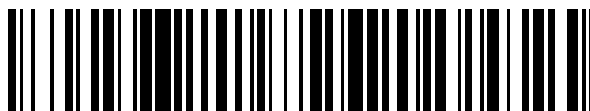


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 939 162**

51 Int. Cl.:

G01N 21/65 (2006.01)

B82Y 15/00 (2011.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2015** **PCT/EP2015/067717**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2017** **WO17020936**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2015** **E 15756116 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2023** **EP 3329258**

54 Título: **Un método de detección de la presencia o ausencia de analitos en fluidos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
19.04.2023

73 Titular/es:

MEDCOM ADVANCE, S.A. (20.0%)
Abda. Roma, 35 Ent 1
08029 Barcelona, ES;
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI (20.0%);
FUNDACIO PRIVADA CENTRE TECNOLOGIC DE
LA QUIMICA DE CATALUNYA (20.0%);
FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUCIÓ CATALANA DE
RECERCA I ESTUDIS AVANÇATS (20.0%) y
MEDCOM TECH, S.A. (20.0%)

72 Inventor/es:

PAZOS-PEREZ, NICOLAS;
PAZOS, ELENA;
CATALA, CARME;
MIR-SIMON, BERNAT;
GOMEZ-DE-PEDRO, SARA;
SAGALES, JUAN;
VILLANUEVA, CARLOS y
ALVAREZ-PUEBLA, RAMON A.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 939 162 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

Un método de detección de la presencia o ausencia de analitos en fluidos

5 Objeto de la invención

La presente invención se refiere a un método de detección de presencia o ausencia de analitos en fluidos usando la dispersión Raman potenciada en superficie (SERS) que incorpora importantes innovaciones y ventajas.

10 Más específicamente, la invención se refiere a un método en base al uso de la tecnología de dispersión SERS aplicada a la identificación y cuantificación plasmónica multiplexada directa en tiempo real de analitos en muestras fluidas a través de puntos críticos generados por brechas entre nanopartículas. Esta divulgación también describe un sistema para llevar a cabo el método.

15 El objeto de la invención también proporciona una forma relativamente rápida, fácil y cómoda de detectar y cuantificar cualquier tipo de analito en muestras de fluidos.

Antecedentes de la invención

20 La sepsis afecta a casi 20 millones de personas por año con una tasa de mortalidad del 30-40 % ^[1]. Estos pacientes requieren cuidados intensivos con altos costes asociados, que imponen importantes cargas sanitarias, económicas y sociales. En particular, cada paciente séptico en los Estados Unidos incurre en costes de aproximadamente \$ 25,000 durante la hospitalización, lo que totaliza una factura anual a nivel nacional superior a \$ 17 mil millones ^[1]. Se sabe que el tiempo transcurrido hasta el inicio de una terapia antimicrobiana eficaz es el predictor individual más fuerte del resultado, ya que cada hora de retraso en su administración aumenta en un 8 % el riesgo de muerte ^[2]. Además de los beneficios económicos obvios, el desarrollo de métodos de diagnóstico rápidos, precisos y económicos aparece, de este modo, como un objetivo principal para aliviar el dolor humano. El cultivo microbiano sigue siendo la técnica más extendida para identificar el agente infeccioso, pero lamentablemente requiere de 24-72 horas para proporcionar un diagnóstico concluyente de infecciones comunes. Comprensiblemente, se ha dedicado una gran cantidad de trabajo durante las últimas tres décadas al desarrollo de métodos alternativos para la identificación rápida de bacterias en pacientes sospechosos ^[3]. Estos métodos incluyen enfoques basados en la inmunología (por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), así como inmunoensayos de fluorescencia y radio) ^[4], identificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR)) ^[5] y procedimientos basados en espectrometría (por ejemplo, espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF)) ^[6]. Aunque generalmente son más rápidas que el cultivo microbiano secuencial, estas técnicas aún requieren horas a días, dependiendo del patógeno. Adicionalmente, las pruebas inmunológicas y de ácido nucleico son costosas (alrededor de \$ 200 cada una) y monoplex (una prueba por microorganismo diana), mientras que MALDI-TOF aún depende del cultivo microbiano para aislar colonias puras. Como consecuencia, generalmente se recomienda un antibiótico de amplio espectro para cubrir todos los patógenos potenciales hasta obtener una identificación concluyente. Aparte de su coste inherente y efectos adversos para la salud, este uso indiscriminado de antibióticos induce resistencia bacteriana, un problema creciente de la farmacopea moderna ^[7]. Por lo tanto, la sociedad insta al desarrollo de nuevos sistemas de diagnóstico capaces de proporcionar una identificación rápida, precisa, económica y, si es posible, multiplexada de agentes infecciosos en fluidos corporales ^[8].

45 Los mismos problemas surgen con cualquier tipo de analito en lugar de microorganismos, ya que la identificación y cuantificación rápida y fácil de analitos en fluidos, por ejemplo, una muestra de sangre, es de suma importancia.

Los avances recientes en nanociencia, espectroscopia, magnetismo, plasmónica y microfluídica han generado grandes expectativas para el desarrollo de nuevos enfoques para la detección de bacterias ^[9-12]. Desafortunadamente, los métodos propuestos hasta ahora generalmente consumen mucho tiempo, solo son capaces de explorar pequeños volúmenes de muestra (-microlitros), funcionan exclusivamente para un patógeno seleccionado a priori ^[9], no son realmente múltiples ^[10] y requieren etiquetas externas ^[11], o confiar en etapas adicionales para registrar una señal apropiada para la identificación ^[12].

55 El artículo: DUNCAN GRAHAM ET AL: "Control of enhanced Raman scattering using a DNA-based assembly process of dye-coded nanoparticles", NATURE NANOTECHNOLOGY, vol. 3, no. 9, 11 Julio de 2008 (2008-07-11), páginas 548-551, divulga un método de detección de un ácido nucleico específico en base a nanopartículas de plata que llevan una etiqueta Raman y funcionalizado con ADN. La hibridación con el analito diana provoca la agregación de las nanopartículas, situando la etiqueta Raman en los intersticios entre estas, donde la potenciación de la señal Raman es máxima. La detección de señal Raman potenciada indica la presencia del ácido nucleico.

60 Por lo tanto, todavía existe la necesidad de métodos y sistemas mejorados para la identificación y cuantificación de analitos en fluidos que reduzcan la complejidad, el tiempo y permitan trabajar con una muestra de volumen relativamente grande.

65

Descripción de la invención

La presente invención ha sido desarrollada con el propósito de proporcionar un método de detección de presencia o ausencia de analitos en fluidos y un sistema de detección óptica para llevar a cabo tal método que solucione las desventajas mencionadas anteriormente, además de aportar otras ventajas adicionales que se desprenderán de la descripción que se da a continuación.

En el presente documento, el término "analito" se entenderá como cualquier entidad biológica que se va a detectar y en el sentido más amplio este término se refiere a cualquier sustancia con la capacidad para unirse a un ligando de las nanopartículas codificadas y/o biofuncionalizadas. A modo de ilustración no limitativa, el término "analito" incluye células eucariotas y procariotas, incluidas células tumorales circulantes, microorganismos patógenos y no patógenos (es decir, hongos, protozoos, algas, rotíferos, bacterias y arqueas), virus, ácidos nucleicos, ácidos nucleicos de péptidos, antígenos, péptidos y proteínas, o la combinación de los mismos.

En el sentido usado en este documento, el término "microorganismo" incluye organismos muy pequeños o microscópicos que pueden ser unicelulares individuales, unicelulares agrupados (es decir, unidades formadoras de colonias, CFU) u organismos multicelulares. El concepto de "microorganismo" carece de implicaciones taxonómicas o filogenéticas ya que abarca organismos unicelulares no relacionados entre sí.

El término "fluido" se entenderá en la presente memoria descriptiva como cualquier tipo de sustancia que sea capaz de fluir, ya sea en forma líquida o gaseosa.

La invención se define por el método de la reivindicación 1.

Un método de detección de presencia o ausencia de analitos en fluidos comprende las etapas de:

a) poner en contacto una muestra de fluido y una pluralidad de nanopartículas, en el que cada una de las nanopartículas comprende un núcleo desprotegido y etiquetado con al menos una especie molecular con un espectro SERS definido, estando las nanopartículas funcionalizadas con al menos un ligando selectivo para un receptor dado de un analito diana, siendo el contacto de la muestra de fluido con las nanopartículas en condiciones de manera que, cuando la muestra de fluido comprende al menos un analito, las nanopartículas se agregan selectivamente en la superficie de su analito diana, formando un complejo nanopartícula-analito, la agregación promueve la concentración de las nanopartículas en la superficie del analito diana y, de este modo, un acoplamiento de plasmones entre las nanopartículas a través de la generación de brechas estrechas entre nanopartículas;

b) someter una mezcla de fluido de la muestra de fluido y la pluralidad de nanopartículas a SERS;

c) medir al menos una señal SERS asociada con la mezcla de fluido;

d) analizar espectralmente la al menos una señal SERS de la etapa c);

e) reconocer al menos un espectro SERS definido del complejo nanopartícula-analito,

a través de una señal SERS potenciada por al menos una brecha estrecha entre nanopartículas, cuando la mezcla de fluido comprende al menos un complejo nanopartícula-analito con la brecha estrecha entre nanopartículas

Cabe señalar que el método objeto de la presente invención no se practica en el cuerpo humano o animal y cualquier muestra de fluido tomada del cuerpo no se devuelve al cuerpo vivo.

Debido a estas características, se logra un método de detección de la presencia o ausencia de analitos en fluidos que proporciona una identificación rápida y exhaustiva de analitos mediante el cribado de grandes volúmenes de muestra de fluido (por ejemplo, mililitros de fluido) para contenido de analito. La aplicación en el campo de la medicina puede proporcionar la identificación y cuantificación de microorganismos mediante el cribado de mililitros de sangre para el contenido de microorganismos, como lo requiere la práctica médica estándar para el análisis de muestras biológicas [13]. Se logra la detección y cuantificación del analito sin etiquetas en tiempo real y de forma multiplexada.

El uso de nanopartículas etiquetadas con códigos Raman, funcionalizadas y desprotegidas promueve la generación de puntos críticos ópticos cuando estas nanopartículas se agregan sobre el analito y forman brechas estrechas entre nanopartículas. La presencia de uno de los analitos diana desencadena una acumulación de sus nanopartículas asociadas en la superficie del analito, alcanzando rápidamente una cobertura aleatoria total [14]. Luego se producen múltiples brechas estrechas entre las nanopartículas, que actúan como puntos críticos en los que la dispersión Raman se potencia en varios órdenes de magnitud en relación con las nanopartículas que no interactúan.

Adicionalmente, la acumulación de nanopartículas sobre el analito produce un aumento de la señal SERS en relación con las nanopartículas menos abundantes en el resto del fluido. De este modo, el mecanismo de identificación es doble: primero por la acumulación de nanopartículas en el analito, lo que da como resultado un aumento de la señal

SERS, y segundo por la formación de brechas estrechas entre partículas. El primero produce un aumento relativamente moderado en la señal de SERS, mientras que el último da como resultado un aumento de órdenes de magnitud y, de este modo, facilita en gran medida la detección del analito a través de este aumento en la señal de SERS.

La muestra de fluido que se va a analizar puede contener ninguno, uno o más analitos diferentes (para los cuales las nanopartículas se han funcionalizado selectivamente con el ligando o ligandos selectivos apropiados, con al menos un ligando selectivo para cada tipo de analitos diana). Cabe señalar que las nanopartículas no se funcionalizan más para promover el acoplamiento plasmónico tras la agregación en la superficie del analito.

El ligando selectivo puede ser un anticuerpo, una proteína, un aptámero (es decir, macromoléculas) o una molécula pequeña.

La expresión "nanopartícula desprotegida" ha de entenderse en la presente memoria descriptiva a una nanopartícula que comprende un núcleo fabricado en un material capaz de generar campos eléctricos o electromagnéticos elevados en la superficie de la partícula mediante la interacción de la misma con un haz de luz. En la invención, el núcleo carece de cualquier tipo de recubrimiento, como por ejemplo un recubrimiento que comprende dióxido de silicio (SiO₂) o polímero, que puede evitar los acoplamientos plasmónicos entre un par de nanopartículas o entre varias nanopartículas y/o aumentar la estabilidad coloidal de las nanopartículas.

La expresión brecha entre nanopartículas "estrecha" debe entenderse en la presente especificación como una brecha entre dos nanopartículas para nanopartículas, teniendo tal brecha una longitud entre dos nanopartículas inferior a unos pocos nanómetros (por ejemplo, 1 nm o 2 nm), o inferior a 30 nm).

A diferencia de la técnica anterior, se promueve una matriz de nanopartículas desprotegidas sobre el analito para lograr la interacción de los campos eléctricos ópticos inducidos por las nanopartículas entre sí cuando son golpeadas por el haz de luz.

En una forma preferida, el método comprende además hacer circular la mezcla de fluido de la muestra de fluido y la pluralidad de nanopartículas a través de al menos un pasaje y se permite que una luz monocromática incidente incida sobre la mezcla de fluido de la muestra de fluido y la pluralidad de nanopartículas en la etapa b). Se permite que la luz monocromática incidente incida en la mezcla de fluido que pasa a través de una sección de detección asociada con el pasaje.

El método puede comprender una etapa ventajosa después de la etapa e) descrito anteriormente que es el paso f) cuantificar el número de espectros SERS definidos reconocidos (evento positivo) y la intensidad de la señal SERS relacionada con cada espectro SERS definido reconocido en la mezcla de fluido. A diferencia de los métodos de la técnica anterior, el presente método puede cuantificar el analito en un volumen de muestra de fluido relativamente grande en tiempo real. Para proporcionar una cuantificación e identificación en tiempo real, en la etapa d) del presente método de detección de presencia o ausencia de analitos en fluidos se registra un espectro en lapsos de tiempo predefinidos.

Ventajosamente, el ligando selectivo mencionado anteriormente puede ser cualquier marcador de células cancerosas. Por ejemplo, pero no exclusivamente:

1-MUC1	ab28081
2-CK 8,18 y 19	ab41825
3-EpCAM	ab28081
4-CEA	ab4451
5-HER-2	ab16901 (solo mama y gástrico)
6-N-CADHERINA	ab6528
7-CD146	ab75769

Un sistema de detección óptica, no cubierto por las reivindicaciones, para llevar a cabo el método de detección de presencia o ausencia de analitos en fluidos comprende:

- un contenedor de mezcla configurado para recibir y mezclar una muestra de fluido y una pluralidad de nanopartículas no protegidas;

- al menos un pasaje en comunicación fluida con el contenedor de mezcla;

- medios de accionamiento asociados al pasaje;

- un emisor adaptado para producir una luz monocromática incidente para incidir sobre una mezcla de fluido de muestra de fluido y una pluralidad de nanopartículas en una sección de detección asociada con el pasaje;

- un lector configurado para recibir una luz reflejada, transmitida o dispersada desde la mezcla de fluido del pasaje y leyendo la señal Raman asociada con la mezcla de fluido;

5 - medios de control en la comunicación de datos con el emisor y el lector.

Los resultados de la detección son la presencia o ausencia de analitos y también la cuantificación de los analitos presentes, que se obtienen rápidamente, sin cultivo alguno como en el estado de la técnica. A diferencia de la técnica anterior, el lector puede recibir la señal Raman potenciada asociada con la brecha entre nanopartículas que actúa
10 como punto crítico. Puede cribarse una cantidad relativamente grande de muestra de fluido, por ejemplo, mililitros de sangre.

El pasaje usado en el método de la invención es un microcanal de dimensiones variables.

15 Según otra característica del sistema, los medios de accionamiento pueden ser de tipo pasivo o de tipo activo. Cuando el medio de conducción es de tipo pasivo comprende el pasaje configurado para permitir el movimiento capilar y cuando el medio de conducción es de tipo activo, como en la invención, comprende una bomba, en particular una microbomba.

20 La luz monocromática incidente producida por el emisor es un rayo láser desde el UV hasta el infrarrojo.

La longitud de onda de la luz monocromática puede ser preferiblemente de 785 nm. Otras características y ventajas de la invención quedarán claras a partir de la descripción de realizaciones preferidas, pero no exclusivas, los dibujos que se acompañan tienen carácter ilustrativo pero sin carácter limitativo.

25 Breve descripción de los dibujos

la figura 1A muestra esquemáticamente un diagrama de funcionamiento de un sistema de detección óptica con algunas partes relevantes según la invención;

30 La figura 1B muestra los espectros SERS de las diferentes partículas codificadas usadas para analitos diana (bacterias);

35 La figura 1C muestra imágenes de un microscopio electrónico de transmisión de analitos diana (bacterias) cubiertos con sus respectivas nanopartículas correspondientes;

La figura 1D es una vista esquemática de un sistema de detección óptica según la invención;

40 La figura 2A muestra una serie temporal de correlaciones entre espectros adquiridos secuencialmente recopilados en intervalos de 270 ms y la referencia SERS de las nanopartículas marcadas;

La figura 2B muestra imágenes de cultivos celulares (24-48 horas) para microorganismos inoculados en muestras de sangre;

45 La figura 2C muestra comparaciones de concentraciones de bacterias determinadas por la presente invención (círculos abiertos) para una muestra contaminada frente a cultivos tradicionales (cuadrados abiertos);

La figura 3A muestra la cinética de agregación de nanopartículas medida a través de la señal SERS dependiente del tiempo (símbolos) después de agregar el analito (E. coli) a la mezcla de nanopartículas codificadas;

50 La figura 3B muestra una simulación Monte Carlo de la evolución temporal de la agregación de nanopartículas en el analito (membrana bacteriana) producida por encuentros aleatorios;

55 La figura 3C muestra un aumento estimado en la intensidad de SERS con la inclusión (curva continua) y sin (curva discontinua) del efecto de los puntos críticos de brecha entre nanopartículas, como se extrae de la simulación de la figura 3B;

60 La figura 3D muestra un esquema de un analito (E. coli) individual cubierto con nanopartículas codificadas y un detalle de la distribución de intensidad de campo casi eléctrico que revela la formación de puntos críticos ópticos en las brechas de nanopartículas en una distribución representativa de nanopartículas;

La figura 4 muestra el campo eléctrico generado en el centro de la brecha que separa dos nanopartículas coloidales de plata de 60 nm de diámetro en función de su distancia de interacción al formar un dímero;

65 La figura 5 muestra la respuesta plasmónica y las imágenes SEM representativas de nanopartículas codificadas en solución preparadas;

La figura 6 muestra la optimización de la concentración de las nanopartículas codificadas para la reducción del ruido de fondo en la sección de detección de la presente invención.

5 Aunque una señal SERS puede identificarse claramente por encima de 10^{-5} M en plata, a 10^{-6} M el espectro desaparece. A 10^{-7} M (concentración de trabajo) no se logra ninguna señal del fondo de nanopartículas dispersas incluso cuando se aumenta en gran medida el tiempo de adquisición;

10 La figura 7A muestra imágenes de cultivos celulares para un analito (bacteria *E. coli*); una muestra de suero se enriquece con *E. coli* en diferentes concentraciones;

La figura 7B muestra los resultados de detección y cuantificación obtenidos en el presente sistema: sin bacterias presentes, con baja concentración, con alta concentración o con alta concentración pero sin la nanopartícula codificada que identifica el analito (bacteria *E. coli*);

15 La figura 7C muestra una comparación estadística de los métodos de las figuras 7A y 7B;

La figura 8A muestra imágenes de cultivos celulares para un analito (bacteria *S. aureus*); una muestra de suero se enriquece con *S. aureus* en diferentes concentraciones;

20 La figura 8B muestra los resultados de detección y cuantificación obtenidos en el presente sistema: sin bacterias presentes, a baja concentración, alta concentración y alta concentración pero sin la nanopartícula codificada que identifica el analito (bacteria *S. aureus*);

25 La figura 8C muestra una comparación estadística de los métodos de las figuras 8A y 8B:

La figura 9A muestra imágenes de cultivos celulares para un analito (bacteria *S. agalactiae*); una muestra de suero se enriquece con *S. agalactiae* a diferentes concentraciones;

30 La figura 9B muestra los resultados de detección y cuantificación obtenidos en el presente sistema: sin bacterias presentes, a baja concentración, alta concentración y alta concentración pero sin la nanopartícula codificada que identifica el analito (bacteria *S. agalactiae*);

35 La figura 9C muestra una comparación estadística de los métodos de las figuras 9A y 9B:

La figura 10A muestra imágenes de cultivos celulares para un analito (bacteria *P. aeruginosa*); una muestra de suero se enriquece con *P. aeruginosa* a diferentes concentraciones;

40 La figura 10B muestra los resultados de detección y cuantificación obtenidos en el presente sistema: sin bacterias presentes, a baja concentración, alta concentración y alta concentración pero sin la nanopartícula codificada que identifica el analito (bacteria *P. aeruginosa*);

La figura 10C muestra una comparación estadística de los métodos de las figuras 10A y 10B:

45 La figura 11A muestra imágenes de cultivo celular de muestra de suero enriquecido con *E. coli* y *S. aureus* (volumen sembrado de 1 ml para *E. coli* y 0.5 ml para *S. aureus*);

La figura 11B muestra los resultados de detección y cuantificación obtenidos en el presente sistema para las mismas bacterias que la figura 11A;

50 La figura 11C muestra una comparación estadística de los métodos de la figura 11A y 11B;

La figura 12 muestra imágenes TEM de varias *E. coli* (unidades formadoras de colonias, CFU) individuales o agrupadas recubiertas con nanopartículas y que revelan la biodiversidad de *E. coli*;

55 La figura 13A muestra imágenes de cultivo celular de muestra de suero enriquecido con *E. coli*, *S. agalactiae* y *S. aureus* (Volumen 0.5 ml para cada uno);

60 La figura 13B muestra los resultados de detección y cuantificación obtenidos en el presente sistema para las mismas bacterias que la figura 13A;

La figura 13C muestra imágenes TEM representativas de bacterias recubiertas;

65 La figura 13D muestra una comparación estadística de los métodos de la figura 13A y 13B:

La figura 14A muestra la distribución de las distancias de brecha, extraídas de la simulación de Monte Carlo de la figura 3B;

La figura 14B muestra la potenciación de SERS en dímeros de nanopartículas de Ag, a partir de una simulación electromagnética;

La figura 14C muestra la evolución temporal de la señal SERS, extraída de los datos de las figuras 14A y 14B;

La figura 14D muestra la respuesta efectiva de una capa de partículas;

La figura 15 es una vista esquemática de secciones de un pasaje del sistema según la invención, en el que las dimensiones de las secciones están representadas esquemáticamente y a modo de ejemplo;

Descripción de una realización preferida

Las figuras adjuntas muestran realizaciones preferidas y no limitativas de un sistema de detección óptica designado de manera general con el número 100 de referencia y diferentes vistas respecto al método de detección de presencia o ausencia de analitos, objeto de la presente invención.

Un ejemplo de un sistema 100 de detección óptica para detectar la presencia o ausencia de analitos en fluidos se puede ver en la figura 1D, en la que se muestra que el sistema 100 de detección óptica comprende un contenedor 101 de mezcla o recipiente de entrada configurado para recibir y mezclar una muestra de fluido con o sin al menos un analito diana y una pluralidad de nanopartículas desprotegidas. La muestra de fluido puede abarcar al menos un analito diana (figura 1A) y la nanopartícula puede abarcar una pluralidad de nanopartículas codificadas y desprotegidas (figura 1A). El contenedor 101 de mezcla puede comprender las nanopartículas precargadas y la muestra de fluido se puede colocar posteriormente para obtener la mezcla correspondiente. Las nanopartículas se pueden proporcionar como un "cóctel" que contiene varios tipos de las mismas, por ejemplo desde 1 a 200, cada tipo dirigido selectivamente a un analito diferente.

El sistema 100 de detección óptica también comprende un pasaje 102A, 102B, 102C en comunicación fluida con el contenedor 101 de mezcla. Este pasaje 102A, 102B, 102C es un microcanal con dimensiones variables, por ejemplo tiene un ancho de 200 μm y una profundidad de 100 μm , que se amplía a 400 μm de ancho y 2 μm de profundidad en una sección 108 de detección.

Para hacer circular la mezcla de fluido de nanopartículas y muestra de fluido siguiendo la dirección D indicada por una flecha en la figura 1D, el sistema comprende medios de conducción asociados al pasaje 102A, 102B, 102C. El medio de conducción comprende, en la invención, una bomba 103, en particular una microbomba (mp6, Bartels). Fuera del alcance de la presente invención, el pasaje 102A, 102B, 102C puede configurarse para permitir el movimiento capilar de la mezcla de fluido.

El pasaje 102A, 102B, 102C está, en la invención, dividido en tres secciones; una sección inicial estrecha del pasaje 102A que aumenta la caída de presión del flujo necesaria para controlar con precisión la descarga del flujo con la microbomba. A continuación, una segunda sección del pasaje 102B expande el volumen del microcanal hasta la tercera sección del pasaje 102C donde las dimensiones del microcanal aumentan hasta 0.4 mm de ancho y 2 mm de profundidad. Este volumen final da las dimensiones apropiadas para cribar continuamente la mezcla de fluido con caudales, por ejemplo, de 1.74 mm s⁻¹ a una tasa de captura de 1.83 mm s⁻¹

El sistema también comprende un emisor 104 adaptado para producir una luz L monocromática incidente para incidir en la mezcla que fluye a través del pasaje 102A, 102B, 102C. Debe entenderse que se puede usar cualquier medio capaz de producir tal luz, por ejemplo, un dispositivo que comprenda un macroobjetivo de 6 mm D y una focal de -18 mm, proporcionando un punto eficiente de 0.5 mm, con el láser emitiendo a 785 nm y 300 mW.

Siguiendo con el sistema, también comprende un lector 105 configurado para recibir una luz reflejada, transmitida o dispersada (no mostrada) de la mezcla del pasaje 102A, 102B, 102C, particularmente la mezcla que pasa por la sección 108 de detección, y la lectura de la señal Raman potenciada asociada con la mezcla de fluido de nanopartículas y la muestra de fluido o más particularmente, la señal Raman del complejo nanopartícula-analito y la señal Raman potenciada por la brecha entre nanopartículas cuando al menos un analito está incluido en el muestra de fluido. En cuanto al emisor 104, el lector 105 debe entenderse como cualquier dispositivo capaz de recibir la luz reflejada de la mezcla del pasaje 102A, 102B, 102C, específicamente de las brechas entre nanopartículas. El emisor puede comprender, por ejemplo, un espectrómetro Renishaw InVia Reflex.

El medio 106 de control, como procesador, en la comunicación de datos con el emisor 104 y el lector 105 está comprendido por el presente sistema y también puede controlar el funcionamiento de la microbomba.

Una realización particularmente preferida del presente sistema puede comprender una capa (no mostrada) con una cubierta deslizante (no mostrada) por medio de un dispositivo microfluidico. La capa se fabrica con polidimetilsiloxano

(PDMS) mediante moldeo de réplica usando un molde maestro de aluminio. El PDMS (Sylgard 184, Dow Corning) se prepara mezclando el prepolímero y el agente de curado en una proporción estándar de 10:1. La mezcla se vierte sobre el molde, se desgasifica al vacío y se cura a 80 °C. Después de una hora, se despegue el PDMS del molde y se perforan los orificios de acceso fluido (entrada y salida, no ilustrados).

El dispositivo microfluídico se obtiene uniendo la capa de PDMS a una cubierta de portaobjetos (130-170 μm de espesor) después del tratamiento con plasma de oxígeno (100 W, 3 % de O_2 , 0.2 mbar, 40 s) (Plasma Flecto 10, Plasma technology GmbH). El dispositivo de microfluidos comprende un microcanal formado durante una etapa de moldeo de la capa y la cubierta deslizante correspondiente.

El contenedor 101 de mezcla, la bomba 103 y un recipiente 107 de salida asociado con el contenedor 101 de mezcla a través del pasaje 102A, 102B, 102C para recibir la mezcla después del cribado, están instalados en el dispositivo microfluídico. Luego se conecta el dispositivo microfluídico al emisor 104 y al lector 105 para llevar a cabo el método de la presente invención.

Sin embargo, fuera del alcance de la presente invención, el sistema puede adoptar cualquier realización distinta del dispositivo microfluídico.

Para detectar la presencia o ausencia de analitos diana en una muestra de fluido, la presente descripción también divulga un método que comprende las etapas de:

a) poner en contacto una muestra de fluido y una pluralidad de nanopartículas, en el que cada una de las nanopartículas comprende un núcleo desprotegido y etiquetado con al menos una especie molecular con un espectro SERS definido, estando las nanopartículas funcionalizadas con al menos un ligando selectivo para un receptor dado de un analito diana, siendo el contacto de la muestra de fluido con las nanopartículas en condiciones tales que, cuando la muestra de fluido comprende al menos un analito, las nanopartículas se agregan selectivamente en la superficie de su analito diana, formando un complejo nanopartícula-analito, la agregación promueve la concentración de las nanopartículas en la superficie del analito diana y, de este modo, un acoplamiento de plasmones entre las nanopartículas a través de la generación de brechas estrechas entre nanopartículas;

En el método de la invención, las nanopartículas se obtienen marcando nanopartículas de plata con diferentes moléculas activas en Raman y funcionalizándolas, por ejemplo, con ligandos como anticuerpos selectivos de bacterias o marcadores de células cancerosas (véase la referencia 11 en la figura 1A). La dispersión de nanopartículas fluidas se mezcla en el contenedor 101 de mezcla con el fluido de muestra, que puede contener microorganismos como analitos diana (véase la referencia 12 en la figura 1A). Se pueden dirigir varios tipos de bacterias usando nanopartículas preparadas con diferentes combinaciones específicas de moléculas Raman y ligandos (por ejemplo, anticuerpos). La presencia de uno de los analitos diana (por ejemplo, microbios) induce la agregación de sus nanopartículas correspondientes a anticuerpos en su superficie, que evoluciona rápidamente hacia una cobertura aleatoria completa (véase la referencia 13 en la figura 1A).

La mezcla de fluido circula a través del pasaje 102A, 102B, 102C impulsada por la bomba 103 siguiendo la dirección D;

b) someter una mezcla de fluido de la muestra de fluido y la pluralidad de nanopartículas a SERS. La mezcla de fluido de muestra de fluido y nanopartículas pasa a través de la sección 108 de detección donde el emisor 104 emite una luz monocromática incidente (rayo láser) con una longitud de onda, por ejemplo, de 785 nm para incidir en la mezcla. La longitud de onda puede variar de UV a infrarrojo;

c) medir al menos una señal SERS asociada con la mezcla de fluido. Todas las porciones de la mezcla de fluidos se someten a SERS y el sistema mide la señal producida (intensidad). Si la mezcla de fluido comprende un complejo analito-nanopartícula con la brecha estrecha entre nanopartículas, la intensidad medida aumentaría exponencialmente entre 2 y 3 órdenes de magnitud por brecha. La mayoría de los intervalos de tiempo, el sistema actual solo toma muestras de nanopartículas dispersas, lo que produce una señal Raman débil. Ocasionalmente, los analitos diana (por ejemplo, microorganismos) atraviesan el haz de luz emitido por el emisor 104, lo que da lugar a una señal Raman superior en varios órdenes de magnitud ^[15] porque la superficie del analito está recubierta con una densa matriz de brechas estrechas entre partículas que actúan como puntos críticos ópticos, exponiendo de este modo las moléculas Raman a una intensidad de luz mucho mayor y produciendo una señal intensa que revela las huellas dactilares moleculares y, en consecuencia, también el tipo de analito (por ejemplo, células específicas, microorganismos, virus, ácidos nucleicos, ácidos nucleicos peptídicos, antígenos, péptidos y proteínas o una combinación de los mismos) (véase la figura 1B);

d) analizar espectralmente la al menos una señal SERS de la etapa c). Si la mezcla de fluidos comprende un complejo analito-nanopartícula con la brecha estrecha entre nanopartículas, la señal Raman potenciada asociada con la estrecha brecha entre partículas internas se analiza para registrar la señal inelástica generada por las moléculas activas en Raman (véase la referencia 16 en la figura 1A). Se puede adquirir y registrar un espectro en un lapso de tiempo predefinido, por ejemplo, aproximadamente cada 1-30 ms.

e) reconocer al menos un espectro SERS definido del complejo nanopartícula-analito, a través de una señal SERS potenciada por la al menos una brecha estrecha entre nanopartículas, cuando la mezcla de fluido comprende al menos un complejo nanopartícula-analito con la brecha estrecha entre nanopartículas.

Después de la etapa e), el presente método puede comprender la etapa f), para cuantificar el analito en la muestra de fluido, cuando un analito está contenido en la muestra de fluido. Por ejemplo, los mililitros de fluido de muestra pueden analizarse exhaustivamente siguiendo este método, cuantificando la cantidad de analitos diana en la muestra de fluido.

Esa cuantificación se logra cuantificando el número de espectros SERS definidos reconocidos (eventos positivos) y la intensidad de la señal SERS relacionada con cada espectro SERS definido reconocido (eventos positivos) en la mezcla de fluido.

Es obvio que si la muestra de fluido no contiene ningún analito, el sistema no obtendría una señal SERS potenciada tanto de los complejos de nanopartículas-analito como de las brechas estrechas entre partículas. Por lo tanto, se detectaría la ausencia del analito en la muestra de fluido.

El método descrito anteriormente puede seguir una secuencia de instrucciones de un programa informático implementado con los medios 106 de control o alternativamente con un ordenador (no mostrado) en comunicación de datos con el presente sistema. Para ello, los medios 106 de control pueden almacenar el código fuente para automatizar el método o pueden almacenarse en cualquier medio legible por ordenador en comunicación de datos con el sistema de ejecución del programa informático. Evidentemente, la secuencia de instrucciones puede adaptarse a condiciones particulares de análisis.

Con respecto al método descrito anteriormente, los inventores realizaron varias pruebas con el objetivo de demostrar la selectividad y la multiplexación del presente sistema en muestras de analitos reales. Aunque las pruebas están relacionadas con la detección de bacterias, los analitos que se va a detectar pueden variar como se mencionó anteriormente. El presente método y sistema no se limitan a la detección de bacterias. Tales pruebas se describen a continuación con referencia a las figuras adjuntas. Antes de continuar con las pruebas, se deben citar los valores experimentales anteriores, el método y las condiciones usadas y seguidas.

Materiales y métodos: nitrato de plata (99.99 %, AgNO_3), citrato trisódico dihidrato (≥ 99.5 %), ácido L-ascórbico (≥ 99.0 %), sulfato de magnesio (≥ 99.0 %, MgSO_4), etanol (99.5 %, EtOH), ácido 11-mercaptoundecanoico (95 %, MUA), ácido 4-mercaptobenzoico (99 %, MBA) ácido tiosalicílico (97 %, TSA), 3,4-difluorotiofenol (96 %, DFTP), 2-(trifluorometilo) bencenotiol (96 %, TFMBT), 1-(4-hidroxifenil)-1H-tetrazol-5-tiol (97 %, HPHTT), albúmina de suero bovino (≥ 98.0 %, BSA), clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (BioXtra, EDC), cloruro de sodio (BioXtra, ≥ 99.5 %, NaCl), solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D8537, DPBS) y sangre humana (BCR634 FLUKA) se adquirieron de Sigma-Aldrich. Todos los reactivos se usaron sin purificación adicional. Se usó agua Milli Q ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) en todas las soluciones acuosas, y todo el material de vidrio y los agitadores magnéticos se limpiaron con agua regia y con una solución de hidróxido de potasio en isopropanol/agua antes de todos los experimentos.

Los anticuerpos (Ab) de *Escherichia coli* (ab30522, *E. coli*) y *Streptococcus agalactiae* (ab41203, *S. agalactiae*) se adquirieron de Abcam, y los anticuerpos *Pseudomonas aeruginosa* (MA1-83430, *P. aeruginosa*) y *Staphylococcus aureus* (MA1-83467, *S. aureus*) se adquirieron de life technologies. El medio enriquecido con tioglicolato (221742, BBL) se adquirió de BD (Becton, Dickinson and Company) y las placas de agar Columbia + sangre de carnero al 5 % (43 041) se adquirieron de bioMérieux. Las muestras bacterianas se obtuvieron del Departamento de Microbiología Clínica, Hospital Clinic, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, Barcelona, España.

Síntesis de nanopartículas de plata esféricas estabilizadas con citrato: nanopartículas de plata esféricas (nanopartículas de Ag) de aproximadamente 62 nm de diámetro se produjeron mediante una combinación de enfoques informados previamente [16-19]. Brevemente, se calentaron 250 mL de agua Milli Q con agitación vigorosa. Se usó un condensador para evitar la evaporación del disolvente. A continuación, se agregaron consecutivamente al agua hirviendo soluciones acuosas de citrato trisódico (3.41 mL, 0.1 M) y ácido ascórbico (0.25 mL, 0.1 M). Después de 1 minuto, una solución acuosa premezclada que contenía AgNO_3 (0.744 mL, 0.1 M) y MgSO_4 (0.56 mL 0.1 M), que se incubó previamente a temperatura ambiente durante 5 min, se inyectó rápidamente en un recipiente de reacción con agitación vigorosa. El color de la solución cambia rápidamente de incoloro a amarillo y cambia gradualmente a naranja oscuro. Se continuó hirviendo durante 1 h con agitación para asegurar la finalización de la reacción. El tamaño de las nanopartículas de Ag fue de aproximadamente 62 nm. La concentración de plata de las partículas sintetizadas fue de $2.5 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Funcionalización del ácido mercaptoundecanoico y codificación de nanopartículas de Ag: A continuación, se usó MUA para proporcionar estabilidad coloidal a las nanopartículas de Ag durante el procedimiento de codificación y posteriormente usar la funcionalidad carboxílica para el acoplamiento de los anticuerpos. Específicamente, cinco alícuotas (25 mL cada una) de las nanopartículas de Ag sintetizadas se limpiaron por centrifugación (5400 rpm, 30 min) y se volvieron a dispersar mediante sonicación (durante 5 min) en una solución que contenía agua Milli Q (3.27

mL) y EtOH (21.67 mL). En consecuencia, las nanopartículas de Ag se funcionalizaron con una pequeña cantidad de MUA (2.4 moléculas nm⁻²) mediante la adición rápida de una solución que contenía MUA (24.76 µL, 1.0 X 10⁻³ M en EtOH) y NH₄OH (30 µL, solución acuosa al 29 %) a cada alícuota bajo agitación vigorosa. La agitación se continuó durante 28 h para asegurar la funcionalización completa de MUA en la superficie de plata. Finalmente, las alícuotas de nanopartículas de Ag funcionalizadas con MUA luego se codificaron con cinco etiquetas Raman diferentes (1.6 moléculas nm⁻² de MBA, TSA, DFTP, TFMBT y HPHTT, respectivamente). Para ello, se agregaron a las alícuotas 16.51 µL de una solución madre 10⁻³ M de los cinco códigos SERS diferentes bajo fuerte agitación magnética. Una vez más, se continuó agitando durante otras 28 h. Las soluciones de nanopartículas de Ag codificadas se centrifugaron luego y se volvieron a dispersar dos veces en agua Milli Q para eliminar el NH₄OH, el EtOH y cualquier etiqueta Raman sin reaccionar antes del acoplamiento del anticuerpo. La concentración de nanopartículas se calculó para cada alícuota usando la ley de Lambert-Beer y un coeficiente de extinción de 7.79 X 10¹⁰ M⁻¹ cm⁻¹, derivado de la literatura, [20] y ajustado a 0.14 nM para todas ellas. Por otra parte, otra alícuota (25 mL) de las nanopartículas de Ag sintetizadas se limpió también por centrifugación (5400 rpm, 30 min) y se volvió a dispersar en agua Milli Q (25 mL). A continuación, las nanopartículas de Ag se funcionalizaron con MUA agregando, con agitación vigorosa, 24.76 µL (1.0 X 10⁻³ M en EtOH). La agitación se continuó durante 28 h para asegurar la funcionalización completa de MUA en la superficie de plata. Finalmente, las nanopartículas de Ag se modificaron aún más con BSA (41.26 µL, 1.0 X 10⁻³ M en agua Milli Q) con agitación magnética durante 24 h, seguido de una centrifugación en una etapa de limpieza para eliminar el exceso de BSA y cualquier molécula de MUA sin reaccionar (5400 rpm, 30 min, redispersada en agua Milli Q). La concentración de nanopartículas se calculó y se ajustó a 0.034 nM.

Conjugación de anticuerpos a nanopartículas de Ag: se agregaron 200 µL de DPBS y EDC (39.2 µL, 250 nM en DPBS) sobre cada solución de nanopartículas de Ag codificada (1 mL, 0.14 nM, etiquetas Raman: MBA, TSA, DFTP, TFMBT, y HPHTT), las mezclas se agitaron durante 5 min a temperatura ambiente y luego se agregaron las soluciones de anticuerpos (1.46 µL, ~6.67 µM, *E. coli*, BSA, *P. aeruginosa*, *S. agalactiae* y *S. aureus*, respectivamente). Las mezclas resultantes se agitaron durante 2 h a temperatura ambiente, luego se limpiaron dos veces mediante centrifugación para eliminar el exceso de EDC y anticuerpos sin reaccionar (3000 rpm, 10 min) y se volvieron a dispersar en DPBS/agua Milli Q (1:3). Se midió la concentración de cada solución de nanopartículas de Ag modificado con Ab, se ajustó a 0.14 nM y las muestras se almacenaron a 4 °C.

Caracterización de nanopartículas: se usaron espectroscopía UV-Vis (Lambda 19, PerkinElmer) y microscopía electrónica de transmisión (TEM, JEOL JEM-1011 operando a 100 kV) para caracterizar la respuesta óptica, la estructura y el tamaño de las nanopartículas durante el procedimiento de funcionalización. Para caracterizar el procedimiento de codificación, los espectros SERS se recopilaron en geometría de retrodispersión con un sistema Renishaw Invia Reflex equipado con un detector 2D-CCD. El espectrógrafo usó una rejilla de alta resolución (1200 g cm⁻¹) con óptica de filtro de paso de banda adicional. Se enfocó un láser de diodo de 785 nm sobre la solución coloidal ([Ag⁰] = 0.1 mM) mediante un objetivo de larga distancia de trabajo (0.17 NA, distancia de trabajo 30 mm). Los espectros fueron adquiridos con un tiempo de exposición de 1 s (dependiendo de la saturación de intensidad Raman) y una potencia láser en la muestra de aproximadamente 300 mW.

Muestras bacterianas: Las bacterias se inocularon en medio enriquecido con tioglicolato (BBL), se incubaron a 37 °C, durante 18 horas y luego se diluyeron con solución salina (NaCl al 0.9 %). A continuación, se agregó la cantidad necesaria de solución bacteriana, para alcanzar la concentración final deseada, al fluido correspondiente (solución salina o sangre humana que contenía nanopartículas de Ag modificadas con Ab (1 µL por mL de muestra de cada partícula codificada) y el doble de la cantidad total de nanopartículas de Ag codificadas de nanopartículas de Ag no marcadas y protegidas con albúmina sérica. Para verificar la concentración bacteriana final por muestra, se esparcieron varias alícuotas de cada solución en placas de agar-sangre y se incubaron durante 24-48 horas a 37 °C. Después de este tiempo, se contó el número de colonias en cada placa para calcular las CFU mL⁻¹. Para corroborar aún más la interacción entre las nanopartículas de Ag modificadas con Ab con las bacterias correspondientes, volúmenes iguales de nanopartículas de Ag (0.14 nM) y solución bacteriana (~106 CFU mL⁻¹) se mezclaron y se incubaron durante 15 min a 37 °C. 10 µL de estas mezclas se depositaron en rejillas de cobre recubiertas de carbón y las muestras se dejaron secar antes del análisis TEM.

Configuración de la medición: las mediciones de SERS se recogieron con un Renishaw Invia Reflex. El láser (785 nm, 300 mW) se enfocó con un macroobjetivo de 6 mm D y una focal de 18 mm, lo que proporcionó un punto eficiente de 0.4 mm. La recolección de datos se fijó en 270 ms proporcionando una velocidad de adquisición de 1.85 mm s⁻¹; proporcionando una velocidad de evaluación de 13.3 min por mL de muestra y 3000 escaneos. La deconvolución de datos se llevó a cabo aplicando métodos clásicos directos de mínimos cuadrados.

Para la demostración de la detección de bacterias, los inventores prepararon cinco dispersiones de nanopartículas codificadas, cada una de ellas funcionalizada con un tiol aromático diferente que produce un espectro Raman único (Figuras 1B y 5). Las nanopartículas codificadas se funcionalizaron posteriormente y por separado con el correspondiente anticuerpo selectivo de membrana para el reconocimiento de *E. coli* y *P. aeruginosa* (bacterias similares a bastoncillos gramnegativos) y *S. aureus* y *S. agalactiae* (cocos esferoidales grampositivos). La quinta dispersión de nanopartículas se funcionalizó con albúmina sérica y se usó como blanco. Luego, las cinco dispersiones de nanopartículas se mezclaron en el contenedor 101 de mezcla (Figura 1A y 1D) a una concentración de -107

nanopartículas por mL por código Raman, lo que consideramos óptimo para producir una unión rápida de nanopartículas y patógenos con una señal SERS de fondo mínimo (véase la figura 6). Para limitar la formación de agregados espurios en la solución coloidal, que pueden dar lugar a falsos positivos, se agregó a la mezcla el doble de nanopartículas protegidas con BSA no codificadas. Luego se agregó suero contaminado con solo una de las cuatro bacterias mencionadas al contenedor 101 de mezcla de la presente invención, y se recogieron series temporales de espectros SERS a medida que la mezcla circulaba a través del foco láser del emisor 104 (Figura 2A y Figuras 7-10). La mayoría de los intervalos de tiempo solo se tomaron muestras de nanopartículas dispersas, lo que produjo una señal SERS débil. Ocasionalmente, una unidad formadora de colonias (CFU) dirigida atravesaba el foco del láser, dando lugar a una señal SERS ~103 más alta debido a la concentración de partículas en la superficie bacteriana y la posterior formación de brechas de nanopartículas, como se discutió anteriormente. Luego se calcula la correlación de los espectros registrados con los de referencia para cada uno de los códigos Raman (Figura 1B, y detalles de cálculo en el SI), y se obtiene una identificación clara del patógeno agregado.

Se repitió el experimento para muestras que contenían mezclas de dos bacterias (Figuras 11). Para todos los resultados, se observó que no se observaron identificaciones falsas (es decir, no se observaron firmas de los tipos de bacterias que estaban ausentes en la muestra de sangre) y, de hecho, no se registraron positivos de las muestras en blanco (Figura 2A y 7-12). Por cierto, se observó una dispersión significativa en la correlación, que se atribuye al tamaño de las CFU detectadas, que van desde células individuales hasta colonias más grandes (Figuras 12). En todos los casos, las concentraciones obtenidas fueron consistentes con las encontradas usando cultivo celular convencional pero con una desviación estándar considerablemente menor (Figuras 7-11).

La figura 12 muestra imágenes TEM de varias cfu de *E. coli* individuales o agrupadas como biodiversidad de *E. coli* recubiertas con nanopartículas. Resultados de detección de SERS en el presente sistema para una de las muestras de la figura 8 a baja concentración bacteriana. Espectros de los círculos resaltados que muestran que el grado de correlación de los espectros SERS de la partícula codificada depende de la proporción señal/ruido. De este modo, grupos más grandes de bacterias dan lugar a una mejor señal y, así, a una mejor correlación.

Adicionalmente, se demostró la selectividad y multiplexación de la presente invención en muestras de sangre real al contaminar sangre simultáneamente con *S. aureus*, *E. coli* y *S. agalactiae* en diferentes concentraciones que van desde -1 a 10 de CFU. El análisis de esta muestra por la presente invención reveló los tres patógenos (Figura 2A y Figuras 13), mientras que un análisis estadístico de los resultados en base a tres análisis del experimento (Figura 2C) determinó sus concentraciones respectivas en excelente acuerdo con cultivos celulares (Figuras 2B y 13). Por cierto, los eventos positivos varían en el grado de correlación (intensidad SERS), como se esperaba de la diversidad bacteriana (Figuras 12). Se destaca que cada análisis de la presente invención tomó 13 min, lo que es una reducción sustancial en el tiempo en comparación con los cultivos celulares (24-72 horas). Estos resultados demuestran aún más la capacidad del presente sistema para clasificar múltiples muestras infectadas con concentraciones de patógenos (analito) muy diferentes en un solo paso e incluso resolver con precisión las concentraciones de patógenos (analito) en muestras de suero contaminadas con *E. coli* y una densidad mucho mayor de *S. aureus* y *S. agalactiae* (Figuras 2 y 13).

En las figuras 2 se muestra el rendimiento de la presente invención para muestras de sangre. Particularmente en la figura 2A se muestra la correlación entre una serie temporal (21-26) de espectros recolectados en intervalos de 270 ms y la referencia SERS de las nanopartículas marcadas (Figura 1B). Las muestras de suero analizadas contienen ya sea un patógeno (21-24, véase las etiquetas) o ningún patógeno (25, en blanco). La Serie 26 muestra el resultado en una muestra de sangre completa enriquecida con una combinación de tres bacterias y concentraciones diferentes (*S. aureus*, *E. coli* y *S. agalactiae*). Los valores de correlación grandes revelan el pasaje de una bacteria individual o CFU. La figura 2B muestra cultivos celulares (24-48 horas) para el microorganismo inoculado en las muestras de sangre (serie 26). Los puntos blancos corresponden a las CFU. La figura 2C muestra la comparación de las concentraciones de bacterias correspondientes determinadas por la presente invención (círculos abiertos) para la muestra contaminada con tres patógenos (serie 26) frente a cultivos tradicionales (cuadrados abiertos). Los promedios de tres ejecuciones tanto de la presente invención como de los experimentos de cultivo se muestran mediante los correspondientes símbolos sólidos.

La cinética de agregación de nanopartículas funcionalizadas sobre la membrana del patógeno (superficie del analito) es un elemento clave de la presente invención. Como ejemplo representativo, después de agregar una gran concentración de *E. coli* al grupo de cinco nanopartículas codificadas (tiempo 0), se encontraron tres etapas distintas en la evolución temporal de la señal SERS resultante (Figura 3A): la agregación de nanopartículas es inicialmente muy lenta, ya que las bacterias se separan de la dispersión de nanopartículas, cada una de ellas colocada en sus respectivos fluidos huésped, de modo que los encuentros nanopartícula-bacteria son relativamente poco frecuentes, lo que produce un aumento lineal, aunque lento, en la señal Raman; la difusión eventualmente acerca las nanopartículas a las bacterias después de aproximadamente 200 s, lo que resulta en encuentros más frecuentes y un aumento lineal más rápido en la intensidad de SERS; la señal finalmente alcanza una meseta después de aproximadamente 700 s, indicando cobertura saturada de la membrana del patógeno. La última etapa también se ve afectada por el agotamiento de la señal producido por la floculación, ya que el mayor peso de las CFU cubiertas de nanopartículas las aleja del foco del láser. Estos resultados experimentales se pueden entender a partir de una simulación de Monte Carlo de adherencia de partículas (Figura 3B), que revela una saturación característica en una

cobertura aleatoria de nanopartículas -60 % de la densidad máxima compactada ^[14]. Se produce una aparición aleatoria de brechas de nanopartículas, lo que lleva a un aumento en la intensidad de SERS en 3 órdenes de magnitud en comparación con las nanopartículas que no interactúan (cf. curvas continuas y rotas en la figura 3C), según se estima a partir del efecto combinado de la densidad de nanopartículas adheridas y distribución de la distancia de la brecha de las partículas (Figuras 14). El aumento de la intensidad de SERS causado por el punto crítico de la brecha entre nanopartículas no es lineal sino exponencial (Figura 3C).

La formación de brechas y la potenciación de SERS resultante son, de este modo, elementos críticos que permiten obtener señales intensas de bacterias, como un ejemplo de analito, contenido muy por encima del fondo de nanopartículas dispersas. Una simulación de la intensidad de la luz del campo eléctrico cercano del láser de longitud de onda de 785 nm cerca de una estructura similar a una barra que imita una muestra de E-coli (Figura 3D) muestra una leve modulación espacial de la intensidad cerca del microbio acompañada de una gran potenciación en las brechas de nanopartículas. Simulaciones similares para diferentes composiciones y tamaños de partículas (Figura 15) sugieren que se pueden lograr ganancias en la sensibilidad optimizando estos parámetros. En particular, el tamaño de partícula óptimo podría depender de las dimensiones y la morfología del patógeno y su afinidad por las biomoléculas ligando de nanopartículas, ya que la cifra de mérito para la presente invención es la proporción entre la señal SERS proveniente de los microorganismos y la de las nanopartículas dispersas. Los resultados demuestran la capacidad de la presente invención para resolver la presencia de analitos (infecciones bacterianas, células cancerosas, virus y hongos) mucho más rápido que nunca.

Debe señalarse además de la presente invención que la figura 14A muestra la distribución de las distancias de brechas entre partículas en diferentes intervalos de tiempo normalizados (véanse las etiquetas) en base a las simulaciones de Monte Carlo de la figura 6, ambas al azar (curvas sólidas) o direcciones de incidencia normales (curvas discontinuas). La distribución de la densidad de la brecha se normaliza a la máxima densidad de nanopartículas posible y se proporciona por unidad de proporción entre la brecha y el diámetro. La figura 14B muestra la potenciación de SERS en dímeros de nanopartículas de Ag. En particular, muestra un aumento en el factor de potenciación de SERS debido a la interacción entre partículas (curvas continuas) en relación con los valores de partículas individuales (líneas discontinuas) en función de la distancia de la brecha. El factor de potenciación se calcula resolviendo las ecuaciones de Maxwell a la frecuencia de tanto la luz incidente como la señal Raman dispersada inelásticamente. El método de los elementos de contorno se usa para resolver estas ecuaciones ^[21]. La solución acuosa se modela a través de un medio de permitividad igual a 1.77. El medio de plata se modela a través de su permitividad compleja tabulada ^[22]. El producto de las potenciaciones de intensidad de campo cercano en ambas frecuencias da una estimación de la potenciación de Raman. Cada una de las potenciaciones de campo se promedia sobre la polarización de la luz y las direcciones aleatorias de incidencia en relación con la orientación del dímero. La potenciación de SERS estimada se promedia sobre moléculas distribuidas aleatoriamente colocadas 1 nm fuera de la superficie de Ag. Los diferentes cambios de Raman que se están considerando producen resultados similares porque la longitud de onda de la luz incidente (785 nm) no resuena con los plasmones de partículas (véase la figura 5). La figura 14C muestra la evolución temporal de la señal SERS. La potenciación de SERS mediada por brechas (Figura 5) y las densidades de partículas dependientes del tiempo (Figura 6) y brechas (Figura 7) se combinan para producir la evolución de la señal SERS. El eje vertical da la intensidad integrada sobre $1 \mu\text{m}^2$ de superficie plana, normalizada a la de una nanopartícula individual. El tiempo se normaliza como en la figura 5. La curva sólida (discontinua) muestra resultados con (sin) inclusión de efectos de potenciación de brecha. Incidencia aleatoria asumida para las nanopartículas (véanse las figuras 6 y 7).

Con respecto a la figura 14D, se calculó la función dieléctrica efectiva de una película homogénea delgada que tiene el mismo coeficiente de reflexión de incidencia normal que la capa de partículas distribuidas al azar. Este último se estima a partir de los dipolos inducidos por brecha y por partícula, obtenidos a partir de simulaciones electromagnéticas de la polarizabilidad dependiente del tamaño de la brecha de los dímeros de nanopartículas (no se muestra). La función dieléctrica efectiva se obtiene entonces como $\epsilon_0 + 4\pi/t)P$, donde P es la densidad superficial de los dipolos inducidos, $t = 10\text{nm}$ es el espesor de película equivalente y $\epsilon_0 = 1.77$ es la permitividad del medio circundante. Cabe señalar que el campo cercano producido por este tipo de material es bastante insensible a la elección real de t (por ejemplo, una elección de $t = 20 \text{ nm}$ produce resultados casi indistinguibles de los de la figura 14D).

Por lo tanto, los inventores demuestran una identificación exhaustiva de analitos (patógenos) a través del cribado rápido de grandes volúmenes de fluidos corporales (por ejemplo, mililitros de sangre) para el contenido de analitos (bacterias), como lo requiere, por ejemplo, la práctica médica estándar para el análisis de muestras biológicas ^[13]. En concreto, detección y cuantificación de analitos (bacterias) sin etiquetas en tiempo real y de forma multiplexada.

Adicionalmente, se demostró que las nanopartículas producen una señal Raman relativamente débil cuando se dispersan en un fluido. Por el contrario, la presencia de uno de los analitos diana (patógenos) desencadena la acumulación de sus nanopartículas asociadas en el analito (membrana transportadora de antígenos del microorganismo), alcanzando rápidamente una cobertura aleatoria completa ^[14]. Luego se forman múltiples brechas entre las nanopartículas, que actúan como puntos críticos óptico en los que la dispersión Raman potencia en varios órdenes de magnitud (por ejemplo, entre 2 y 3 órdenes) en relación con las nanopartículas que no interactúan (Figuras 1A y 4) ^[15]. La señal resultante de dispersión Raman potenciada en la superficie (SERS) es lo suficientemente intensa como para permitir el registro de un espectro de luz inelástico específico del patógeno (Figura 1B) para las bacterias cubiertas de nanopartículas (Figura 1C). Esa señal intensa es recibida (por el lector 105) y procesada (por los medios

106 de control) comparándola con señales débiles de nanopartículas que no interactúan. Conduciendo la muestra a través del pasaje 102A, 102B, 102C preferiblemente con una dimensión diferente a la descrita anteriormente, donde un láser de detección de retrodispersión (785 nm) monitorea continuamente la corriente de líquido (un espectro cada 270 ms sobre un volumen iluminado de ~0.3 μ L), cuatro tipos diferentes de bacterias se examinaron con éxito y se cuantificaron simultáneamente a un ritmo de 13 minutos por mL de sangre. Es importante destacar que este método se puede escalar fácilmente para hacer frente a muchos más analitos (patógenos, incluidos virus o células eucariotas tales como hongos o protozoos, células cancerosas, etc.), en un solo paso sin aumentar el tiempo de muestreo, simplemente preparando nanopartículas funcionalizadas con más combinaciones de marcadores Raman y ligandos específicos.

Referencias

- [1] D. C. Angus, T. van der Poll, Severe Sepsis and Septic Shock. *New England Journal of Medicine* 369, 840 (2013).
- [2] A. Kumar et al., Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical care medicine* 34, 1589 (Jun, 2006).
- [3] P.-E. Fournier et al., Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. *Nat Rev Micro* 11,574 (08//print, 2013).
- [4] R. M. T. De Wildt, C. R. Mundy, B. D. Gorick, I. M. Tomlinson, Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions. *Nature Biotechnology* 18, 989 (2000).
- [5] R. P. H. Peters, M. A. V. Agtmael, S. A. Danner, P. H. M. Savelkoul, C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, New developments in the diagnosis of bloodstream infections. *Lancet Infectious Diseases* 4, 751 (2004).
- [6] T. Maier, S. Klepel, U. Renner, M. Kostrzewa, Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification. *Nature Methods* 3, i (2006).
- [7] M. Perros, A sustainable model for antibiotics. *Science* 347, 1062 (March 6, 2015, 2015).
- [8] R. Kanthor, Diagnostics: Detection drives defence. *Nature* 509, S14 (05/01/print, 2014).
- [9] D.-K. Kang et al., Rapid detection of single bacteria in unprocessed blood using Integrated Comprehensive Droplet Digital Detection. *Nat Commun* 5, (11/13/online, 2014).
- [10] W. Chen et al., Identification of Bacteria in Water by a Fluorescent Array. *Angewandte Chemie International Edition* 53, 13734 (2014).
- [11] Y. Wang, B. Yan, L. Chen, SERS Tags: Novel Optical Nanoprobes for Bioanalysis. *Chemical Reviews* 113, 1391 (2013/03/13, 2013).
- [12] H.-Y. Lin et al., On-line SERS Detection of Single Bacterium Using Novel SERS Nanoprobes and A Microfluidic Dielectrophoresis Device. *Small* 10, 4700 (2014).
- [13] F. R. Cockerill et al., Optimal Testing Parameters for Blood Cultures. *Clinical Infectious Diseases* 38, 1724 (June 15, 2004, 2004).
- [14] J. W. Evans, Random and cooperative sequential adsorption. *Reviews of Modern Physics* 65, 1281 (10/01/, 1993).
- [15] F. J. Garcia de Abajo, Optical excitations in electron microscopy. *Reviews of Modern Physics* 82, 209 (02/03/, 2010).
- [16] P. C. Lee, D. Meisel, Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *The Journal of Physical Chemistry* 86, 3391 (1982/08/01, 1982).
- [17] H. Li et al., Synthesis of Monodisperse, Quasi-Spherical Silver Nanoparticles with Sizes Defined by the Nature of Silver Precursors. *Langmuir* 30, 2498 (2014/03/11, 2014).
- [18] H. Li, H. Xia, D. Wang, X. Tao, Simple Synthesis of Monodisperse, Quasi-spherical, Citrate-Stabilized Silver Nanocrystals in Water. *Langmuir* 29, 5074 (2013/04/23, 2013).
- [19] B. Mir-Simon, I. Reche-Perez, L. Guerrini, N. Pazos-Perez, R. A. Alvarez-Puebla, Universal One-Pot and Scalable Synthesis of SERS Encoded Nanoparticles. *Chemistry of Materials* 27, 950 (2015/02/10, 2015).

[20] D. Paramelle et al., A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. *Analyst* 139, 4855 (2014).

5 [21] F. J. Garcia de Abajo and A. Howie, Retarded field calculation of electron energy loss in inhomogeneous dielectrics, *Phys. Rev. B* 65, 115418 (2002).

[22] P. B. Johnson and R. W. Christy, Optical constants of the noble metals, *Phys. Rev. B* 6, 4370-4379 (1972).

REIVINDICACIONES

1. Un método de detección de presencia o ausencia de analitos en fluidos, en un sistema (100) óptico, que comprende las etapas de:

a) poner en contacto en un contenedor (101) de mezcla, una muestra de fluido y una pluralidad de nanopartículas de plata, en el que cada una de las nanopartículas de plata comprende, un núcleo desprotegido el cual está desprovisto de cualquier recubrimiento que impida el acoplamiento plasmónico entre un par de nanopartículas o entre varias nanopartículas y las nanopartículas de plata están etiquetadas con al menos una especie molecular con un espectro SERS definido, las nanopartículas se funcionalizan con al menos un ligando selectivo para un receptor dado de un analito diana, el contacto de la muestra de fluido con las nanopartículas está bajo condiciones de manera que, cuando la muestra de fluido comprende al menos un analito, las nanopartículas se agregan selectivamente en la superficie de su analito diana formando un complejo nanopartícula-analito, la agregación promueve la concentración de las nanopartículas en la superficie del analito diana y, de este modo, un acoplamiento de plasmón entre las nanopartículas a través de la generación de brechas estrechas entre nanopartículas;

b) hacer circular la mezcla de fluido de la muestra de fluido y la pluralidad de nanopartículas a través de al menos un pasaje (102A, 102B, 102C) impulsado por una bomba (103), hacia la sección (108) de detección;

c) someter una mezcla de fluido de la muestra de fluido y la pluralidad de nanopartículas a SERS pasando dicha mezcla de fluido de la muestra de fluido y nanopartículas a través de la sección (108) de detección donde un emisor (104) emite una luz monocromática incidente para incidir en la mezcla de fluido de la muestra de fluido y la pluralidad de nanopartículas y en el que se permite que la luz monocromática incidente incida en la mezcla de fluido que pasa a través de una sección (108) de detección asociada con el pasaje (102A, 102B, 102C), y en el que el pasaje es un microcanal y se divide en secciones (102A, 102B y 102C): una sección inicial estrecha del pasaje (102A) que aumenta la caída de presión del flujo necesaria para controlar con precisión la descarga del flujo con la bomba, la segunda sección del pasaje 102B se expande el volumen del microcanal hasta la tercera sección del pasaje, 102C, en el que las dimensiones de la tercera sección (102C) son de 0.4 mm de ancho y 2 mm de profundidad;

d) medir al menos una señal SERS asociada con la mezcla de fluido por un lector (105);

e) analizar espectralmente la al menos una señal SERS de la etapa c) por medios (106) de control;

f) reconocer al menos un espectro SERS definido del complejo nanopartícula-analito, a través de una señal SERS potenciada por la al menos una brecha estrecha entre nanopartículas, cuando la mezcla de fluido comprende al menos un complejo nanopartícula-analito con la brecha estrecha entre nanopartículas.

2. Un método de detección de presencia o ausencia de analitos en fluidos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que en la etapa d) se registra un espectro SERS en lapsos de tiempo predefinidos.

3. Un método de detección de presencia o ausencia de analitos en fluidos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el analito es uno de: células eucariotas y procariotas, incluyendo células tumorales circulantes, microorganismos patógenos y no patógenos como hongos, protozoos, algas, rotíferos, bacterias y arqueas, virus, ácidos nucleicos, ácidos nucleicos peptídicos, antígenos, péptidos y proteínas o la combinación de los mismos

4. Un método de detección de presencia o ausencia de analitos en fluidos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ligando selectivo es un anticuerpo, proteína, aptámero o molécula pequeña.

5. Un método de detección de presencia o ausencia de analitos en fluidos según la reivindicación 4, en el que el ligando selectivo es un marcador de células cancerosas.

FIG. 1

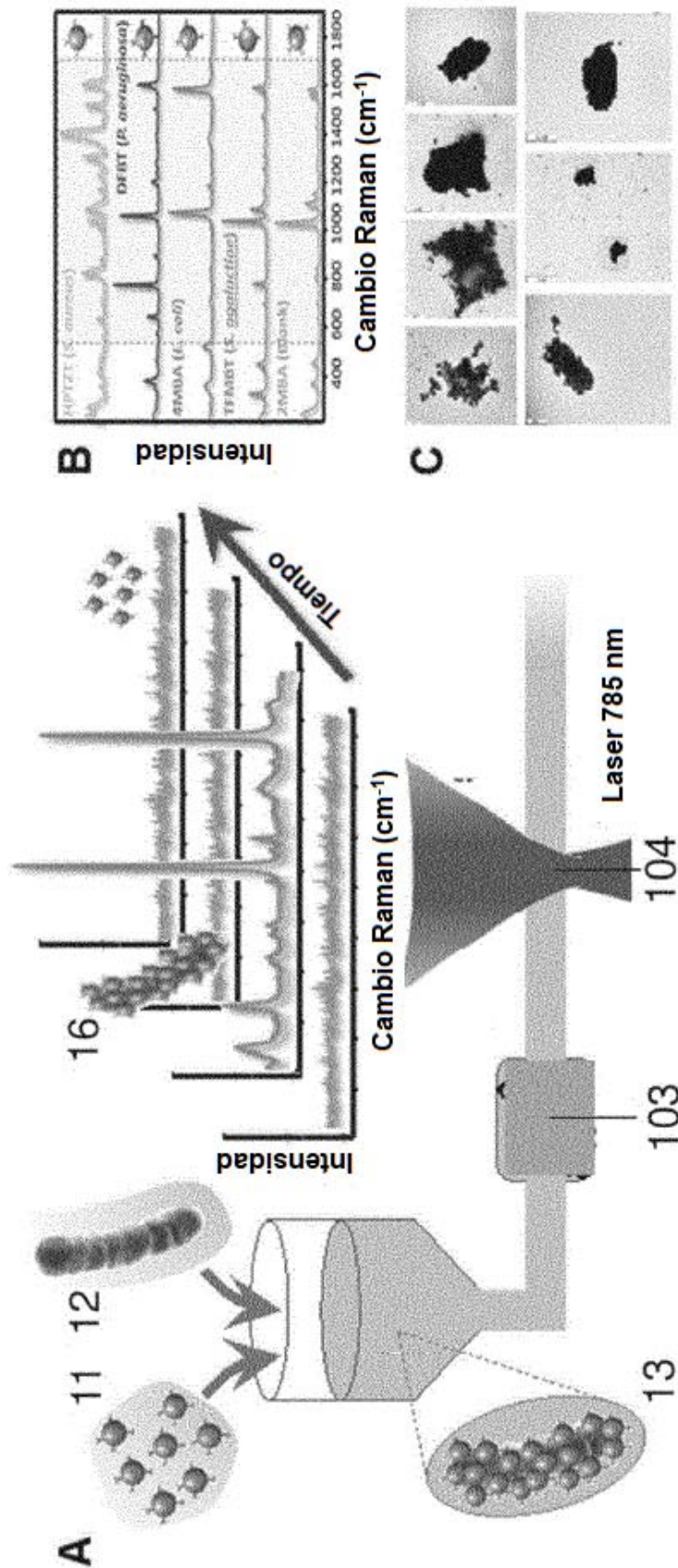


FIG. 1D

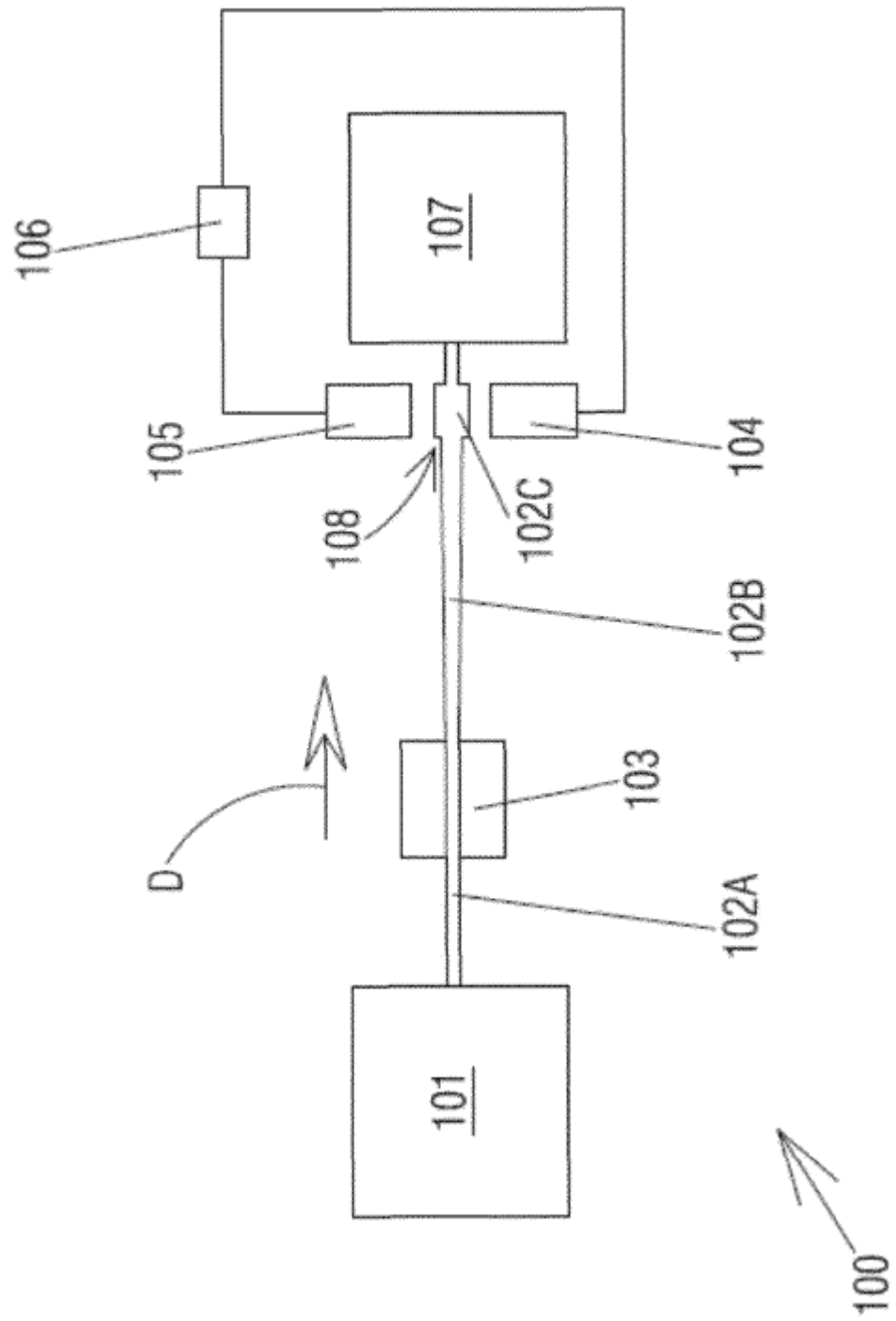
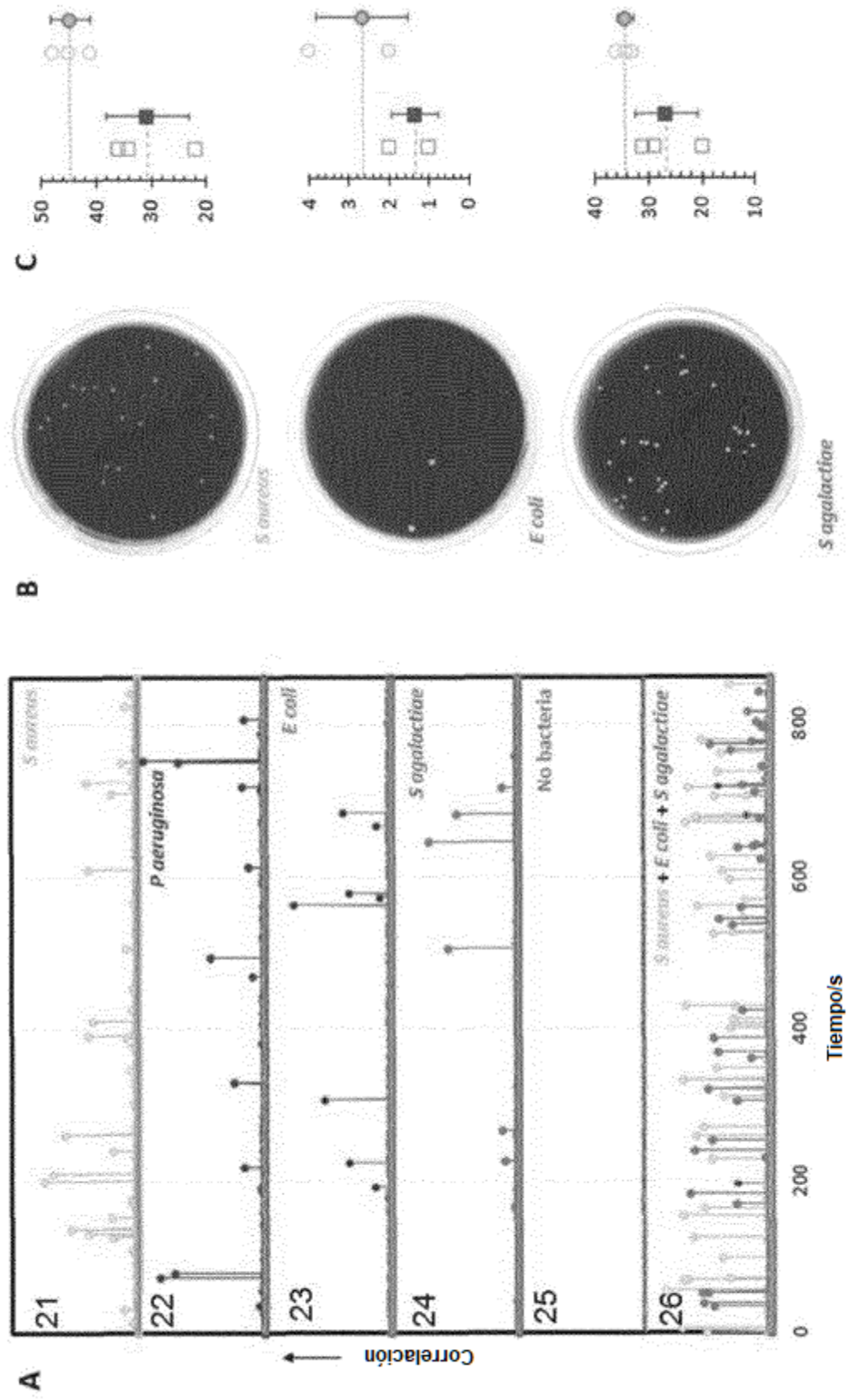


FIG. 2



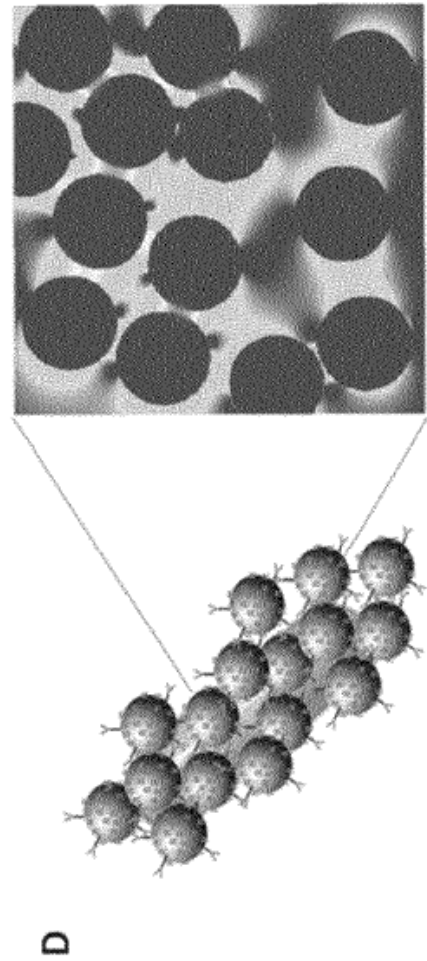
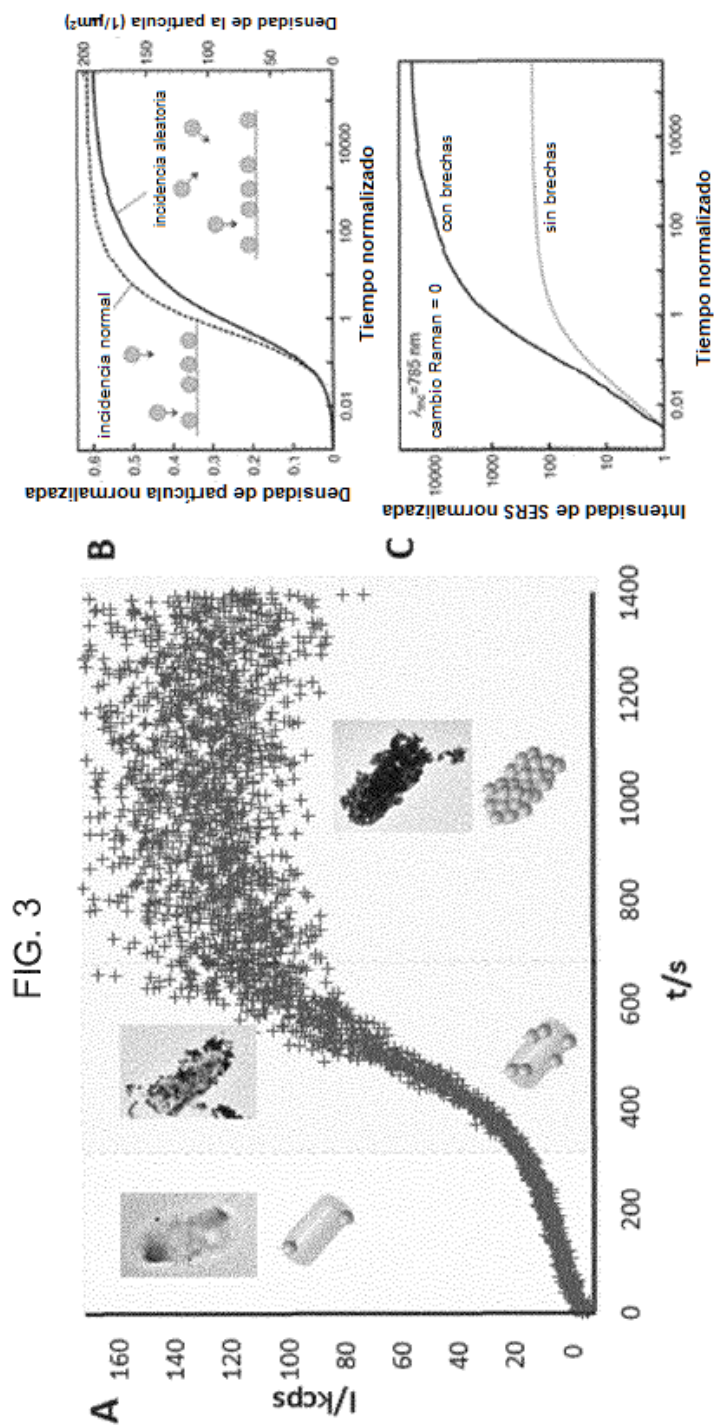


FIG. 4

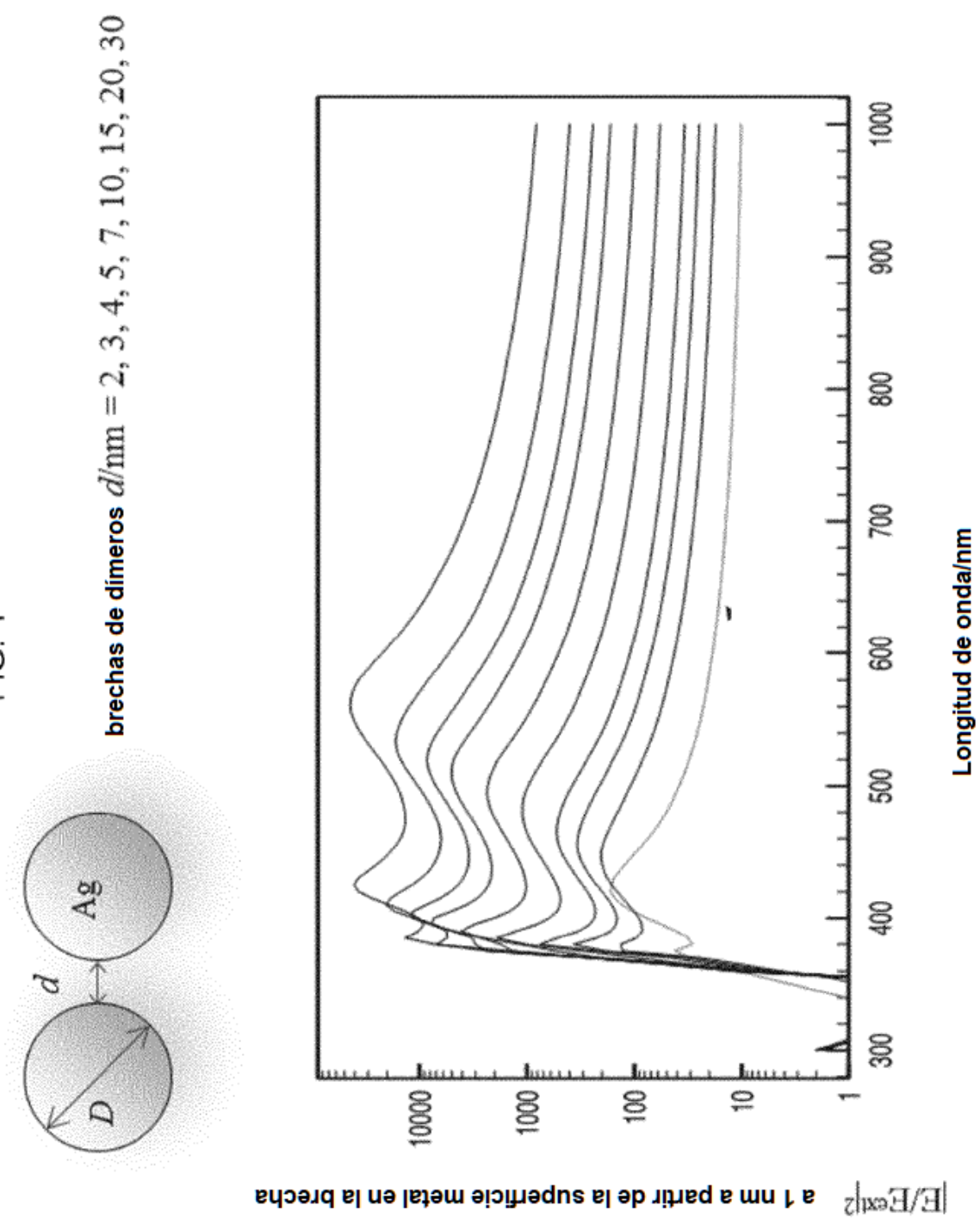


FIG. 5

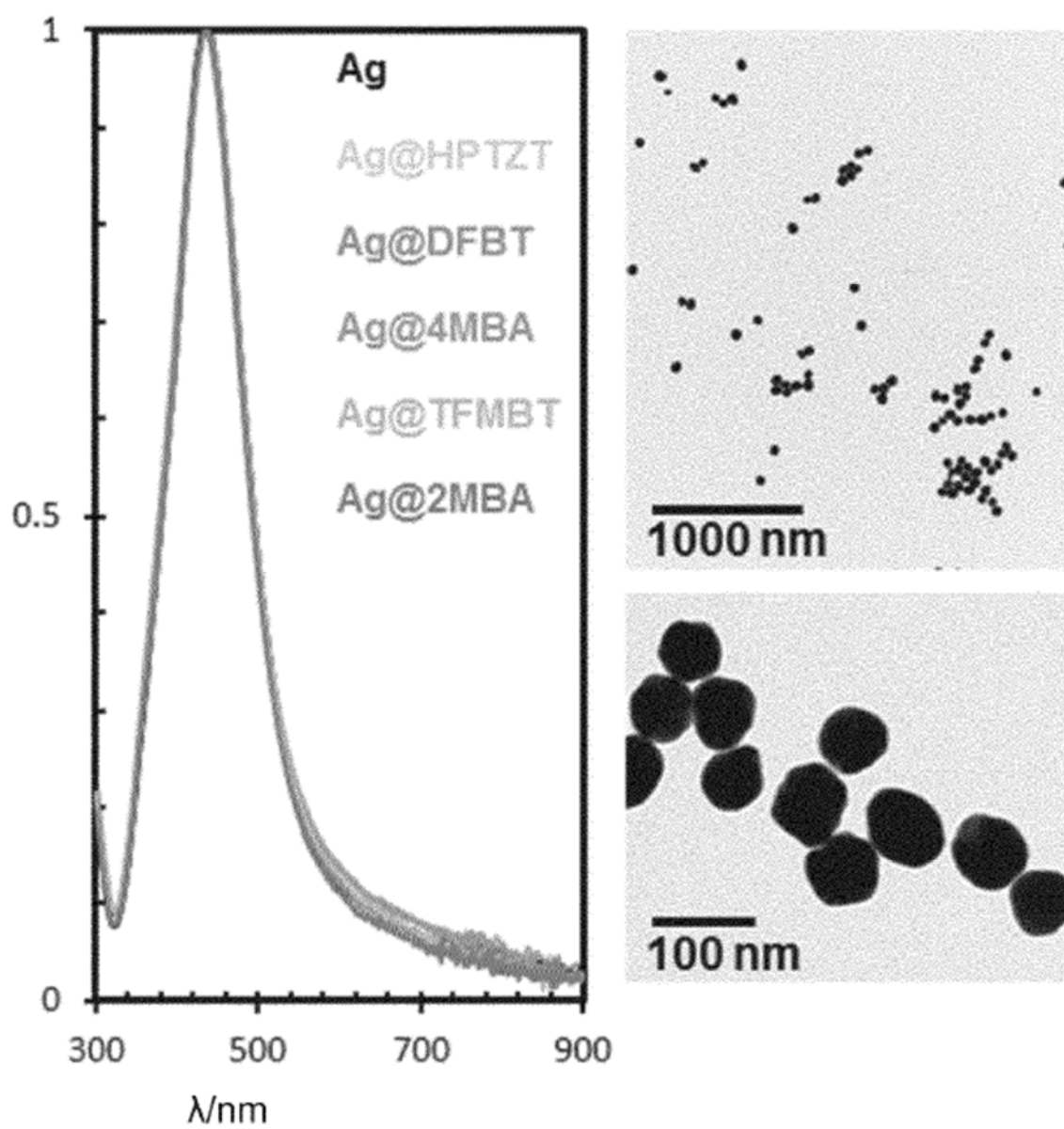


FIG. 6

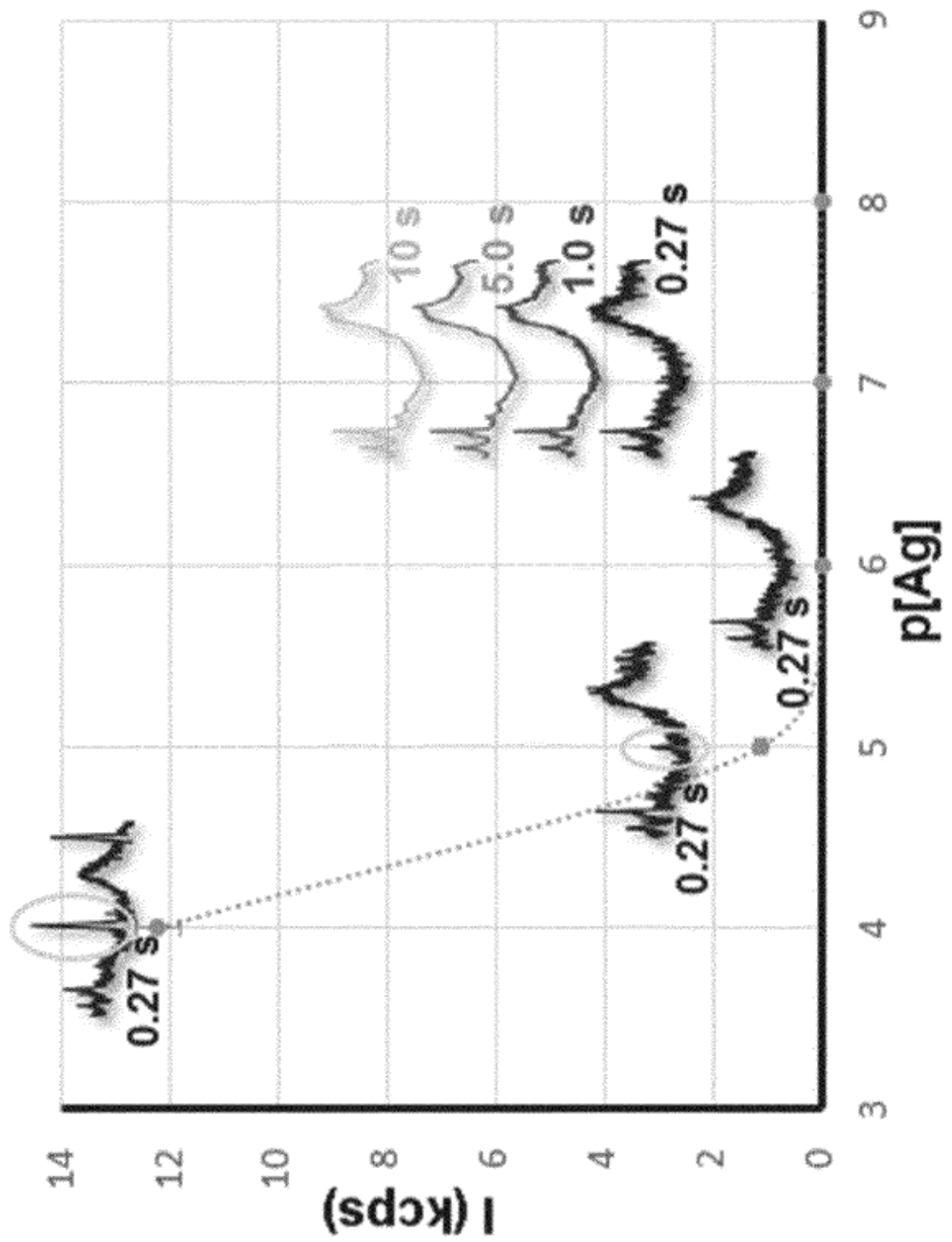
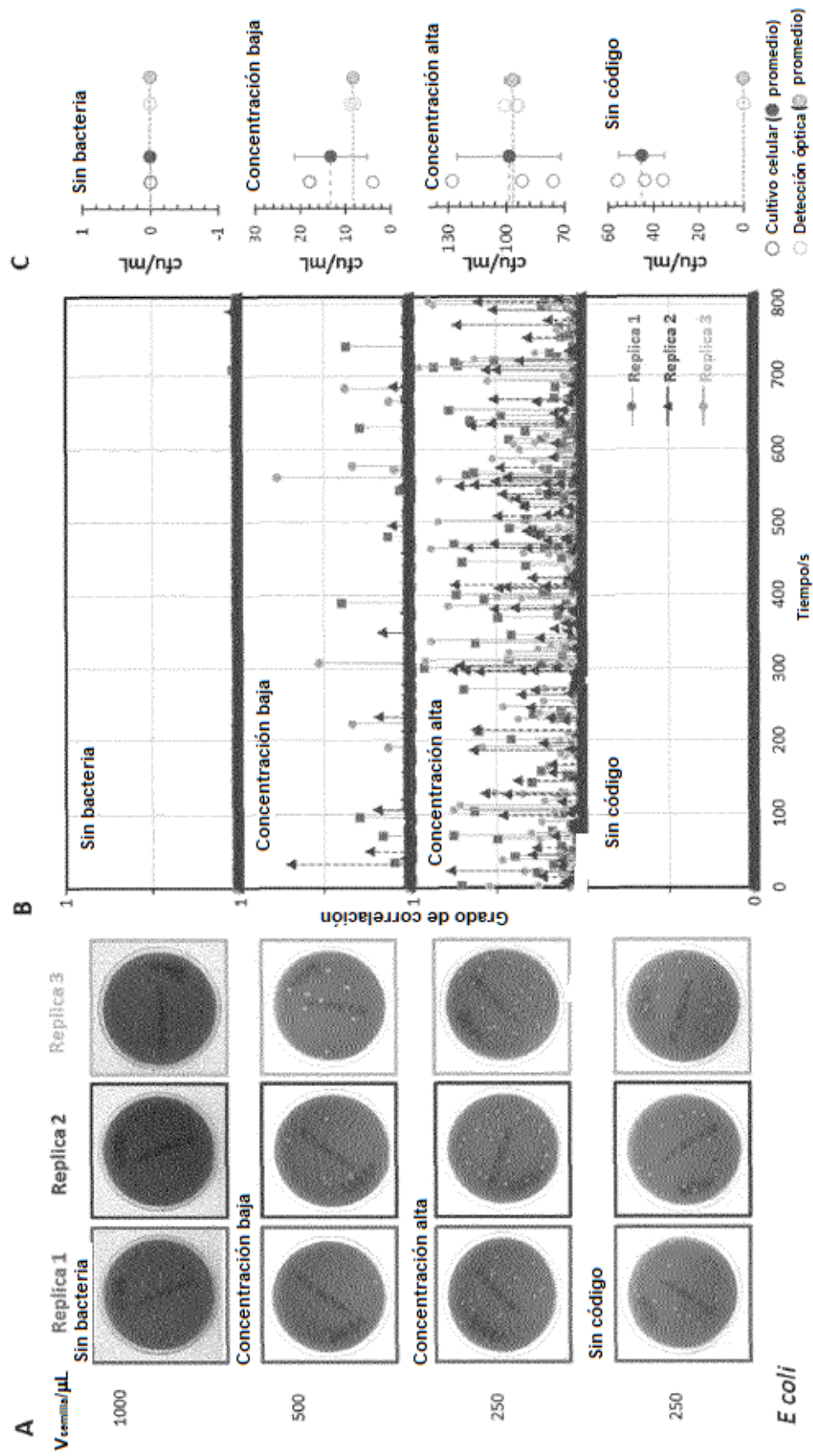


FIG. 7



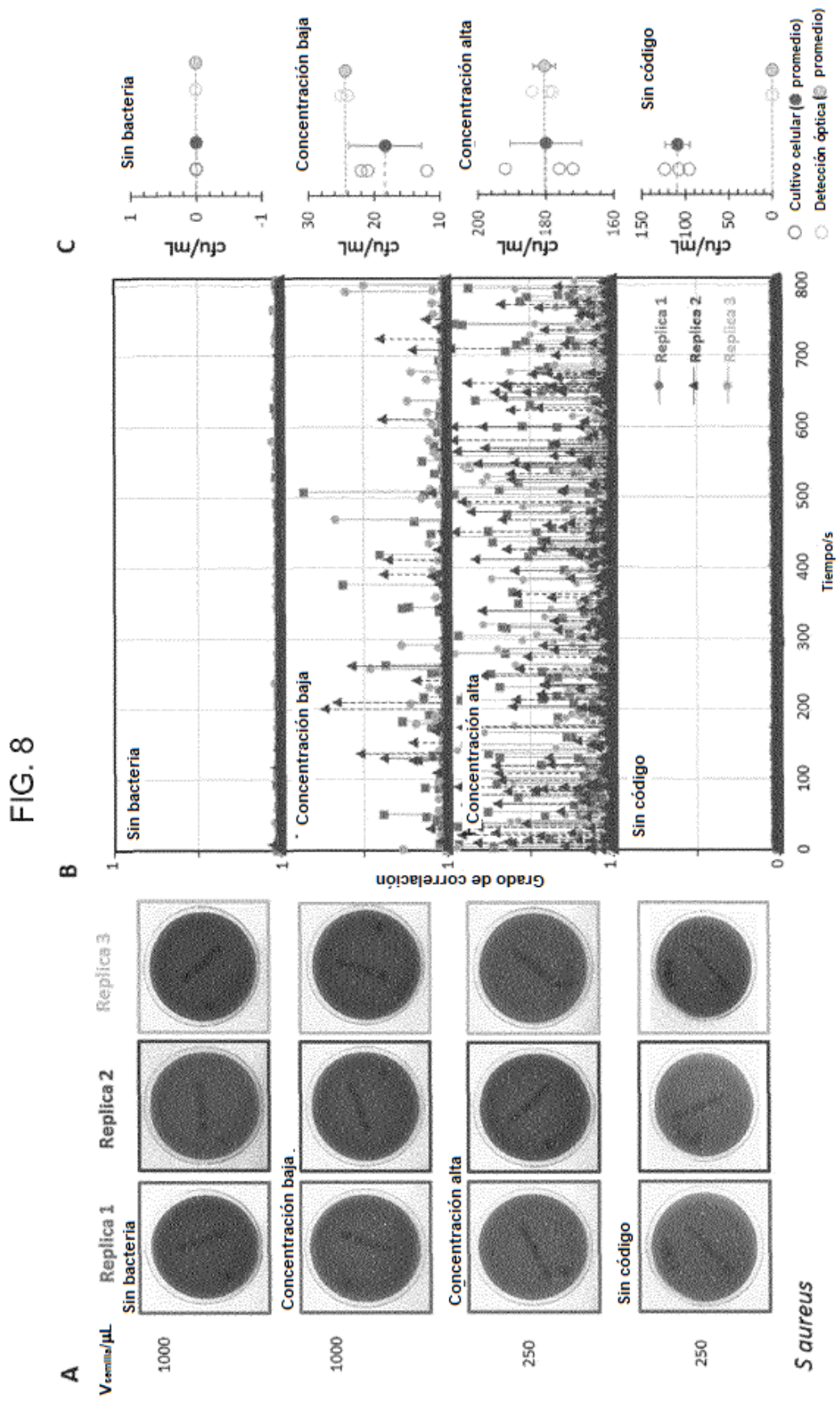


FIG. 9

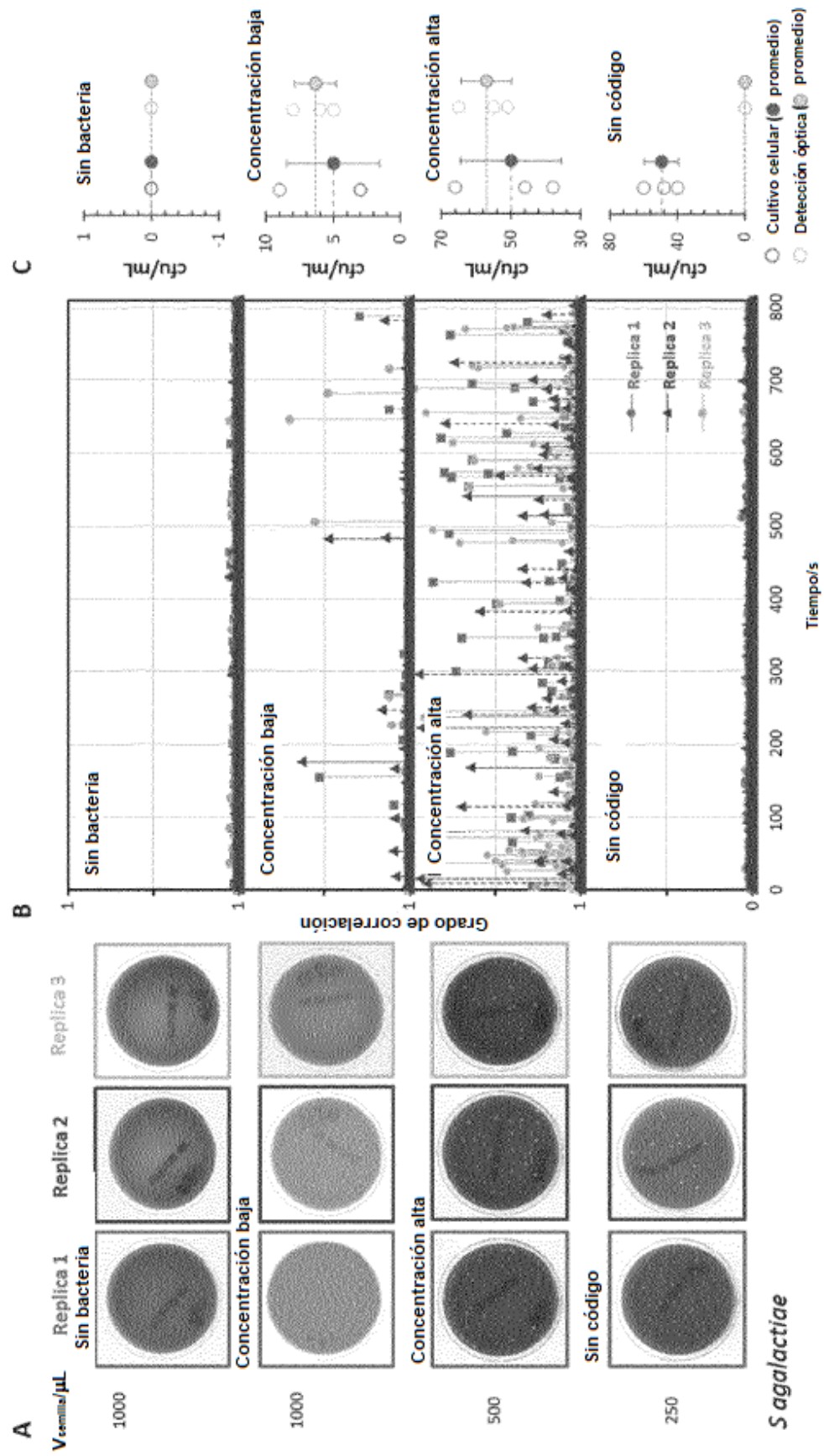


FIG. 10

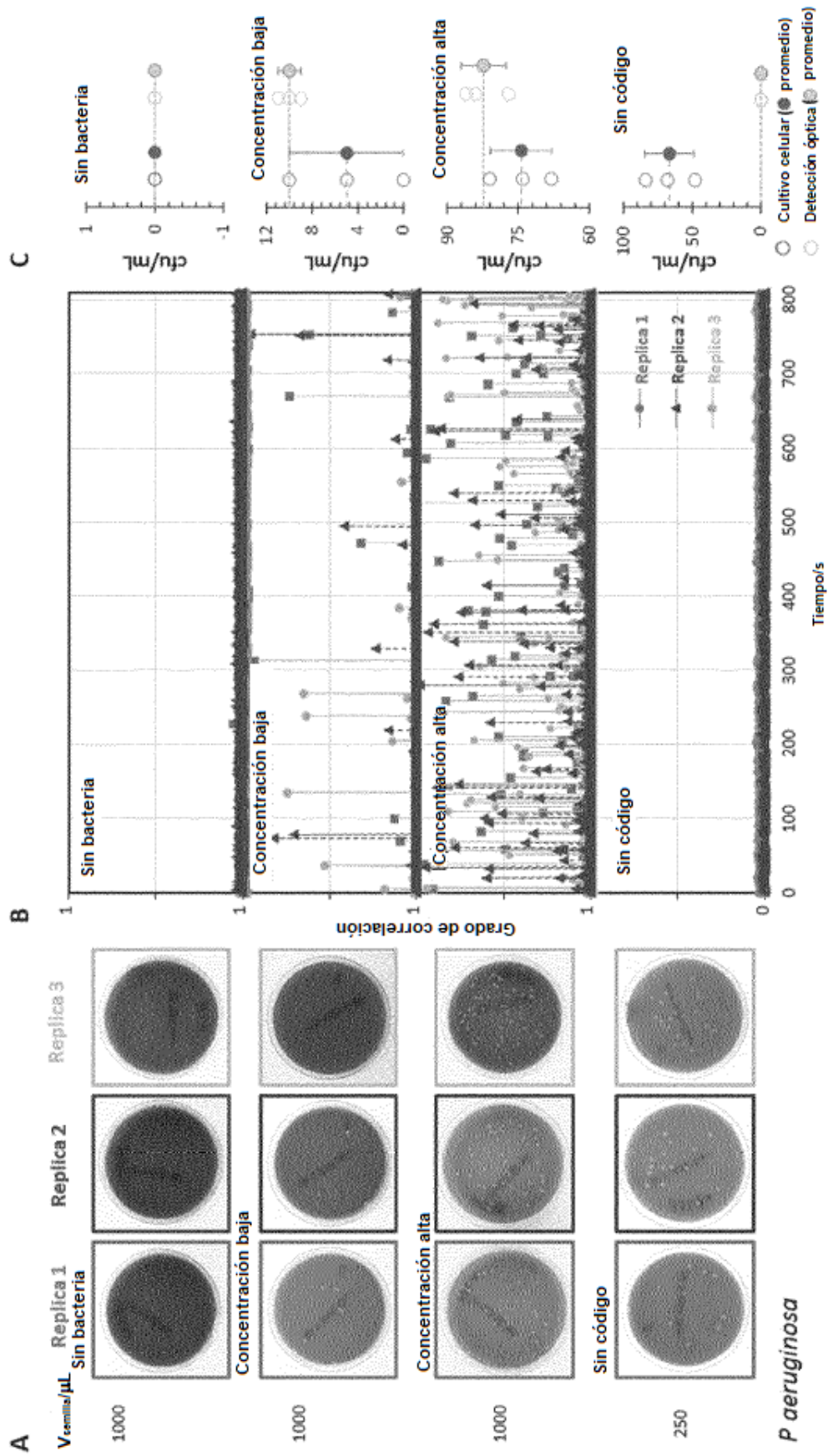


FIG. 11

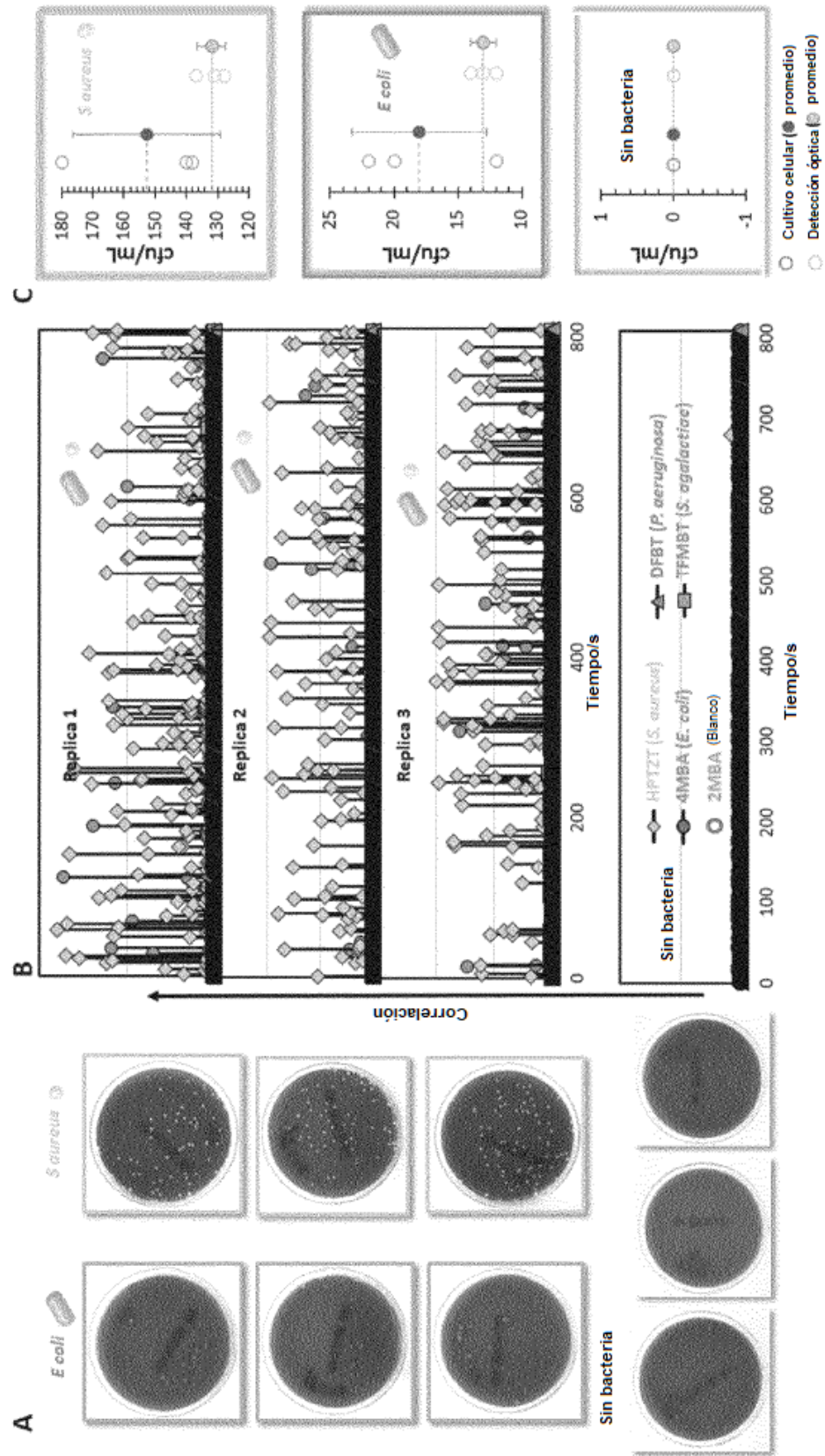


FIG. 12

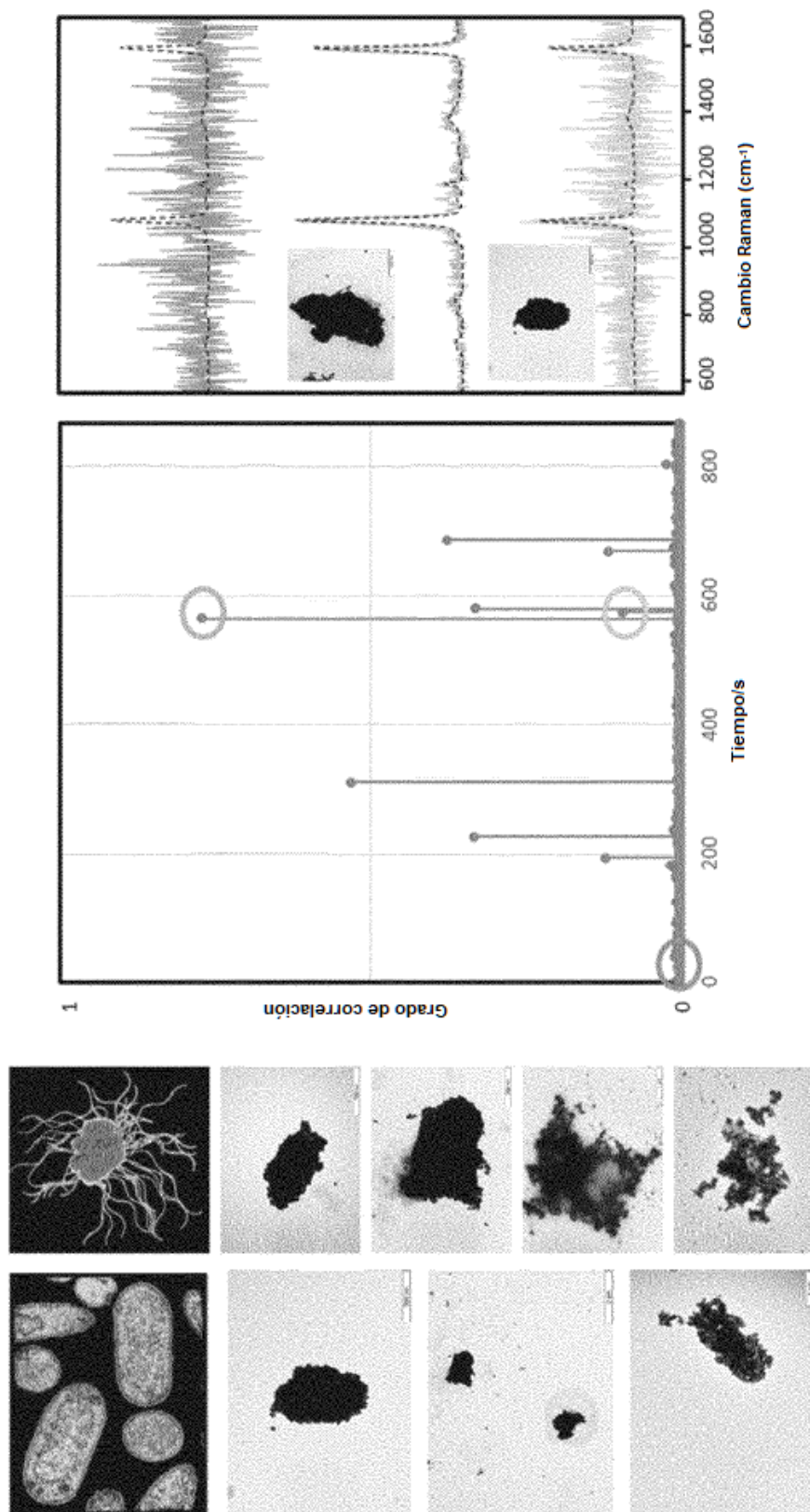


FIG. 13

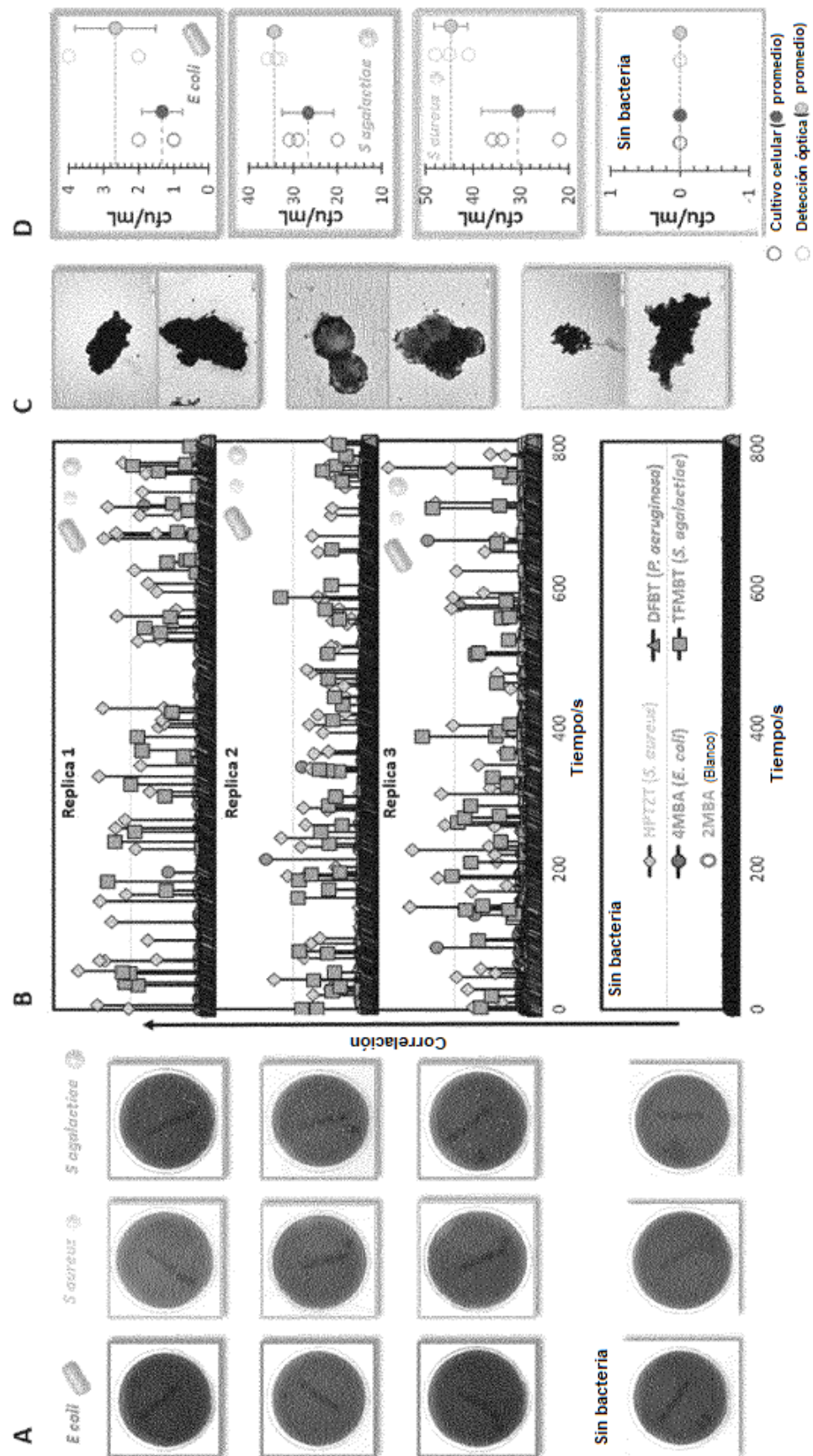


FIG. 14

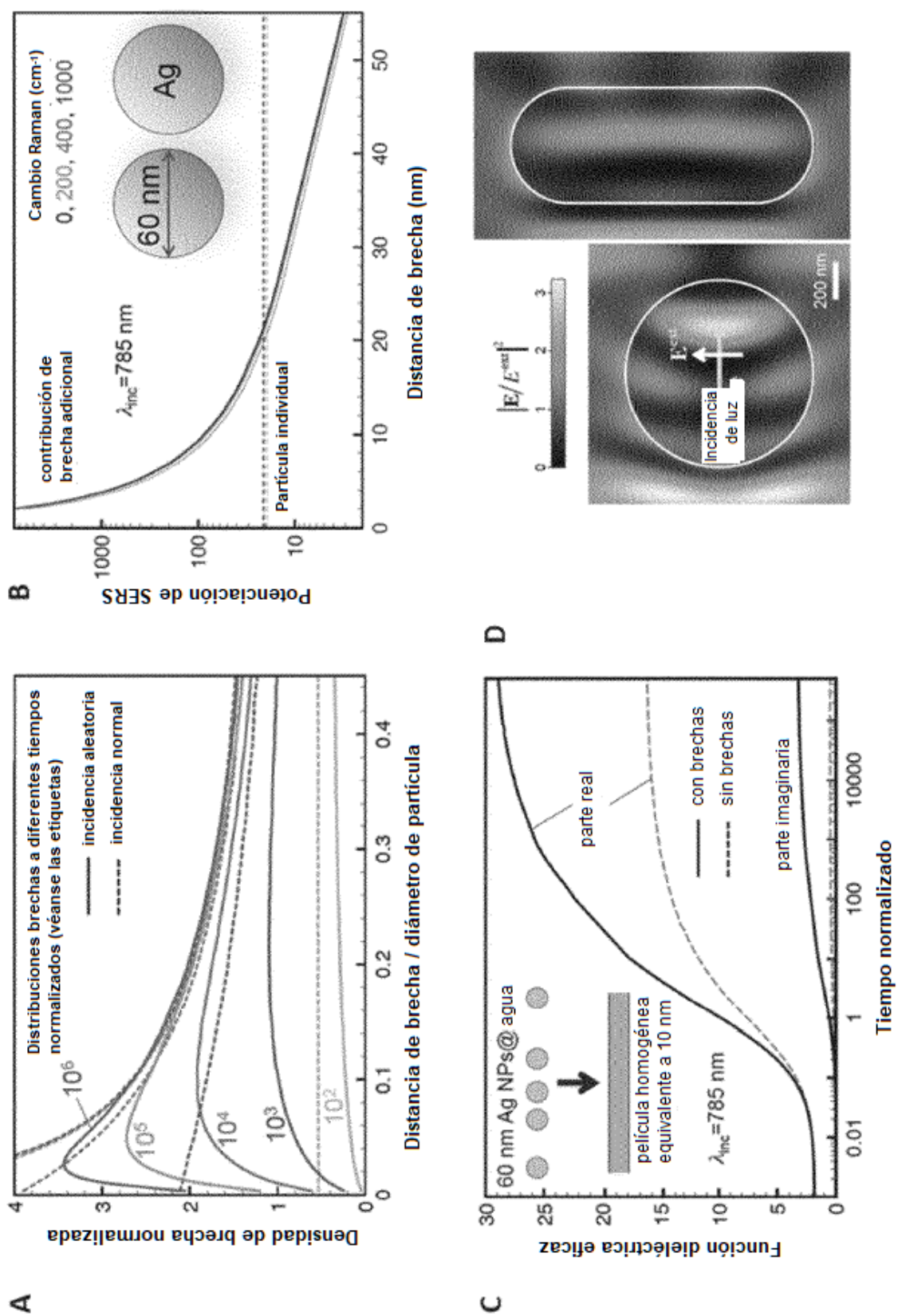


FIG. 15

