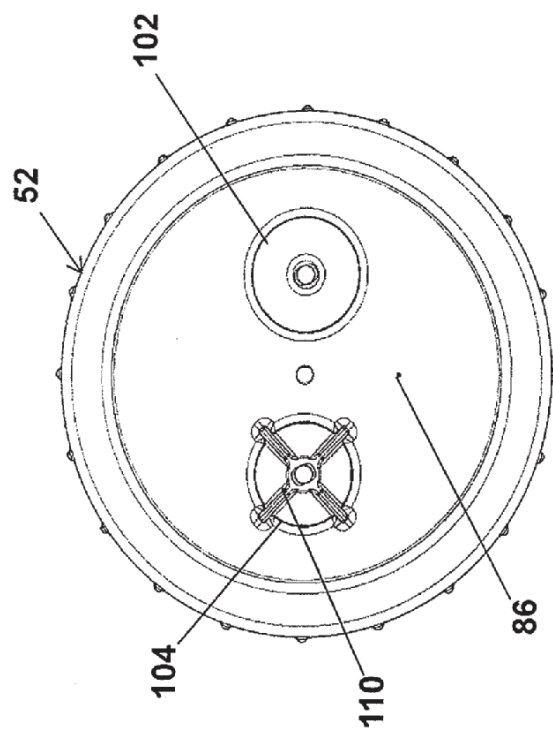


Figure 101

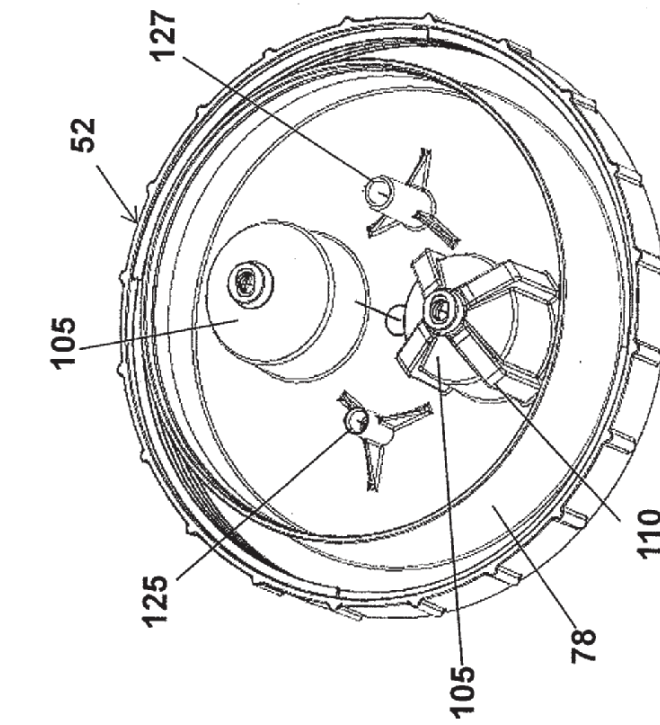


Figura 103

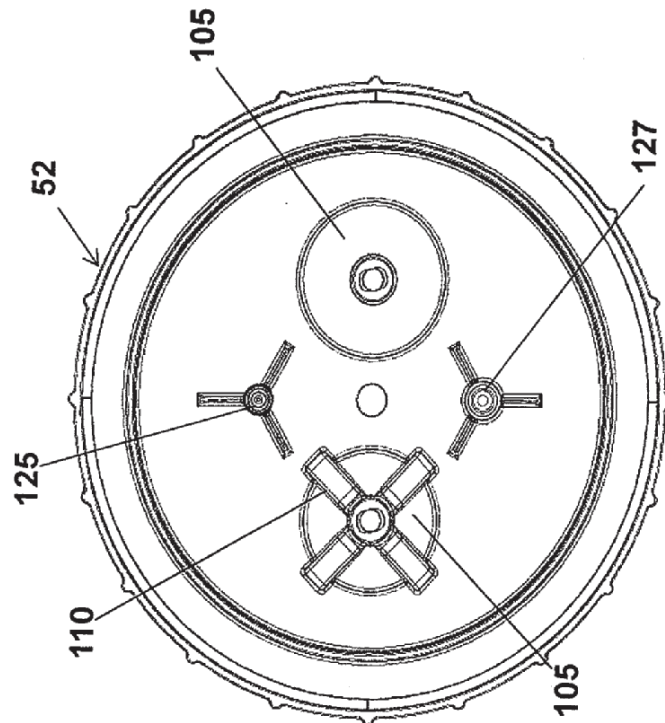


Figura 102

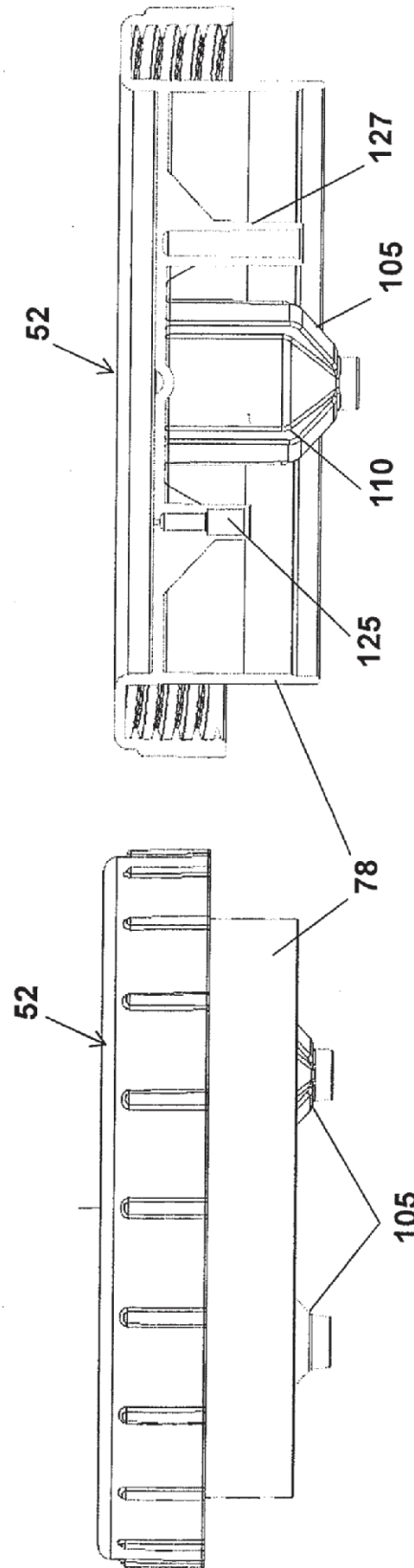


Figure 104

Figure 105

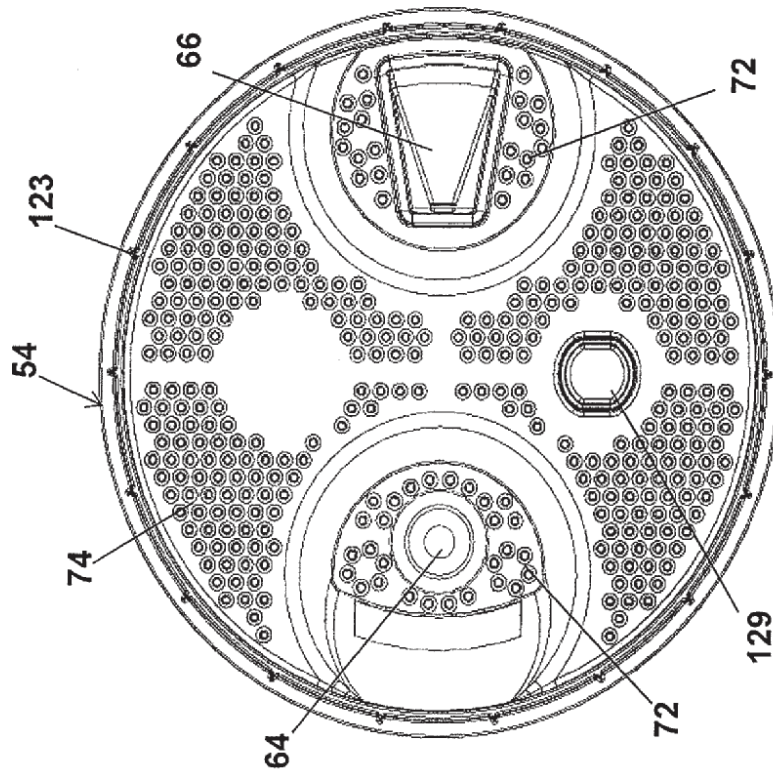


Figura 107

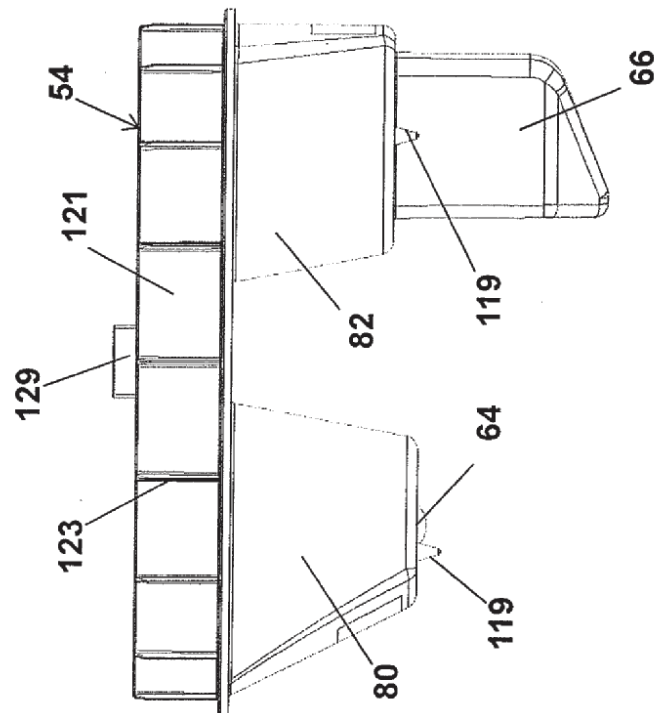


Figura 106

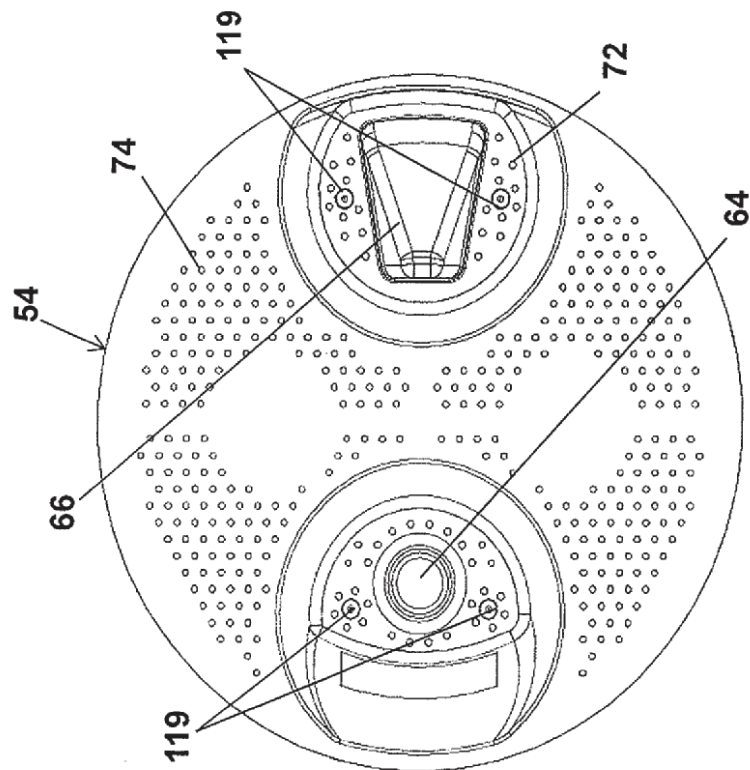


Figura 108

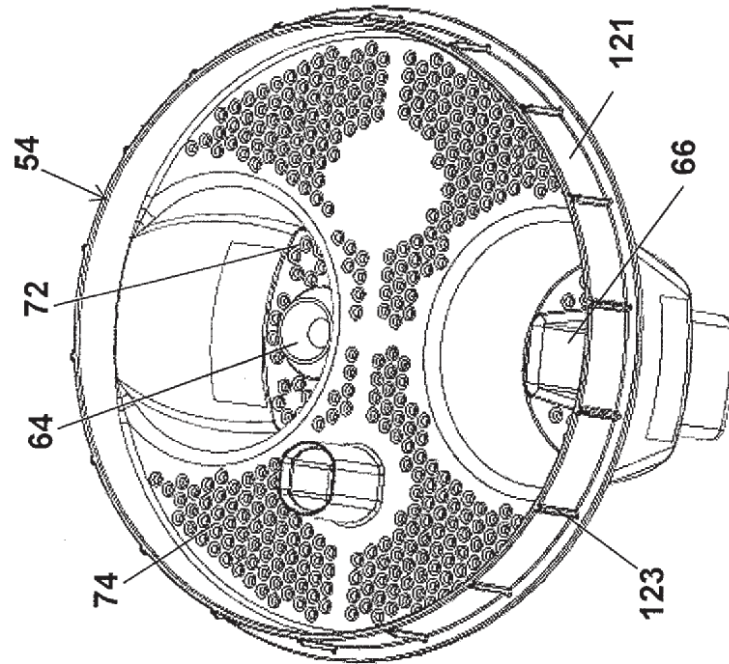


Figura 109