



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 045**

51 Int. Cl.:
G01N 21/65 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06816934 .1**
96 Fecha de presentación : **16.10.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1946083**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.07.2008**

54 Título: **Procedimiento de detección de organismos biológicos usando dispersión RAMAN.**

30 Prioridad: **17.10.2005 US 727328 P**
11.08.2006 US 836936 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.10.2011

73 Titular/es: **SWORD DIAGNOSTICS, Inc.**
6502 South Archer Road
Summit-Argo, Illinois 60501, US

72 Inventor/es: **Siegel, Neal, A. y**
Fischell, David, R.

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

Procedimiento de detección de organismos biológicos usando dispersión Raman

5 **[0001]** La presente descripción se refiere en general al campo del equipamiento para el diagnóstico y a procedimientos de ensayo biológicos.

[0002] Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. nº 60/836.936 presentada el 11 de agosto, 2006, y solicitud provisional de EE.UU. nº 60/727.328 presentada el 17 de octubre de 2005.

10 **[0003]** Actualmente hay muchos campos que necesitan sistemas para detectar organismos o componentes biológicos (p. ej., proteínas, ADN u otro material genético). Estos campos incluyen: seguridad alimentaria, diagnósticos médicos, diagnósticos veterinarios, detección de patógenos y seguridad nacional. Los procedimientos actuales incluyen inmunoquímica, biología molecular o técnicas biológicas tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y reacciones en cadena de la ligasa (LCR). Estos procedimientos y técnicas a menudo están limitados en precisión, especificidad y sensibilidad.

15 **[0004]** Por ejemplo, los diagnósticos médicos usan técnicas inmunoquímicas para proporcionar especificidad en la detección de componentes biológicamente activos de una muestra. Se sabe que los anticuerpos desarrollados para compuestos específicos tienen una alta afinidad por estos componentes. Los propios anticuerpos proporcionan detectabilidad limitada y como tales se modifican químicamente con marcadores o etiquetas que sirven para potenciar la detección del anticuerpo durante una reacción con el componente biológico objetivo. De esta forma, las técnicas anteriores pueden identificar un componente biológico. Desgraciadamente, la capacidad para detectar el anticuerpo tiene tendencia a la interferencia de otras cosas en la muestra, incluyendo la matriz de la muestra, los componentes de lavado y otros agentes químicos. Además, las técnicas de detección actuales carecen de sensibilidad a concentraciones o número de anticuerpos bajos (es decir, concentraciones o número bajos de los componentes biológicos objetivo).

20 **[0005]** Las técnicas de dispersión de luz Raman (Espectroscopía Raman) se han usado en el pasado para detectar componentes químicos específicos. La dispersión Raman es una propiedad básica de la interacción de la luz con las moléculas. Cuando la luz impacta con una molécula puede hacer que los átomos de la molécula vibren. Esta vibración cambiará entonces la energía de la luz adicional que impacta con la molécula. Esta luz dispersada adicional tiene características que se pueden medir y son únicas de la estructura de la molécula que ha hecho que vibre. La espectroscopía Raman por sí misma carece de la especificidad y sensibilidad para detectar organismos y componentes biológicos.

25 **[0006]** Se hace referencia a determinados documentos de la técnica anterior. SENGUPTA A y col.: "Bioaerosol characterization by surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)" *J. AEROSOL SCI.; JOURNAL OF AEROSOL SCIENCE; MEASUREMENT AND CHARACTERIZATION OF BIOAEROSOLS*, MAYO/JUNIO 2005, vol. 36, no. 5-6, Mayo 2005 (2005-05), páginas 651-664, describen que las bacterias se pueden detectar usando SERS. Las bacterias se pueden detectar usando SERS sin el uso de un reactivo activo en Raman específico para la bacteria, combinando una bacteria aerosolizada con suspensiones nanocoloidales de plata.

30 El documento US 2003/059820 y MOSIER-BOSS P.A. y col.: "Surface-enhanced Raman spectroscopy substrate composed of chemically modified gold colloid particles immobilized on magnetic microparticles." *ANALYTICAL CHEMISTRY* 15 FEB 2005, vol. 77, no. 4, 15 de febrero 2005 (2005-02-15), páginas 1031-1037, describen determinados compuestos que se pueden usar como marcadores en SERS/Raman.

35 El documento WO 204/007767 describe que las moléculas objetivo se pueden detectar usando perlas de polímero activo en SERRS.

40 XU SHUPING y col.: "Surface-enhanced Raman scattering studies on immunoassay" *J. BIOMED. OPT.; JOURNAL OF BIOMEDICAL OPTICS* MAYO/JUNIO 2005, vol. 10, no. 3, Mayo 2005 (2005-05), páginas 1-12 y DRISKELL JEREMY D y col.: "Low-level detection of viral pathogens by a surface-enhanced Raman scattering based immunoassay." *ANALYTICAL CHEMISTRY* 1 OCT 2005, vol. 77, no. 19, 1 de octubre 2005 (2005-10-01), páginas 6147-6154, proponen que las limitaciones de la espectroscopía Raman en la detección de moléculas biológicas se pueden superar mediante el uso de SERS.

45 GROW ANN E y col.: "New biochip technology for label-free detection of pathogens and their toxins." *JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS* MAYO 2003, vol. 53, no. 2, Mayo 2003 (2003-05), páginas 221-233, sugieren que determinadas bacterias se pueden detectar sin usar un reactivo activo en Raman específico para la bacteria, detectando el espectro Raman característico producido por la bacteria.

[0007] La presente descripción se dirige a un sistema que usa la combinación de espectroscopía Raman y técnicas de marcaje biológico para identificar y cuantificar organismos y componentes biológicos con una sensibilidad y especificidad mayores que en las técnicas anteriores. Específicamente, el uso de la presente descripción para detectar las combinaciones de anticuerpo/componente biológico se puede realizar usando un inmunoensayo seguido de técnicas de detección por dispersión Raman. La presente invención se refiere a los procedimientos como se definen en las reivindicaciones.

[0008] En una realización, la presente invención usa la combinación de espectroscopía Raman y técnicas de marcaje biológico para identificar y cuantificar componentes biológicos, tales como proteínas o péptidos, incluyendo cualquier modificación postraducciona, en conformaciones o condiciones específicas asociadas con la enfermedad: por ejemplo, proteínas priones.

[0009] El inmunoensayo para determinadas realizaciones de la presente invención implica primero tener un anticuerpo unido a una superficie sólida que se une al componente biológico objetivo. Los componentes no unidos de la muestra de ensayo después se arrastran por lavado dejando solo las combinaciones unidas de componente biológico/anticuerpo. En este punto la combinación de componente biológico/anticuerpo combinada se puede detectar por dispersión Raman de luz ultravioleta.

[0010] Para aumentar la sensibilidad se contempla una etapa adicional, en la que después se introducen uno o más reaccionantes nuevos y quedan unidos a la combinación de componente biológico/anticuerpo. La combinación del o de los nuevos reaccionantes con la combinación de componente biológico/anticuerpo ahora se puede detectar usando dispersión de luz Raman. Los ejemplos de dichos reaccionantes incluyen, pero sin limitar:

1. anticuerpos marcados con moléculas activas en Raman;
2. conjugados de enzima/anticuerpo combinados con reaccionantes químicos adicionales que reaccionan para formar moléculas activas en Raman;
3. reaccionantes activos en Raman que interaccionan químicamente con el componente biológico; y
4. reaccionantes químicos que se convierten por el componente biológico en una molécula activa en Raman.

[0011] También se contempla que en lugar de empezar con una combinación de componente biológico/anticuerpo como en los ejemplos 1 y 2 anteriores, los procedimientos de detección Raman pueden usar productos químicos que interaccionan con el componente biológico sin el anticuerpo como se describe en los ejemplos 3 y 4 anteriores.

[0012] También se contempla que se pueden usar parejas de unión específicas para el componente biológico objetivo distintas de los anticuerpos, por ejemplo, un receptor biológico (una proteína).

[0013] Aunque las técnicas descritas en el presente documento están asociadas con la detección de organismos y componentes biológicos, se contemplan técnicas similares para la detección de componentes inorgánicos, componentes orgánicos, contaminantes o toxinas en una muestra. La potenciación adicional de las técnicas de detección descritas implica la elección de reaccionantes que presentan dispersión de luz de resonancia Raman. En otras palabras, hay frecuencias con más intensidad en la luz dispersada que es específica de la estructura del reaccionante. El fenómeno de resonancia en todas las realizaciones de la presente invención está relacionado solamente con la estructura química e interacción, y no con ninguna interacción con una superficie sólida, como se encuentra en la técnica conocida como Dispersión de resonancia Raman amplificada por superficie (SERRS) que es un procedimiento más complejo y menos deseable.

[0014] También se contempla que las realizaciones de la presente descripción se pueden implementar en un circuito integrado de canales (o pocillos) microfluidos usando tecnología de micro o nanofabricación en la que la pareja de unión se inmoviliza en uno o más canales microfluidos en un circuito integrado adaptado que también incluiría el o los láseres y detectores para la espectroscopía Raman. Dicha implementación podría detectar componentes biológicos individuales como bacterias patológicas, proteínas o material genético.

[0015] Por lo tanto, un objeto de la presente descripción es tener un procedimiento para detectar organismos o componentes biológicos objetivo, que use una combinación de interacciones químicas, incluyendo la unión, con una etapa final de dispersión de luz Raman.

[0016] Otro objeto de la presente descripción es tener un procedimiento para detectar componentes

orgánicos o inorgánicos objetivo, que use una combinación de interacciones químicas incluyendo la unión con una etapa final de dispersión de luz Raman.

[0017] Otra descripción es combinar un inmunoensayo con detección usando dispersión de luz Raman.

[0018] Todavía otro objeto de la presente descripción es aumentar la sensibilidad de la detección usando reaccionantes químicos que produzcan dispersión de luz Raman resonante.

[0019] Otra descripción más es tener un diseño de circuito integrado con canales o pocillos microfluidos que puedan realizar la combinación de mediciones de unión y de dispersión de luz Raman.

[0020] Estos y otros objetivos y ventajas de la presente descripción serán evidentes para una persona experta en la materia tras leer la descripción detallada de esta invención, incluyendo los dibujos asociados.

Breve descripción de los dibujos

[0021] La figura 1 es un diagrama de flujo de una técnica de inmunoensayo (ELISA) típica de la técnica anterior para la detección de organismos o componentes biológicos.

[0022] La figura 2 es un diagrama de una realización del aparato descrito.

[0023] La figura 3 es un diagrama de flujo de una realización de la técnica descrita para detectar organismos y/o componentes biológicos.

[0024] La figura 4 es un diagrama de bloques del sistema enzimático para convertir componentes químicos en un compuesto activo en Raman.

[0025] La figura 5 es un diagrama de flujo de una técnica para elegir frecuencias de luz láser para excitar moléculas objetivo específicas.

[0026] La figura 6 es una ilustración de un canal microfluído diseñado para detectar compuestos activos en Raman.

[0027] La figura 7 es una ilustración de una matriz de canales microfluidos que puede incorporarse en un circuito integrado adaptado.

[0028] La figura 8 representa gráficamente el espectro Raman de un inmunoensayo ligado a enzima para una bacteria patógeno, *Listeria*, usando un anticuerpo unido a peroxidasa y con los números de desplazamiento (cm^{-1}) representados en el eje de abscisa y las magnitudes de las señales representadas en el eje de ordenadas (unidades arbitrarias) para una muestra que contiene *Listeria* (a) y una muestra que no contiene *Listeria* (b).

Descripción detallada de los dibujos

[0029] La figura 1 es un diagrama de flujo de una técnica de inmunoensayo 10 (ELISA) típica de la técnica anterior para detectar organismos o componentes biológicos. El procedimiento empieza por la etapa 11 de preparar la muestra líquida que incluye el componente biológico objetivo. Por ejemplo, la muestra se puede preparar por enriquecimiento previo en un medio de crecimiento tal como caldo Frasier semiconcentrado u otro medio de crecimiento microbiano adecuado. Alternativamente, se puede obtener una muestra líquida para ensayar de cualquier fuente líquida. El material sólido se puede sumergir en una disolución líquida adecuada y poner en disolución los potenciales organismos o moléculas objetivo y después tomar una muestra del líquido. En la siguiente etapa, 12, la muestra líquida preparada se combina (o mezcla) con una pareja de unión que se ha unido a una superficie sólida. Las parejas de unión típicas incluyen anticuerpos, bacteriófagos y proteínas de bacteriófagos. Por ejemplo, se pueden usar placas de microvaloración de plástico, perlas de látex o micropartículas magnéticas. También se pueden usar otros soportes sólidos tales como nitrocelulosa, papel de filtro, nailon y otros plásticos. Después, la combinación de anticuerpo/componente biológico se incuba en la etapa 13, para dejar tiempo para que el componente biológico y el anticuerpo se unan entre sí. Una vez que esto ha ocurrido, la pareja de unión/componente biológico combinados se decanta (se separa vertiendo) y se lava para separar los componentes biológicos no unidos y otros materiales no deseados. En la etapa 15 se añaden nuevos reaccionantes para potenciar la sensibilidad de la mezcla para detectar las moléculas señal usando diferentes procedimientos. Los ejemplos de dichos reaccionantes incluyen:

1. parejas de unión marcadas con moléculas radiactivas;

2. parejas de unión marcadas con moléculas fluorescentes;

5 3. conjugados de enzima/pareja de unión combinados con reaccionantes químicos adicionales que reaccionan para formar moléculas que absorben luz;

4. conjugados de enzima/pareja de unión combinados con reaccionantes químicos adicionales que reaccionan para formar moléculas que producen luz; y

10 5. conjugados de enzima/pareja de unión combinados con reaccionantes químicos adicionales que reaccionan para formar moléculas que reflejan luz.

15 **[0030]** La mezcla que contiene la pareja de unión/componente biológico unidos y los nuevos reaccionantes se incuba en la etapa 13 para dejar tiempo para que se produzca la reacción. En este momento, en muchos casos la parte de la reacción del procedimiento 10 se ha completado y se puede llevar a cabo la etapa 16 de medir las moléculas producidas o incluidas en las etapas 11 a 15 inclusive. Si se requieren reaccionantes adicionales, las etapas 14, 15 y 13 se pueden repetir una o más veces de forma sucesiva hasta que estén presentes las moléculas señal adecuadas.

20 **[0031]** La medición de la o las moléculas señal proporciona un resultado cuantitativo que después se puede analizar y comparar en la etapa 17 con un conjunto conocido de respuestas calibradas de concentraciones conocidas del componente biológico objetivo. Esta comparación lleva a la etapa 18 que es el resultado cuantificado e informe asociado de la concentración del componente biológico objetivo en la muestra preparada en la etapa 11.

25 **[0032]** Aunque las descripciones del procedimiento 10 de la figura 1 se han asociado con la detección de un organismo o componente biológico, el procedimiento 10 también se puede aplicar a la detección de muchos tipos de moléculas con las que pueden reaccionar anticuerpos y otras parejas de unión.

30 **[0033]** La figura 2 es un diagrama de una realización del subsistema de detección 20 de la presente invención. Un láser 21 produce un haz de láser 22 que es enfocado mediante la óptica de enfoque 23 en un haz de láser enfocado 24 que impacta la muestra objetivo 25. La luz retrodispersada 26 procedente de la muestra 25 es enfocada en el haz 28 mediante la óptica de enfoque 27. El haz 28 se dirige al espectrómetro 30 con el detector 31. La salida del detector 31 es la señal 32 que es recibida por el ordenador personal 40 para el análisis, almacenamiento y/o impresión con la impresora 42. El láser 21 típicamente es un láser de longitud de onda continua (CW) con salida en la región visible. Por ejemplo, un láser de argón ionizado, láser de helio-neón, láser de colorante sintonizable bombeado por láser de argón ionizado, o un láser de diodo en la frecuencia del verde, rojo u otra. Las ópticas de enfoque 23 y 27 incluyen espejos, lentes, iris, obturadores, rejillas de difracción y/o polarizadores. La muestra objetivo 25 puede ser líquida, gaseosa o sólida y en algunas realizaciones de la presente invención, la muestra objetivo usará un líquido o sólido precipitado. El espectrómetro 30 separa espacialmente la luz dispersada basándose en la longitud de onda. Un ejemplo de un espectrómetro que se puede usar para la presente invención es el Lambda Solutions modelos PS-1. El detector 31 mide la amplitud de la luz separada espacialmente por el espectrómetro 30 y la convierte en una señal eléctrica (analógica o digital). En algunas realizaciones, el detector proporcionará la señal eléctrica usando una interfase de ordenador estandarizada tal como RS-232, USB, paralelo, IEEE 1394. Un ejemplo de un detector 30 que se puede usar para la presente invención es un Lambda Solutions PS-1. El ordenador personal 40 puede ser cualquier PC de sobremesa o portátil con una interfase adecuada para el detector 31 y software diseñado para analizar, almacenar y/o imprimir el espectro de la luz retrodispersada 26 recibida por el espectrómetro 30.

50 **[0034]** La figura 3 es un diagrama de flujo de una realización de la técnica 30 de la presente invención para detectar organismos y/o componentes biológicos. El procedimiento empieza por la etapa 31 de preparación de la muestra líquida que incluye el componente biológico objetivo. Por ejemplo, la muestra se puede preparar por enriquecimiento previo en un medio de crecimiento, tal como caldo de Frasier semiconcentrado u otro medio de crecimiento microbiano adecuado. Alternativamente, se puede obtener una muestra líquida para ensayar de cualquier fuente líquida. El material sólido se puede sumergir en una disolución líquida adecuada y poner los potenciales organismos o moléculas objetivo en disolución y después tomar la muestra del líquido. En la siguiente etapa 32, la muestra líquida preparada se combina (o se mezcla) con un anticuerpo que se ha unido a una superficie sólida. Por ejemplo, se pueden usar placas de microvaloración de plástico, perlas de látex o micropartículas magnéticas. La combinación de anticuerpo/componente biológico después se incuba en la etapa 33 para dejar tiempo para que el componente biológico y el anticuerpo se unan entre sí. Una vez que esto ha ocurrido el anticuerpo/componente biológico combinados se decantan (se separan vertiendo) y se lavan para separar los componentes biológicos no unidos y otros materiales no deseados. En la etapa 35 se añaden nuevos reaccionantes para potenciar la sensibilidad de la mezcla para la detección por dispersión de luz Raman. Los ejemplos de dichos

reaccionantes incluyen:

1. anticuerpos marcados con moléculas activas en Raman;

5 2. conjugados de enzima/anticuerpo combinados con reaccionantes químicos adicionales que reaccionan para formar moléculas activas en Raman;

3. reaccionantes activos en Raman que interaccionan químicamente con el componente biológico; y

10 4. reaccionantes químicos que por el componente biológico se convierten en una molécula activa en Raman.

[0035] La mezcla que contiene el anticuerpo/componente biológico unidos y los nuevos reaccionantes se incuban en la etapa 33 para dejar tiempo para que se produzca la reacción. En este punto en muchos casos, la parte de la reacción del procedimiento 30 se ha completado y se puede llevar a cabo la etapa 36 de medición de la dispersión de luz Raman de las moléculas activas en Raman producidas en las etapas 31 a 35 inclusive. Si se requieren reaccionantes adicionales, las etapas 34, 35 y 33 se pueden repetir una o más veces de forma sucesiva hasta que estén presentes las moléculas activas en Raman adecuadas.

[0036] La medición de la dispersión de luz Raman es un espectro que después se puede analizar y comparar en la etapa 37 con un conjunto conocido de respuestas calibradas de concentraciones conocidas del componente biológico objetivo. Esta comparación lleva a la etapa 38 que es el resultado cuantificado e informe asociado de la concentración del componente biológico objetivo en la muestra preparada en la etapa 31.

[0037] Por ejemplo, se puede medir *Listeria* en un formato ELISA. Se añaden 100 microlitros de diferentes concentraciones de bacterias; se añaden 100.000, 50.000, 25.000, 12.500, 6.250 y 0 unidades formadoras de colonia (ufc) por mililitro a los micropocillos recubiertos con anticuerpos dirigidos contra *Listeria*. Después de un periodo de incubación entre 30 y 60 minutos a 37°C, los pocillos se decantan y se lavan con una disolución de detergente suave 3 veces. Se añaden 100 µl de anticuerpos dirigidos contra *Listeria* conjugados con peroxidasa al pocillo y se incuban durante 1 a 4 horas a 37°C. Los pocillos se decantan y se lavan con una disolución de detergente suave 3 veces. Se añade una mezcla de alcohol 4-hidroxibencílico (80,6 mM), 4-aminoantipireno (24 mM), urea-peróxido de hidrógeno (10,6 mM) en tampón de MES 125 mM (pH 6,0) y se deja que se desarrolle el color durante 30-60 minutos. Los espectros Raman de color desarrollado de cada pocillo se revelan y se cuantifican las respuestas.

[0038] Aunque las descripciones del procedimiento 30 de la figura 3 se han asociado con la detección de un organismo o componente biológico, el procedimiento 30 también se puede aplicar a la detección de moléculas orgánicas o inorgánicas, contaminantes o toxinas.

[0039] La figura 4 es un diagrama de bloques para un sistema de conversión químico 40 que usa una enzima para convertir componentes químicos en un compuesto activo en Raman. Por ejemplo, uno o más reaccionantes designados 41, 42 y 43, se mezclan con un catalizador biológico 44. El catalizador biológico 44 puede ser una enzima específica para metabolizar los reaccionantes proporcionados o estructuras de ARN diseñadas para interaccionar con uno o más de los reaccionantes 41, 42 y 43. En la reacción 45 se produce una conversión o combinación de los reaccionantes y se forma un producto medible 46. Por ejemplo, los reaccionantes y la enzima mostrados a continuación se mezclan entre sí.

- Reaccionante A, (41)	4-cloro-1-naftol
- Reaccionante B, (42)	4-aminoantipireno
- Reaccionante C, (43)	urea-peróxido de hidrógeno
- Enzima, (44)	peroxidasa de rábano picante

[0040] Cuando se mezclen entre sí, estos componentes darán un compuesto de iminoquinona que se puede detectar usando espectroscopía Raman u otras técnicas ópticas. El reaccionante 1 también puede ser fenol, alcohol 2-hidroxibencílico, ácido 4,5-dihidroxi-naftaleno-2,7-disulfónico u otros compuestos similares. El reaccionante 3 puede ser otros compuestos donadores de electrones, más en especial peróxido de hidrógeno.

[0041] El producto de la reacción 45 se puede usar como una molécula indicadora cuantitativa o cualitativa para la reacción, y como tal se puede usar como una sonda para la presencia de objetivos biológicos específicos si se combina, por ejemplo, con anticuerpos específicos o parejas de unión biológicas o químicas.

[0042] La figura 5 es un diagrama de flujo de la técnica 50, para elegir una o más frecuencias de luz láser para excitar moléculas objetivo específicas para la detección por resonancia Raman. Un producto activo en Raman

51, tal como el producto 46 producido por la reacción 45 de la figura 4, es un compuesto químico que tiene una estructura que es activa en Raman. El espectro de absorbancia del producto 51 se mide en la etapa 52 usando una técnica tal como la espectrofotometría de absorbancia o transmitancia. En la etapa 53, se identifican una o más longitudes de onda a las que absorbe luz el producto 51, como se ve en el espectro medido en la etapa 52.

5 Después, en la etapa 54, se selecciona un láser que emite luz a una longitud de onda correspondiente a una o más longitudes de onda inidentificadas en la etapa 53. Dichas longitudes de onda del láser pueden estar en la región visible, región ultravioleta o región infrarroja. Por ejemplo, para la reacción de detección 30 de *Listeria* descrita en la figura 3, la longitud de onda del láser seleccionada es 532 nm.

10 **[0043]** Finalmente, en la etapa 55 el láser elegido en la etapa 54 se usa para irradiar el producto activo en Raman creado en la etapa 51. Esto confirmará que hay una dispersión Raman significativa del producto activo en Raman creado en la etapa 51 para proporcionar la señal adecuada para la detección.

15 **[0044]** La figura 6 es una ilustración de un canal microfluído 60 diseñado para detectar compuestos activos en Raman. Una muestra fuente 61 líquida (o gaseosa) que incluye los organismos o componentes biológicos objetivo fluye a través del canal 62. Los organismos o componentes biológicos objetivo reaccionarán y se unirán al o a los reaccionantes unidos a la superficie activa 64. La luz 68 del láser 65 produce luz dispersada Raman 69 que es detectada por el fotodetector 66. El fotodetector está diseñado para medir una o más longitudes de onda específicas que corresponden al espectro Raman del o de los reaccionantes y el organismo o componente biológico combinados. También se contempla que en lugar de unir el organismo o componente biológico a la superficie 64, el o los reaccionantes se pueden liberar de la superficie 64 y el láser de dispersión Raman 65 y el detector 66 se pueden situar corriente abajo de la superficie 64.

25 **[0045]** La figura 7 es una ilustración de una matriz de canales microfluidos 70 diseñada para detectar compuestos activos en Raman. Una o más muestras fuente líquidas (o gaseosas) 71A, 71B a 71N que incluyen los organismos o componentes biológicos objetivo fluyen por los canales 72A, 72B a 72N. Los organismos o componentes biológicos objetivo reaccionarán y se unirán al o a los reaccionantes unidos a las superficies activas 74A, 74B a 74N. La luz 78A a 78N de los láseres 75A a 75N produce la luz dispersada Raman 79A a 79N que es detectada por los fotodetectores 76A a 76N. Los fotodetectores 76A a 76N se diseñan para medir una o más longitudes de onda específicas que corresponden al espectro Raman del o de los reaccionantes y organismos o componentes biológicos combinados unidos a las superficies 74A a 74N.

35 **[0046]** El número de canales microfluidos en la matriz de canales microfluidos limitado por el límite superior N, está en el intervalo de 2 a 100.000. También se contempla que se puede usar una gran variedad de reaccionantes y longitudes de onda láser diferentes en diferentes canales. Esto permitiría la detección de múltiples longitudes de onda de dispersión del mismo organismo o componente biológico o permitiría la detección simultánea de múltiples organismos y componentes biológicos diferentes. Finalmente, en lugar de una matriz de canales microfluidos 70, se contempla que se podría usar una matriz de pocillos microfluidos para producir una matriz bidimensional de detectores de dispersión Raman.

40 **[0047]** La figura 8 representa un espectro Raman que resulta del inmunoensayo ligado a enzima para la bacteria patógena *Listeria* usando el producto químico de dos componentes BASH-UP, un anticuerpo ligado a enzima y el procedimiento de detección Raman descrito a continuación usando los siguientes reactivos.

45 **[0048]** Tampón salino de trabajo (usado para lavados en el protocolo):

Fosfato sódico 10 mM, pH 6,0
Cloruro sódico 137 mM
Cloruro potásico 2,67 mM
50 EDTA 0,09 mM
Bronidox-L al 0,05%

[0049] Reactivo químico final (adicional al tampón de trabajo):

55 Ácido 5-aminosalicílico 0,588 mM
Alcohol 2-hidroxibencílico 0,145 mM
Ácido L-ascórbico 0,005 mM
Urea-peróxido 1,063 mM
Tween-20 al 0,09%

60 **[0050]** Reactivos adicionales:

Micropartículas - micropartículas magnéticas recubiertas con (anticuerpo) dirigido contra *Listeria* con 2 millones de micropartículas/muestra tras la adición

Disolución de conjugado - (anticuerpo) dirigido contra *Listeria* conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRPO) con 2 µg/muestra tras la adición

[0051] Las muestras con *Listeria* muertas por calor o un caldo negativo (1 ml) se sometieron al siguiente procedimiento.

Obsérvese que 1 ml de muestra puede proceder de cultivo, control, hisopo, esponja, etc.

[0052] Procedimiento:

1. Añadir 100 µl de micropartículas a la muestra.

2. Incubar 30 min a temperatura ambiente.

3. Capturar las micropartículas con imán 10 min.

4. Eliminar volumen de muestra.

5. Añadir 500 µl de tampón salino de trabajo, mezclar 2 min a 1000 rpm.

6. Capturar micropartículas con imán 2 min.

7. Eliminar el volumen de lavado.

8. Repetir las etapas 3-7 dos veces más durante un total de 3 lavados.

9. Añadir 200 µl de disolución de conjugado.

10. Mezclar la disolución durante 30 min.

11. Repetir las etapas de lavado 3-7 durante un total de 3 lavados.

12. Añadir 200 µl de reactivo químico final.

13. Incubar 20 min mezclando a 1000 rpm.

14. Añadir 40 µl de NaOH 0,5 N.

15. Mezclar 2 min a 1000 rpm.

16. Capturar micropartículas con imán 2 min.

17. Transferir volumen a la cubeta para la detección de la señal Raman.

[0053] En este procedimiento, el reactivo químico final era un producto químico BASH-UP de dos componentes. La señal en general era estable durante ~1 hora o más. El primer componente en el producto químico (BASH) contenía alcohol 2-hidroxibencílico (0,02 mg/ml), ácido 5-aminosalicílico (0,1 mg/ml), Tween-20 al 0,01% y ácido ascórbico (1 µg/ml) en el tampón salino de trabajo (pH 6,0). El segundo componente (UP) contenía el aducto de urea-peróxido (1 mg/ml) en el tampón salino de trabajo (pH 6,0) que incluye EDTA (1 mM). Estas formulaciones mantenían la actividad cuando estaban refrigeradas fuera de la luz directa durante más de un mes. La mezcla de los dos componentes en una relación de 1 de UP a 10 de BASH creaba una disolución de trabajo de BASH-UP que en general era estable durante un día de trabajo.

[0054] Se añadió una parte alícuota de BASH-UP a las muestras que contenían *Listeria* muertas por calor o un caldo negativo y se dejaron reaccionar durante 30 minutos. El periodo de tiempo adecuado variará basándose en la sensibilidad de la detección requerida. Se añadieron 40 µl de NaOH 0,5 N a 200 µl de volumen de reacción de BASH-UP para detener la reacción y convertir los productos en detectables por Raman. La alteración del volumen y concentración del NaOH puede proporcionar una estabilidad de la señal mayor según sea necesario para el ensayo particular.

[0055] Se observó dispersión Raman de la muestra de 240 µl usando un espectrómetro de Raman, Raman Systems R-3000, con láser a 532 nm operado con el ajuste de potencia alto. Los resultados se representan en la figura 8.

[0056] Las realizaciones de la presente invención incluyen un procedimiento para detectar un organismo o componente biológico de una muestra que comprende uno o más reaccionantes que se unirán al organismo o compuesto biológico formando un producto activo en Raman; concentrar el producto activo en Raman; y detectar los productos activos en Raman con un subsistema de detección que usa la dispersión de luz Raman, y en el que la dispersión de la luz Raman no es dispersión por interacción con una superficie sólida.

[0057] Los organismos biológicos que se pueden detectar mediante realizaciones de la presente invención incluyen bacterias, virus. Los ejemplos de bacterias que se pueden detectar incluyen *Listeria*, *E. coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Vibrio* y *Campylobacter*. Los ejemplos de virus que se pueden detectar mediante realizaciones de la invención incluyen VIH, virus de la hepatitis, adenovirus y rinovirus.

[0058] Realizaciones alternativas de la invención incluyen un procedimiento para detectar *Listeria* de una muestra, que comprende: un medio para mezclar la muestra con un anticuerpo específico para *Listeria* unido a una superficie sólida, estando diseñado el anticuerpo específico para *Listeria* para que reaccione con y quede unido a cualquier *Listeria* presente en la muestra; incubar la muestra y anticuerpo mezclados para aumentar la concentración de *Listeria* unida; separar por lavado el material no deseado; y detectar los productos activos en Raman con un subsistema de detección que usa la dispersión de luz Raman para detectar la concentración de *Listeria* unida, y en el que la dispersión de la luz Raman no es potenciada por la superficie.

[0059] Los componentes que se puede detectar mediante realizaciones de la presente invención incluyen proteínas, metabolitos, hormonas, material genético (p. ej., ADN y ARN) y productos intermedios metabólicos.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar un organismo o componente biológico en una muestra, que comprende:
 - a) proporcionar una pareja de unión específica para el organismo o componente biológico, en el que la pareja de unión específica está unida a una superficie sólida;
 - b) proporcionar uno o más reaccionantes que se unirán a la combinación del organismo o componente biológico y la pareja de unión específica, en el que el uno o más reaccionantes comprenden una o más enzimas que convierten uno o más reaccionantes en uno o más productos activos en Raman; y
 - c) decantar y lavar para separar el organismo, componente biológico o reaccionante no unidos; y
 - d) detectar el uno o más productos activos en Raman con un subsistema de detección que usa la dispersión de luz Raman, y
 en el que la dispersión de luz Raman no es dispersión por interacción con una superficie sólida.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el uno o más reaccionantes comprenden un anticuerpo contra el organismo o compuesto biológico objetivo.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la dispersión de luz Raman es dispersión de resonancia Raman.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el subsistema de detección incluye un láser.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el láser se selecciona para tener una longitud de onda que corresponde a una longitud de onda de absorción del producto activo en Raman.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el láser tiene una salida en la región visible.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el láser tiene una salida a 532 nm.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el organismo o componente biológico es una bacteria.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la bacteria es *Listeria*.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el organismo o componente biológico es un virus.
11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el organismo o componente biológico se elige de una proteína, un metabolito, una hormona y un producto intermedio metabólico.
12. Un procedimiento para detectar *Listeria* en una muestra, que comprende:
 - a) proporcionar un anticuerpo específico para *Listeria* unido a una superficie sólida, en el que el anticuerpo específico para *Listeria* se diseña para que reaccione con y quede unido a cualquier *Listeria* presente en la muestra;
 - b) proporcionar un segundo anticuerpo que comprende una o más enzimas que convierten uno o más reactivos en uno o más productos activos en Raman;
 - c) incubar la muestra y el anticuerpo mezclados para aumentar la concentración de *Listeria* unida;
 - d) decantar y lavar para eliminar el organismo, componente biológico o segundo anticuerpo no unidos; y
 - e) detectar el uno o más productos activos en Raman con un subsistema de detección que usa la dispersión de luz Raman para detectar la concentración de *Listeria* unida, y
 en el que la dispersión de luz Raman no es amplificada por una superficie.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el subsistema de detección incluye un láser y en el

que el láser tiene una salida a 532 nm.

14. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la una o más enzimas comprenden peroxidasa.

5 15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que el uno o más reactivos se eligen de ácido 5-aminosalicílico, 4-aminoantipireno, alcohol 2-hidroxibencílico, 4-cloro-1-naftol, fenol, ácido 4,5-dihidroxi-naftaleno-2,7-disulfónico, ácido L-ascórbico, urea-peróxido de hidrógeno, y peróxido de hidrógeno, y preferiblemente en el que el uno o más reactivos comprenden ácido 5-aminosalicílico, alcohol 2-hidroxibencílico, ácido L-ascórbico y urea-peróxido de hidrógeno.

10 16. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que uno de los productos activos en Raman es una iminoquinona.

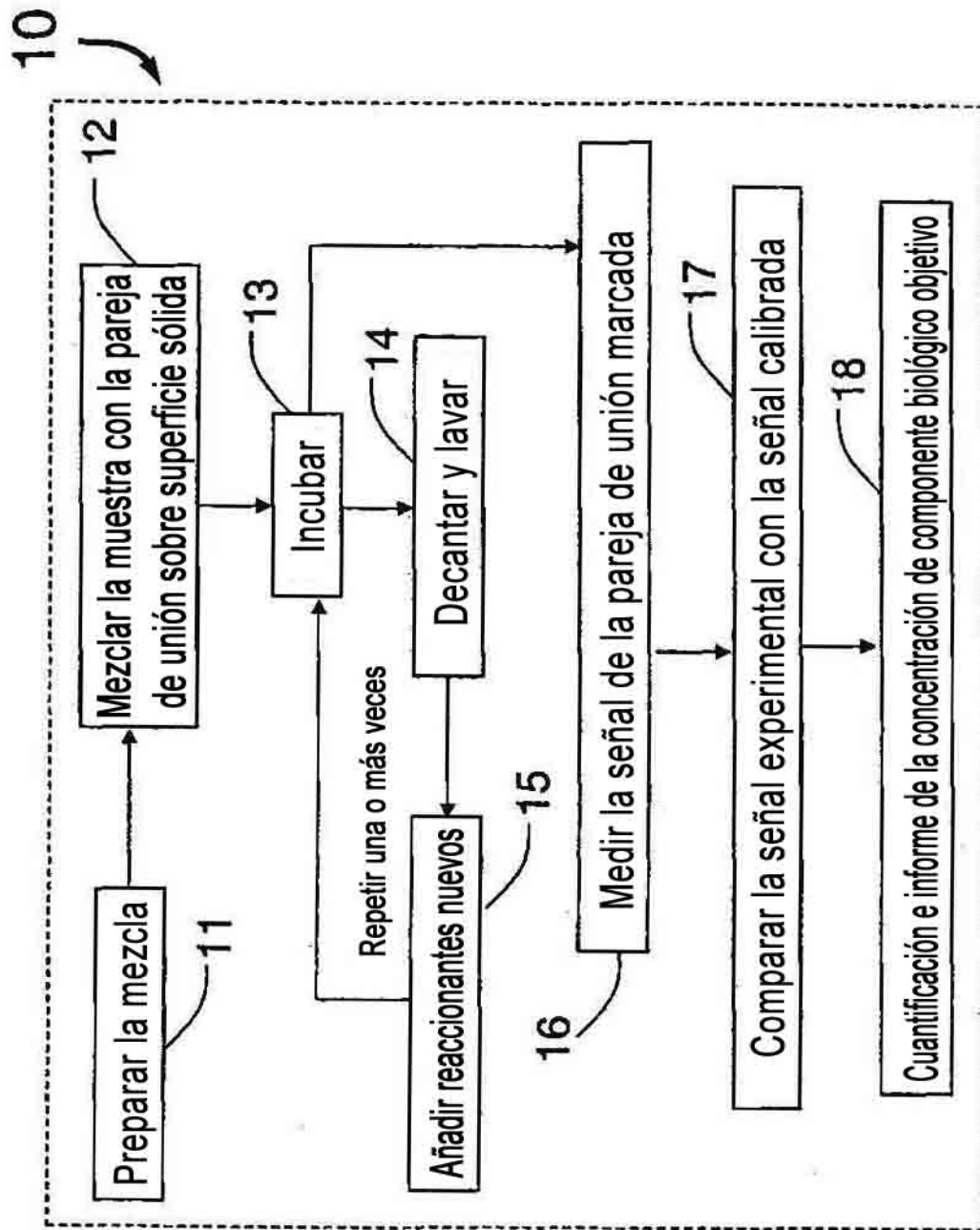


FIG. 1

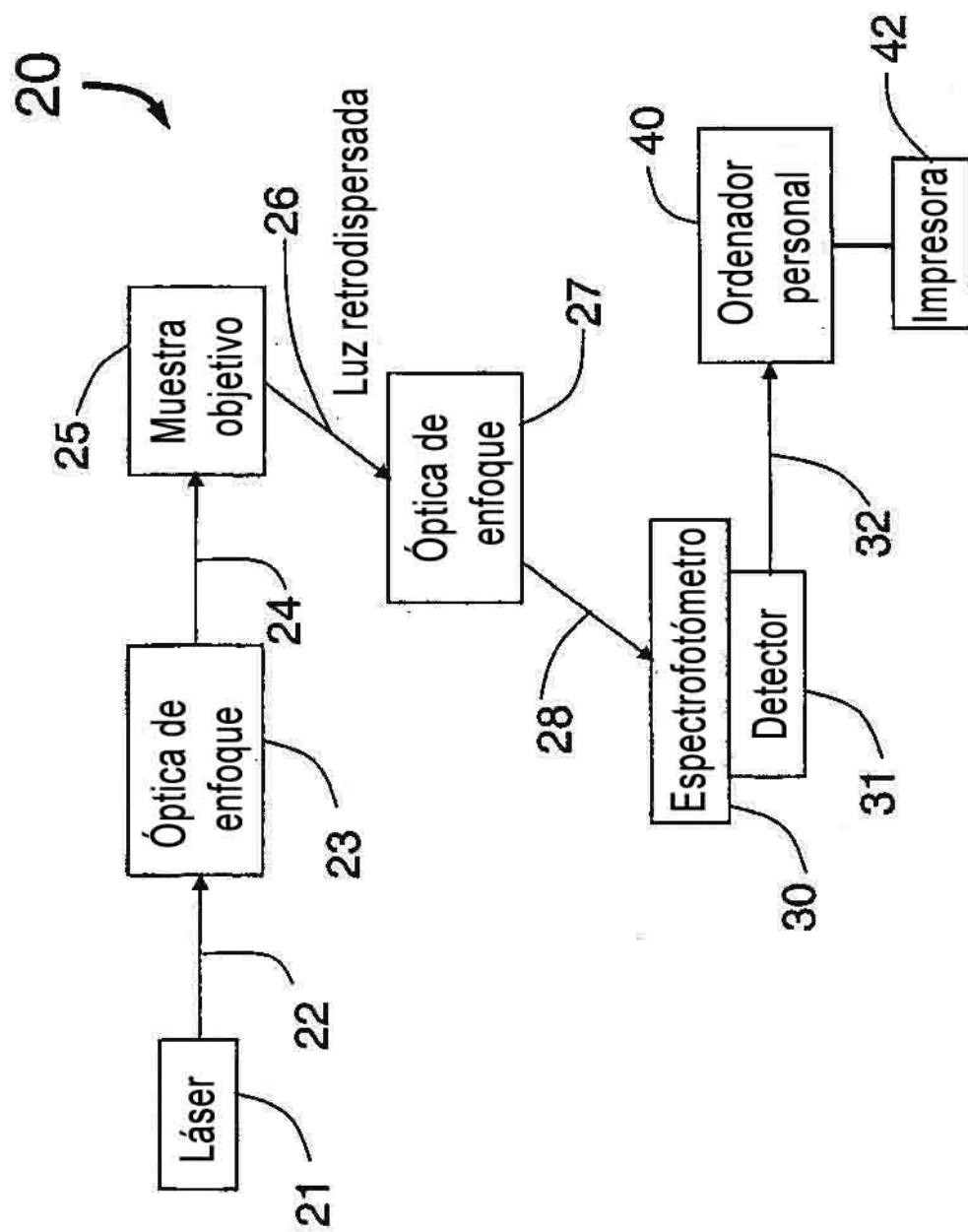


FIG. 2

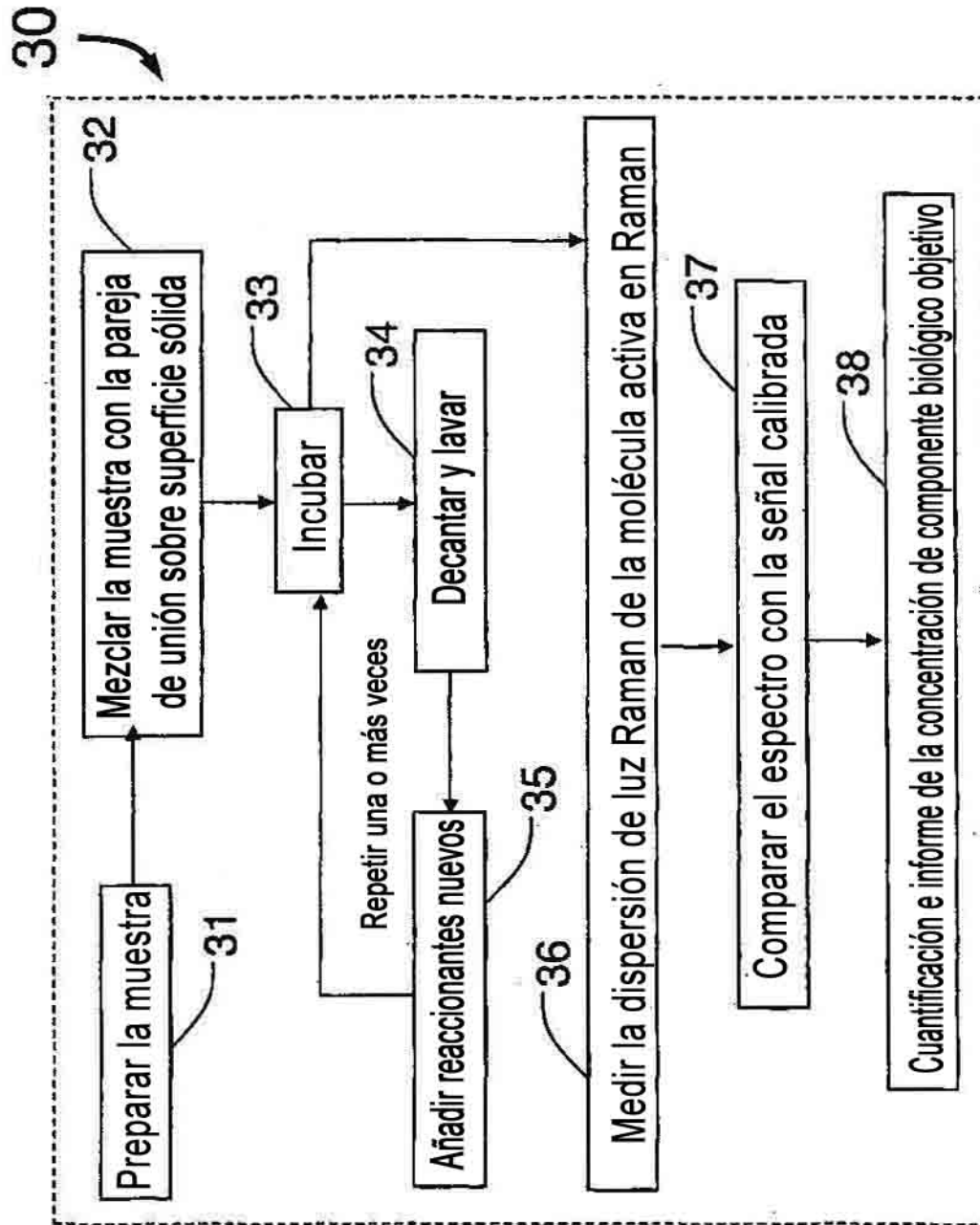


FIG. 3

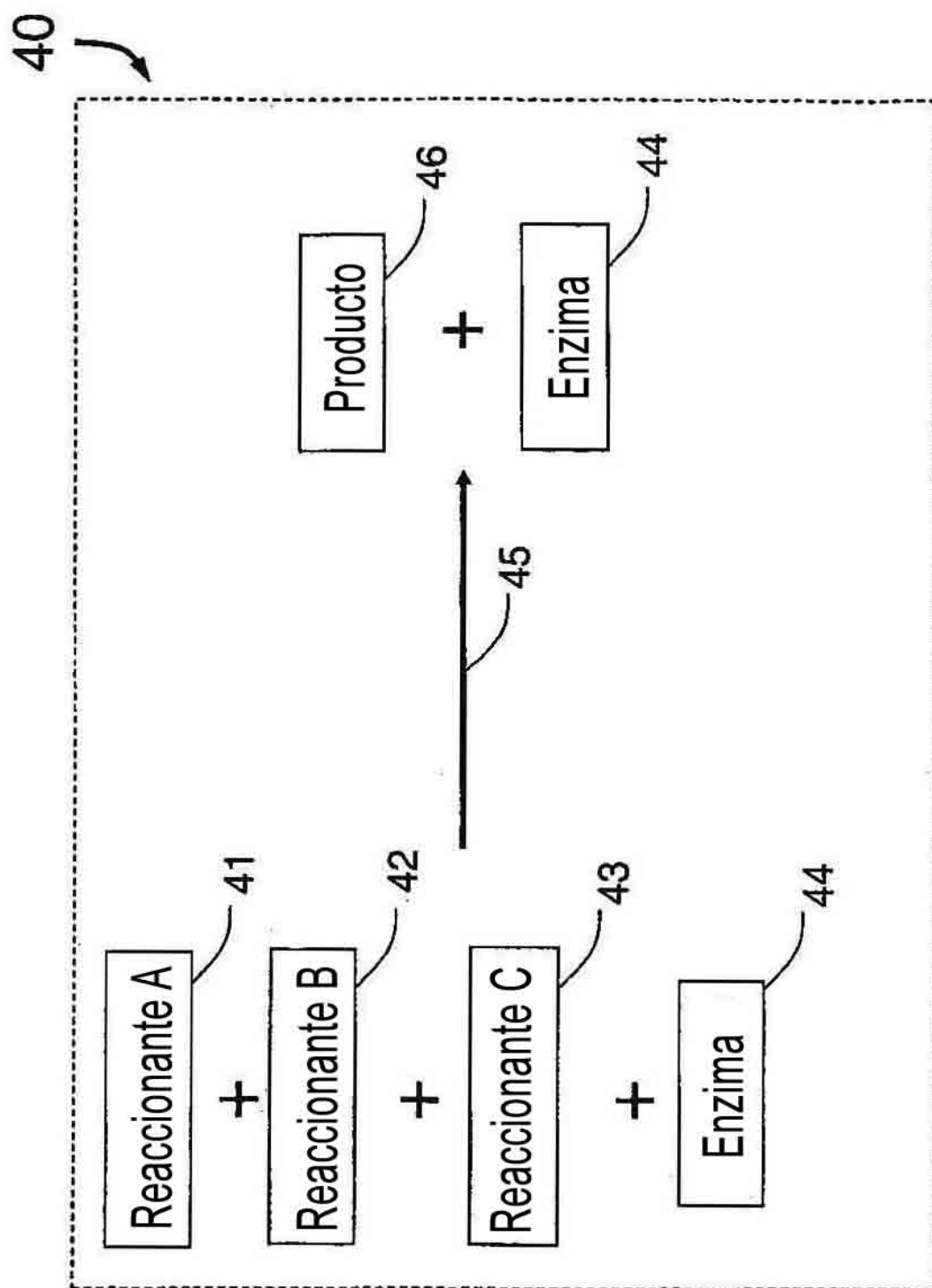


FIG. 4

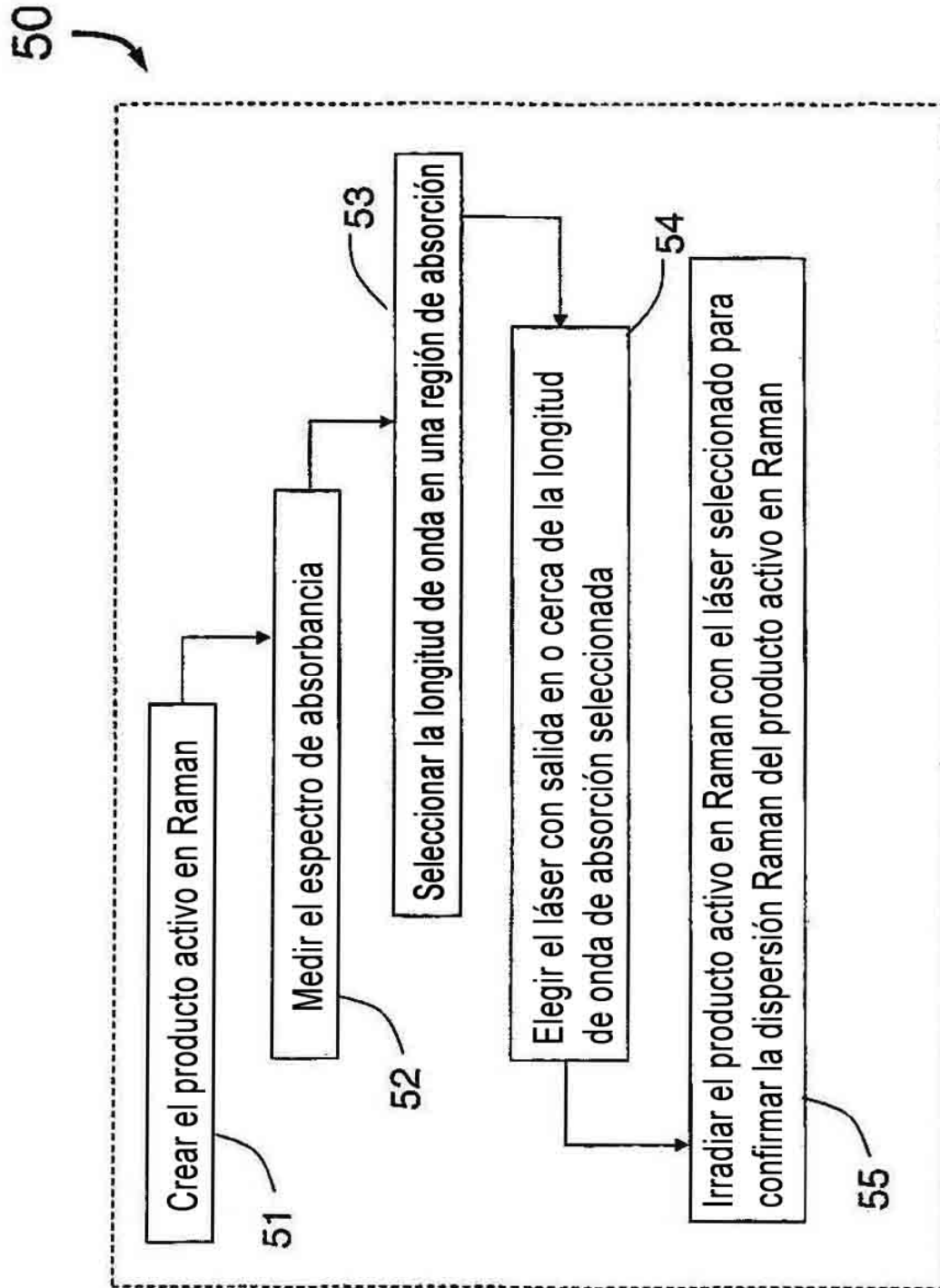


FIG. 5

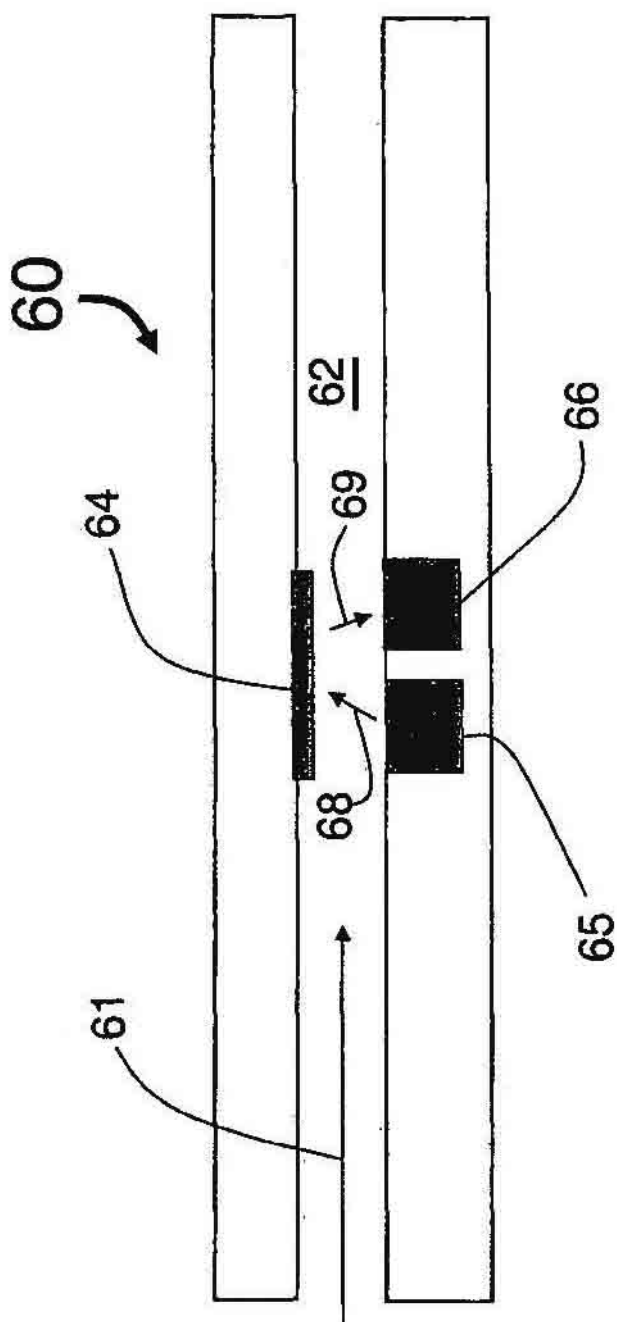


FIG. 6

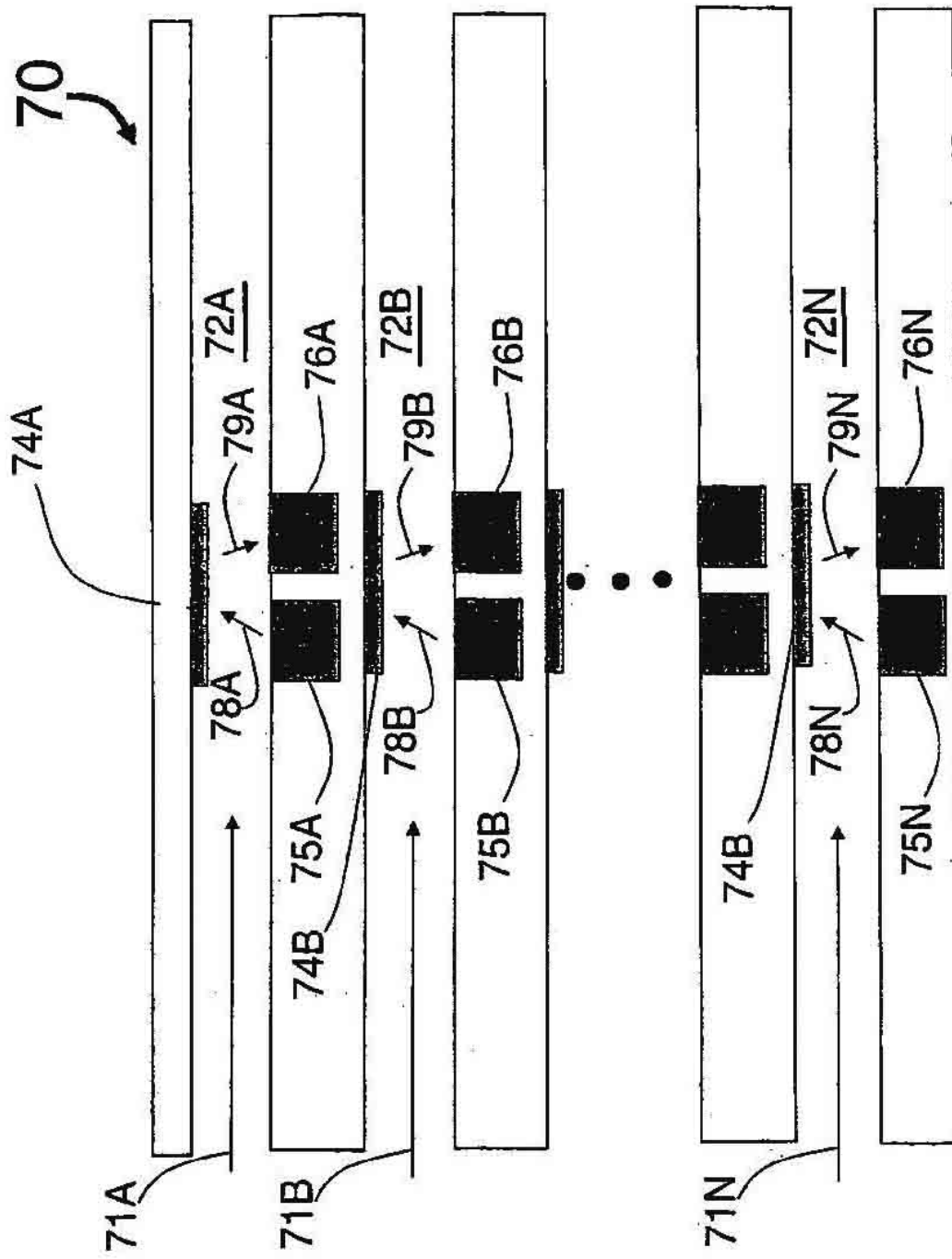
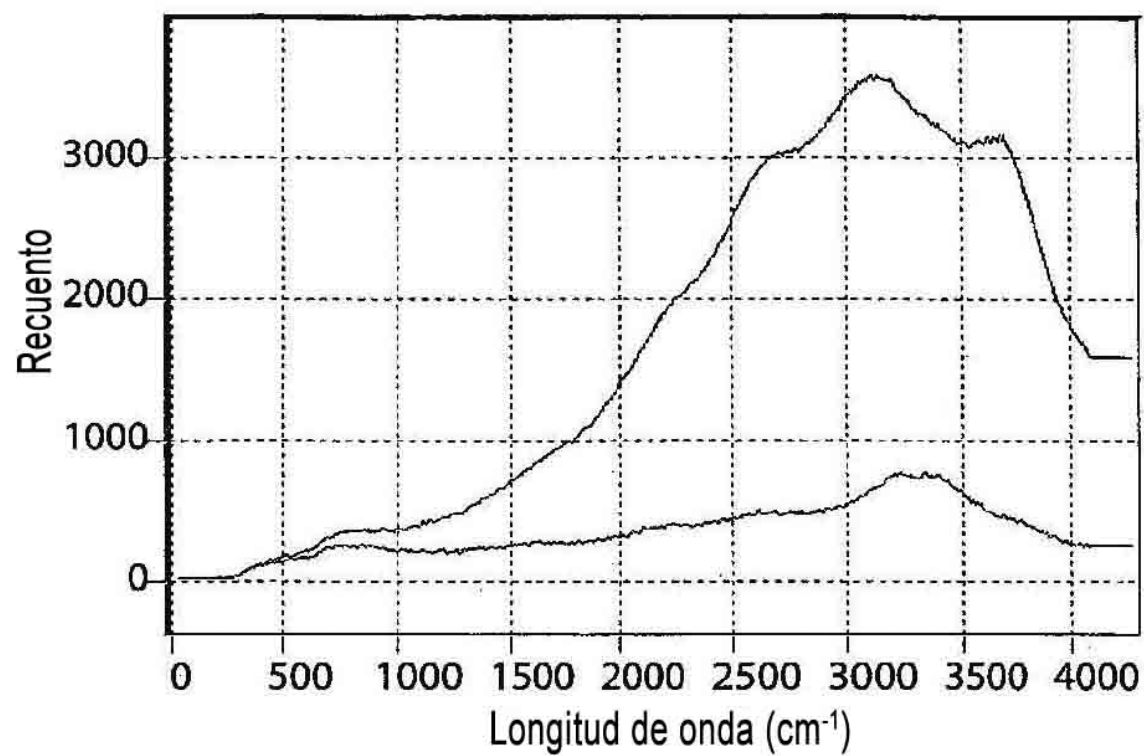


FIG. 7

**Fig. 8**