

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 471**

51 Int. Cl.:

G01N 33/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.04.2011 PCT/US2011/033410**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2011 WO11133759**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2011 E 11772698 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 2561354**

54 Título: **Extracción de bajas concentraciones de bacteria a partir de una muestra**

30 Prioridad:

21.04.2010 US 326588 P

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

09.10.2018

73 Titular/es:

**DNAE GROUP HOLDINGS LIMITED (100.0%)
Ugli Campus, Block C, Centre House, 56 Wood
Lane
London W12 7SB, GB**

72 Inventor/es:

**ESCH, VICTOR, C.;
DRYGA, SERGEY, A. y
CLARIZIA, LISA-JO, ANN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 685 471 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

Extracción de bajas concentraciones de bacteria a partir de una muestra

Campo de la Invención

5 La presente descripción se refiere generalmente a la realización de un ensayo en una muestra que aísla una bacteria de la muestra, en la que el ensayo aísla tan solo como aproximadamente 1 UFC/ml de bacterias en la muestra.

Antecedentes

10 Los patógenos transmitidos por la sangre son un problema de salud significativo. Un diagnóstico tardío o inadecuado de una infección bacteriana puede provocar sepsis, una respuesta inflamatoria grave y, a menudo mortal, a la infección. La sepsis es la décima causa de muerte en los Estados Unidos. La detección temprana de infecciones bacterianas en la sangre es clave para prevenir la aparición de la sepsis. Los métodos tradicionales de detección e identificación de la infección transmitida por la sangre incluyen hemocultivo y ensayos de sensibilidad a antibióticos. Estos métodos generalmente requieren cultivar células, que pueden ser costosos y pueden tardar hasta 72 horas. Frecuentemente, se dará un shock séptico antes de que puedan obtenerse los resultados del cultivo celular.

15 Se han descrito por otros métodos alternativos para la detección de patógenos, particularmente bacterias. Esos métodos incluyen métodos de detección molecular, métodos de detección de antígenos y métodos de detección de metabolitos. Los métodos de detección molecular, si implican captura de híbrido o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), requieren altas concentraciones de ADN purificado para la detección. Tanto la detección de antígenos como los métodos de detección de metabolitos también requieren una gran cantidad de bacterias y tienen un límite alto de detección (generalmente $>10^4$ UFC/ml), por lo que requieren un paso de enriquecimiento antes de la detección. Este periodo de incubación/enriquecimiento está destinado a permitir el crecimiento de bacterias y un aumento en el número de células bacterianas para facilitar la identificación. En muchos casos, se necesita una serie de dos o tres incubaciones separadas para aislar las bacterias diana. Sin embargo, tales etapas de enriquecimiento requieren una cantidad significativa de tiempo (p. ej., al menos de algunos días a una semana) y pueden comprometer la sensibilidad de la prueba al matar algunas de las células que se busca medir.

20 Existe una necesidad de métodos para aislar analitos diana, como bacterias, de una muestra, como una muestra de sangre, sin una etapa de enriquecimiento adicional. También existe la necesidad de métodos para aislar analitos diana que sean rápidos y sensibles con el fin de proporcionar datos para las decisiones de tratamiento del paciente en un marco de tiempo clínicamente relevante.

30 Resumen

La presente descripción proporciona métodos y dispositivos para aislar patógenos en una muestra biológica. La invención permite la detección rápida de patógenos a niveles muy bajos en la muestra; permitiendo así una detección e identificación temprana y precisa del patógeno. La invención se lleva a cabo con partículas magnéticas que tienen un resto de unión específica a la diana. Los métodos de la descripción pueden implicar la introducción de partículas magnéticas que incluyen un resto específico de unión a la diana a una muestra de fluido corporal para crear una mezcla, incubar la mezcla para permitir que las partículas se unan a una diana, aplicar un campo magnético para capturar complejos de diana/partícula magnética en una superficie, y lavar con una solución de lavado que reduce la agregación de partículas, aislando así los complejos diana/partícula magnética. Una ventaja particular de los métodos de la descripción es la captura y el aislamiento de bacterias y hongos directamente a partir de las muestras de sangre a bajas concentraciones que están presentes en muchas muestras clínicas (tan bajas como 1 UFC/ml de bacterias en una muestra de sangre).

45 El resto de unión específica a la diana dependerá de la diana a capturar. El resto puede ser cualquier resto de captura conocido en la técnica, como un anticuerpo, un aptámero, un ácido nucleico, una proteína, un receptor, un fago o un ligando. En realizaciones particulares, el resto de unión específico a la diana es un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es específico para bacterias. En otras realizaciones, el anticuerpo es específico para hongos.

50 El analito diana se refiere a la diana que será capturada y aislada por los métodos de la descripción. La diana puede ser bacteria, hongos, proteína, una célula, un virus, un ácido nucleico, un receptor, un ligando, o cualquier molécula conocida en la técnica. En ciertas realizaciones, la diana es una bacteria patógena. En otras realizaciones, la diana es una bacteria gram positiva o gram negativa. Especies bacterianas a modo de ejemplo que pueden capturarse y aislarse por los métodos de la invención incluyen E. coli, Listeria, Clostridium, Mycobacterium, Shigella, Borrelia, Campylobacter, Bacillus, Salmonella, Staphylococcus, Streptococcus, y una combinación de las mismas.

55 Los métodos de la invención se pueden realizar con cualquier tipo de partícula magnética. Las partículas magnéticas entran generalmente en dos amplias categorías. La primera categoría incluye partículas que son permanentemente magnetizables, o ferromagnéticas; y la segunda categoría incluye partículas que demuestran comportamiento magnético prominente solamente cuando se someten a un campo magnético. Estas últimas se conocen como

partículas magnéticamente sensibles. Los materiales que muestran un comportamiento de respuesta magnética sensible se describen a veces como superparamagnéticos. Sin embargo, los materiales que exhiben propiedades ferromagnéticas prominentes, p. ej., óxido de hierro magnético, se pueden caracterizar como superparamagnéticos cuando se aportan en cristales de aproximadamente 30 nm o menos de diámetro. Por el contrario, los cristales más grandes de materiales ferromagnéticos retienen las características del imán permanente después de la exposición a un campo magnético y tienden a agregarse a continuación debido a la fuerte interacción partícula-partícula. En ciertas realizaciones, las partículas son perlas superparamagnéticas. En otras realizaciones, las partículas magnéticas incluyen al menos un 70% de perlas superparamagnéticas en peso. En ciertas realizaciones, las perlas superparamagnéticas son de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 250 nm de diámetro. En ciertas realizaciones, la partícula magnética es una partícula magnética que contiene hierro. En otras realizaciones, la partícula magnética incluye óxido de hierro o hierro platino.

En ciertas realizaciones, la etapa de incubación incluye incubar la mezcla en un tampón que inhibe la lisis celular. En ciertas realizaciones, el tampón incluye hidrócloruro de Tris(hidroximetil)-aminometano a una concentración entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 100 mM, preferiblemente aproximadamente 75 mM. En otras realizaciones, los métodos de la descripción incluyen además retener las partículas magnéticas en un campo magnético durante la etapa de lavado. Los métodos de la invención pueden usarse con cualquier fluido corporal. Fluidos corporales a modo de ejemplo incluyen sangre, esputo, suero, plasma, orina, saliva, sudor y fluido cerebroespinal.

Otro aspecto proporciona métodos para aislar un microorganismo diana de una muestra de fluido corporal que incluye introducir partículas magnéticas que tienen un resto de unión específico a la diana a una muestra de fluido corporal con el fin de crear una mezcla, incubar la mezcla para permitir que las partículas se unan a la diana, aplicar un campo magnético para aislar sobre una superficie magnética las partículas a las que está unida la diana, lavar la mezcla en una solución de lavado que reduce la agregación de partículas, y lisar las bacterias capturadas y extraer el ADN para su posterior análisis por PCR, hibridación de microarrays o secuenciación.

Otro aspecto proporciona métodos para aislar tan solo 1 UFC/ml de bacterias en una muestra de sangre que incluye introducir partículas superparamagnéticas que tienen un diámetro de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 250 nm y que tienen un resto de unión específica a bacterias a una muestra de fluido corporal con el fin de crear una mezcla, incubar dicha mezcla para permitir que dichas partículas se unan a una bacteria, aplicar un campo magnético para aislar sobre una superficie los complejos bacteria/partícula magnética, y lavar la mezcla en una solución de lavado que reduce la agregación de partículas, aislando de este modo tan solo 1 UFC/ml de bacterias en la muestra de sangre.

Descripción detallada

La descripción generalmente se refiere a la realización de un ensayo en una muestra que aísla una bacteria de la muestra, en el que el ensayo aísla tan solo como 1 UFC/ml de bacterias de la muestra. Se puede usar cualquier ensayo que pueda aislar tan solo como 1 UFC/ml de bacterias en la muestra. En ciertos aspectos, los métodos de la descripción aíslan tan poco como 1 UFC/ml de bacterias en la muestra usando partículas magnéticas que tienen un momento magnético particular (determinado por el tamaño de partícula y el % en peso del material magnético) que capturan patógenos diana en una muestra de fluido corporal e imanes para aislar la diana.

En ciertos aspectos, los métodos de la descripción implican introducir partículas magnéticas que incluyen un resto de unión específico a la diana a una muestra de fluido corporal con el fin de crear una mezcla, incubar la mezcla para permitir que las partículas se unan a una diana, aplicar un campo magnético para capturar complejos diana/partícula magnética sobre una superficie, aislando así los complejos diana/partícula magnética. Los métodos de la invención pueden implicar además lavar la mezcla en una solución de lavado que reduce la agregación de partículas. Ciertas tecnologías y principios fundamentales están asociados con la unión de materiales magnéticos a entidades diana y, posteriormente, la separación mediante el uso de campos y gradientes magnéticos. Tales tecnologías y principios fundamentales son conocidos en la técnica y se han descrito previamente, como los descritos en Janeway (Immunobiology, 6ª Edición, Garland Science Publishing). Los métodos de la descripción implican recoger un fluido corporal que tiene un analito diana en un recipiente, como un tubo de recogida de sangre (p. ej., VACUTAINER, tubo de ensayo diseñado específicamente para venopunción, disponible comercialmente en Becton, Dickinson y compañía). En ciertas realizaciones, se añade una solución que previene o reduce la agregación de factores de agregación endógenos, como heparina en el caso de la sangre.

Un fluido corporal se refiere a un material líquido derivado de, por ejemplo, un ser humano u otro mamífero. Tales fluidos corporales incluyen, pero no están limitados a, moco, sangre, plasma, suero, derivados séricos, bilis, flema, saliva, sudor, líquido amniótico, líquido mamario, orina, esputo y líquido cefalorraquídeo (LCR), como LCR lumbar o ventricular. Un fluido corporal también puede ser un aspirado con aguja fina. Un fluido corporal también puede ser un medio que contiene células o material biológico. En realizaciones particulares, el fluido es sangre.

Los métodos de la descripción se pueden usar para detectar cualquier analito diana. El analito diana se refiere a la sustancia en la muestra que será capturada y aislada por los métodos de la descripción. La diana puede ser bacterias, hongos, una proteína, una célula (como una célula cancerosa, un glóbulo blanco, una célula viralmente

infectada, o una célula fetal que circula en la circulación materna), un virus, un ácido nucleico (p. ej., ADN o ARN), un receptor, un ligando, una hormona, un fármaco, una sustancia química o cualquier molécula conocida en la técnica. En ciertas realizaciones, la diana es una bacteria patógena. En otras realizaciones, la diana es una bacteria gram positiva o gram negativa. Ejemplos de especies bacterianas que pueden ser capturadas y aisladas por los métodos de la invención incluyen *E. coli*, *Listeria*, *Clostridium*, *Mycobacterium*, *Shigella*, *Borrelia*, *Campylobacter*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Pneumococcus*, *Streptococcus*, y una combinación de las mismas. Una ventaja particular de los métodos de la descripción es la captura y aislamiento de bacterias y hongos directamente a partir de muestras de sangre que están presentes a bajas concentraciones en muchas muestras clínicas (tan bajas como 1 UFC/ml de bacterias en una muestra de sangre).

La muestra se mezcla después con partículas magnéticas que tienen un momento magnético particular y que también incluyen un resto de unión específico a la diana para generar una mezcla que se deja incubar de manera que las partículas se unen a una diana en la muestra, como una bacteria en una muestra de sangre. La mezcla se deja incubar durante un tiempo suficiente para que las partículas se unan al analito diana. El proceso de unión de las partículas magnéticas a los analitos diana asocia a un momento magnético con los analitos diana, y así permite que los analitos diana sean manipulados a través de las fuerzas generadas por los campos magnéticos en el momento magnético asociado.

En general, el tiempo de incubación dependerá del grado deseado de unión entre el analito diana y las perlas magnéticas (p. ej., la cantidad de momento que estaría deseablemente unido a la diana), la cantidad de momento por diana, la cantidad de tiempo de mezcla, el tipo de mezcla, los reactivos presentes para promover la unión y el sistema de química de unión que se está empleando. El tiempo de incubación puede ser en cualquier lugar de aproximadamente 5 segundos hasta algunos días. Los tiempos ejemplares de incubación varían de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 2 horas. La unión se da en un amplio intervalo de temperaturas, generalmente entre 15°C y 40°C.

Los métodos de la invención se realizan con partículas magnéticas que tienen un momento magnético que permite el aislamiento de tan solo 1 UFC/ml de bacterias de la muestra. La producción de partículas magnéticas se muestra por ejemplo en Giaever (E.E.U.U. 3.970.518), Senyi et al. (E.E.U.U. 4.230.685), Dodin et al. (E.E.U.U. 4.677.055), Whitehead et al. (E.E.U.U. 4.695.393), Benjamin et al. (E.E.U.U. 5.695.946), Giaever (E.E.U.U. 4.018.886), Rembaum (E.E.U.U. 4.267.234), Molday (E.E.U.U. 4.452.773), Whitehead et al. (E.E.U.U. 4.554.088), Forrest (E.E.U.U. 4.659.678), Liberti et al. (E.E.U.U. 5.186.827), Own et al. (E.E.U.U. 4.795.698), y Liberti et al. (WO 91/02811). Las partículas magnéticas generalmente se dividen en dos amplias categorías. La primera categoría incluye partículas que son permanentemente magnetizables, o ferromagnéticas; y la segunda categoría incluye partículas que muestran un comportamiento magnético prominente solo cuando se someten a un campo magnético. Estas últimas se conocen como partículas magnéticamente sensibles. Los materiales que muestran un comportamiento de respuesta magnética sensible se describen a veces como superparamagnéticos. Sin embargo, los materiales que exhiben propiedades ferromagnéticas prominentes, p. ej., óxido de hierro magnético, se pueden caracterizar como superparamagnéticos cuando se aportan en cristales de aproximadamente 30 nm o menos de diámetro. Los cristales más grandes de materiales ferromagnéticos, por el contrario, retienen las características del imán permanente después de la exposición a un campo magnético y tienden a agregarse a continuación debido a la fuerte interacción partícula-partícula. En ciertas realizaciones, las partículas son perlas superparamagnéticas. En ciertas realizaciones, la partícula magnética es una partícula magnética que contiene hierro. En otras realizaciones, la partícula magnética incluye óxido de hierro o hierro platino.

En ciertas realizaciones, las partículas magnéticas incluyen al menos aproximadamente 10% de perlas superparamagnéticas en peso, al menos aproximadamente 20% de perlas superparamagnéticas en peso, al menos aproximadamente 30% de perlas superparamagnéticas en peso, al menos aproximadamente 40% de perlas superparamagnéticas en peso, al menos aproximadamente 50% de perlas superparamagnéticas en peso, al menos aproximadamente 60% de perlas superparamagnéticas en peso, al menos aproximadamente 70% de perlas superparamagnéticas en peso, al menos aproximadamente 80% de perlas superparamagnéticas en peso, al menos aproximadamente 90% de perlas superparamagnéticas en peso, al menos aproximadamente 95% de perlas superparamagnéticas en peso, o al menos aproximadamente 99% de perlas superparamagnéticas en peso. En una realización particular, las partículas magnéticas incluyen al menos aproximadamente 70% de perlas superparamagnéticas en peso.

En ciertas realizaciones, las perlas superparamagnéticas tienen menos de 100 nm de diámetro. En otras realizaciones, las perlas superparamagnéticas tienen aproximadamente 150 nm de diámetro, tienen aproximadamente 200 nm de diámetro, tienen aproximadamente 250 nm de diámetro, tienen aproximadamente 300 nm de diámetro, tienen aproximadamente 350 nm de diámetro, tienen aproximadamente 400 nm de diámetro, tienen aproximadamente 500 nm de diámetro, o tienen aproximadamente 1000 nm de diámetro. En una realización particular, las perlas superparamagnéticas tienen aproximadamente de 100 nm a aproximadamente 250 nm de diámetro.

En ciertas realizaciones, las partículas son perlas (p. ej., nanopartículas) que incorporan materiales magnéticos, o materiales magnéticos que se han funcionalizado, u otras configuraciones como se conocen en la técnica. En ciertas realizaciones, se pueden usar nanopartículas que incluyen un material polimérico que incorpora material(es)

magnético(s), como material(es) nanometal(es). Cuando esos materiales nanometal(es) o cristal(es), como Fe_3O_4 , son superparamagnéticos, pueden proporcionar propiedades ventajosas, como ser capaz de ser magnetizado por un campo magnético externo, y desmagnetizado cuando el campo magnético externo se ha eliminado. Esto puede ser ventajoso para facilitar el transporte de la muestra dentro y fuera de un área donde la muestra se está procesando sin una excesiva agregación de perlas.

Se pueden emplear uno o varios nanometal(es) diferentes, como Fe_3O_4 , FePt, o Fe, en una configuración de núcleo-caparazón para proporcionar estabilidad, y/o otros varios como se puede conocer en la técnica. En muchas aplicaciones, puede ser ventajoso tener un nanometal que tiene un momento de saturación por volumen tan alto como sea posible, ya que esto puede maximizar las fuerzas relacionadas con el gradiente, y/o puede potenciar una señal asociada con la presencia de las perlas. También puede ser ventajoso tener la carga volumétrica en una perla lo más alta posible, por la(s) misma(s) razón(es) o similar. Con el fin de maximizar el momento proporcionado por un nanometal magnetizable, se puede proporcionar un cierto campo de saturación. Por ejemplo, para partículas superparamagnéticas de Fe_3O_4 , este campo puede estar en el orden de aproximadamente 0,3T.

Puede optimizarse el tamaño de la perla que contiene el nanometal para una aplicación particular, por ejemplo, maximizar el momento cargado a una diana, maximizar el número de perlas en una diana con una detectabilidad aceptable, maximizar el movimiento inducido por la fuerza deseado, y/o maximizar la diferencia en el momento asociado a la diana marcada y dianas unidas no-específicamente o perlas agregadas o perlas individuales. Aunque la maximización se menciona en el ejemplo anterior, se contemplan otras optimizaciones o alteraciones, como minimizar o, por otra parte, condiciones que afectan de modo deseable.

En una realización a modo de ejemplo, se produce una perla de polímero que contiene un 80% en peso de partículas superparamagnéticas de Fe_3O_4 o, por ejemplo, 90% en peso o más de partículas superparamagnéticas, encapsulando partículas superparamagnéticas con un recubrimiento de polímero para producir una perla que tiene un diámetro de aproximadamente 250 nm.

Las partículas magnéticas para usar con los métodos de la invención tienen un resto de unión específico a la diana que permite a las partículas unirse específicamente a la diana de interés en la muestra. El resto específico de diana puede ser cualquier molécula conocida en la técnica y dependerá de la diana a capturar y aislar. Restos de unión específicos de la diana ejemplares incluyen ácidos nucleicos, proteínas, ligandos, anticuerpos, aptámeros, y receptores.

En realizaciones particulares, el resto de unión específica a la diana es un anticuerpo, como un anticuerpo que une una bacteria particular. Las metodologías generales para la producción de anticuerpos, incluidos los criterios que deben tenerse en cuenta al elegir un animal para la producción de antiseros, se describen en Harlow et al. (Anticuerpos, Cold Spring Harbor Laboratory, págs. 93-117, 1988). Por ejemplo, un animal de tamaño adecuado como cabras, perros, ovejas, ratones o camellos se inmunizan mediante la administración de una cantidad de inmunógeno, como la bacteria diana, eficaz para producir una respuesta inmune. Un protocolo a modo de ejemplo es el siguiente. Al animal se le inyectan 100 miligramos de antígeno resuspendido en adyuvante, por ejemplo, adyuvante completo de Freund, dependiendo del tamaño del animal, seguido de tres semanas después por una inyección subcutánea de 100 microgramos a 100 miligramos de inmunógeno con adyuvante dependiendo del tamaño del animal, por ejemplo, adyuvante incompleto de Freund. Se administran inyecciones subcutáneas intraperitoneales adicionales cada dos semanas con adyuvante, por ejemplo, adyuvante incompleto de Freund, hasta que se alcanza un título adecuado de anticuerpo en la sangre del animal. Títulos a modo de ejemplo incluyen un título de al menos aproximadamente 1:5000 o un título de 1:100.000 o más, es decir, la dilución que tiene una actividad detectable. Los anticuerpos se purifican, por ejemplo, mediante purificación por afinidad en columnas que contienen resina de proteína G o resina de afinidad específica de la diana.

Se usa la técnica de inmunización *in vitro* de linfocitos humanos para generar anticuerpos monoclonales. Las técnicas para la inmunización *in vitro* de linfocitos humanos son bien conocidas por los expertos en la técnica. Véase, p. ej., Inai et al., Histochemistry, 99(5): 335-362, Mayo 1993; Mulder et al., Hum. Immunol. 36(3): 186-192, 1993; Harada et al., J. Oral Pathol. Med., 22(4): 145-152, 1993; Stauber et al., J. Immunol. Methods, 161(2): 157-168, 1993; y Venkateswaran et al., Hybridoma, 11(6): 729-739, 1992. Estas técnicas pueden usarse para producir anticuerpos monoclonales reactivos a antígenos, que incluyen anticuerpos monoclonales IgG e IgM específicos de antígeno.

Cualquier anticuerpo o fragmento del mismo que tenga afinidad y específico para las bacterias de interés está dentro del alcance de la invención proporcionada en esta memoria. Se proporcionan perlas inmunomagnéticas frente a Salmonella en Vermunt et al. (J. Appl. Bact. 72: 112, 1992). Se proporcionan perlas inmunomagnéticas frente a Staphylococcus aureus en Johne et al. (J. Clin. Microbiol. 27: 1631, 1989). Se proporcionan perlas inmunomagnéticas frente a Listeria en Skjerve et al. (Appl. Env. Microbiol. 56: 3478, 1990). Se proporcionan perlas inmunomagnéticas frente a Escherichia coli en Lund et al. (J. Clin. Microbiol. 29: 2259, 1991).

Se conocen en la técnica métodos para unir el resto de unión específico de la diana a la partícula magnética. El recubrimiento de partículas magnéticas con anticuerpos es bien conocido en la técnica, véase por ejemplo Harlow et al. (Anticuerpos, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988), Hunter et al. (Immunoassays for Clinical Chemistry, págs.

147-162, eds., Churchill Livingston, Edimburgo, 1983), y Stanley (Essentials in Immunology and Serology, Delmar págs. 152-153, 2002). Tal metodología puede modificarse fácilmente por un experto en la técnica para unir otros tipos de restos de unión específicos de la diana a las partículas magnéticas. Ciertos tipos de partículas magnéticas recubiertas con un resto funcional están disponibles comercialmente en Sigma-Aldrich (San Luis, MO).

5 En ciertas realizaciones, se añade una solución tampón a la muestra junto con las perlas magnéticas. Un tampón a modo de ejemplo incluye hidrocloreuro de Tris(hidroximetil)-aminometano a una concentración de aproximadamente 75 mM. Se ha encontrado que la composición del tampón, parámetros de mezcla (velocidad, tipo de mezcla, como rotación, agitación, etc., y temperatura) influyen en la unión. Es importante mantener la osmolaridad de la solución final (p. ej., sangre + tampón) para mantener una alta eficacia de marcaje. Los tampones usados en los métodos de
10 la invención están diseñados para evitar la lisis de las células sanguíneas, facilitar la unión eficaz de dianas con perlas magnéticas y reducir la formación de agregados de perlas. Se ha encontrado que la solución tampón que contiene NaCl 300 mM, Tris-HCl 75 mM, pH 8,0 y Tween 20 al 0,1%, cumple estos objetivos de diseño.

15 Sin estar limitado por ninguna teoría o mecanismo de acción particular, se cree que el cloruro sódico es principalmente responsable de mantener la osmolaridad de la solución y de la reducción de la unión no específica a la perla magnética a través de interacción iónica. El hidrocloreuro de Tris(hidroximetil)-aminometano es un compuesto bien establecido usado frecuentemente en biología para mantener el pH de una solución. Se ha encontrado que la concentración de 75 mM es beneficiosa y suficiente para una alta eficacia de unión. Del mismo modo, el Tween 20 se usa ampliamente como un detergente suave para disminuir la unión no específica debida a interacciones hidrofóbicas. Diversos ensayos usan Tween 20 en concentraciones que varían de 0,01% a 1%. La concentración de
20 0,1% parece ser óptima para el marcaje eficaz de bacterias, al tiempo que mantiene las células sanguíneas intactas.

Un enfoque alternativo para lograr una alta eficacia de unión mientras se reduce el tiempo requerido para la etapa de unión es usar un mezclador estático, u otros dispositivos mezcladores que proporcionan una mezcla eficaz de muestras viscosas a altos índices de flujo, como a o alrededor de 5 ml/min. En una realización, la muestra se mezcla
25 con tampón de unión en una proporción de, o aproximadamente, 1:1, usando un conector de interfaz de mezcla. La muestra diluida luego fluye a través de un conector de interfaz de mezcla donde se mezcla con nanopartículas específicas de la diana. Se pueden conectar conectores de interfaz de mezcla adicionales corriente abajo que proporcionan la mezcla de muestra y nanopartículas específicas de antígeno para mejorar la eficacia de unión. Se selecciona la velocidad de flujo combinada de la muestra marcada de tal forma que sea compatible con el procesamiento posterior.

30 Después de la unión de las partículas magnéticas al analito diana en la mezcla para formar complejos diana/partícula magnética, se aplica un campo magnético a la mezcla para capturar los complejos sobre una superficie. Los componentes de la mezcla que no están unidos a partículas magnéticas no se verán afectados por el campo magnético y permanecerán libres en la mezcla. Se conocen en la técnica métodos y aparatos para separar complejos de diana/partícula magnética de otros componentes de una mezcla. Por ejemplo, se puede acoplar una
35 malla de acero a un imán, se pueden configurar un canal o canales lineales con imanes adyacentes, o se pueden usar imanes de quadrapolo con flujo anular. Otros métodos y aparatos para separar complejos diana/partícula magnética de otros componentes de una mezcla se muestran en Rao et al. (E.E.U.U. 6.551.843), Liberti et al. (E.E.U.U. 5.622.831), Hatch et al. (E.E.U.U. 6.514.415), Benjamin et al. (E.E.U.U. 5.695.946), Liberti et al. (E.E.U.U. 5.186.827), Wang et al. (E.E.U.U. 5.541.072), Liberti et al. (E.E.U.U. 5.466.574), y Terstappen et al. (E.E.U.U. 6.623.983). En ciertas realizaciones, la captura magnética se logra con una alta eficacia utilizando una célula de
40 captura de flujo continuo con un número de barras de imanes fuertes de tierras raras colocados perpendicularmente al flujo de la muestra. Cuando se usa una cámara de flujo con sección transversal de flujo de 0,5 mm x 20 mm (h x w) y 7 barras de imanes de NdFeB, la velocidad de flujo puede ser tan alta como 5 ml/min o más, mientras se logra una eficacia de captura cercana al 100%.

45 El tipo de separación magnética descrito anteriormente produce una captura eficaz de un analito diana y la eliminación de la mayoría de los componentes restantes de una mezcla de muestra. Sin embargo, tal proceso puede generar una muestra que contiene un porcentaje de partículas magnéticas que no están unidas a analitos diana, así como entidades diana no específicas. Las entidades diana no específicas pueden, por ejemplo, estar unidas con una eficacia mucho menor, por ejemplo, el 1% del área de superficie, mientras que una diana de interés podría cargarse
50 al 50% o casi al 100% del área de superficie disponible o centros antigénicos disponibles. Sin embargo, incluso el 1% de carga puede ser suficiente para impartir la fuerza necesaria para atrapar en una célula de flujo de gradiente magnético o cámara de muestra.

La presencia de partículas magnéticas que no están unidas a analitos diana y entidades diana no específicas sobre la superficie que incluye los complejos diana/partícula magnética puede interferir con la capacidad de detectar con
55 éxito la diana de interés. La captura magnética de la mezcla resultante, y el contacto cercano de las partículas magnéticas entre sí y las dianas unidas, dan como resultado la formación de un agregado que es difícil de dispensar y que puede ser resistente o inadecuado para el procesamiento posterior o las etapas de análisis. Con el fin de eliminar partículas magnéticas que no están unidas a analitos diana y entidades diana no específicas, los métodos de la invención pueden implicar además lavar la superficie con una solución de lavado que reduce la agregación de
60 partículas, aislando así los complejos diana/partícula magnética de las partículas magnéticas que no se han unido a los analitos diana y entidades diana no específicas. La solución de lavado minimiza la formación de agregados.

Los métodos de la invención pueden usar cualquier solución de lavado que imparta una carga neta negativa a la partícula magnética que no sea suficiente para interrumpir la interacción entre el resto específico de la diana de la partícula magnética y el analito diana. Sin estar limitado por ninguna teoría o mecanismo de acción particular, se cree que la unión de las moléculas negativamente cargadas en la solución de lavado a partículas magnéticas proporciona carga neta negativa a las partículas y facilita la dispersión de las partículas agregadas no específicamente. Al mismo tiempo, la carga neta negativa no es suficiente para interrumpir la fuerte interacción entre el resto específico de la diana de la partícula magnética y el analito diana (p. ej., una interacción antígeno-anticuerpo). Soluciones a modo de ejemplo incluyen heparina, Tris-HCl, Tris-borato-EDTA (TBE), Tris-acetato-EDTA (TAE), Tris-cacodilato, HEPES (ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinetanosulfónico), PBS (solución salina tamponada con fosfato), PIPES (piperazin-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico), MES (ácido (2-N-morfolino)-etanosulfónico), Tricina (N-(Tri(hidroxi-metil)metil)glicina), y agentes tamponantes similares. En ciertas realizaciones, sólo se realiza un único ciclo de lavado. En otras realizaciones, se realiza más de un ciclo de lavado.

En realizaciones particulares, la solución de lavado incluye heparina. Para realizaciones en las que la muestra de fluido corporal es sangre, la heparina también reduce la probabilidad de coagulación de los componentes sanguíneos después de la captura magnética. Las dianas unidas se lavan con tampón que contiene heparina de 1 - 3 veces para eliminar los componentes de la sangre y para reducir la formación de agregados.

Una vez aislados los complejos diana/partícula magnética, se puede analizar la diana mediante una multitud de tecnologías existentes, como RMN en miniatura, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), espectrometría de masas, marcaje fluorescente y visualización mediante observación microscópica, hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH), pruebas de sensibilidad a antibióticos basadas en el crecimiento, y variedad de otros métodos que se pueden realizar con una diana purificada sin contaminación significativa de otros componentes de la muestra. En una realización, las bacterias aisladas se lisan con una solución caotrópica, y el ADN se une a la resina de extracción de ADN. Después del lavado de la resina, el ADN bacteriano se eluye y se usa en RT-PCR cuantitativa para detectar la presencia de unas especies específicas y/o subclases de bacteria.

En otra realización, se eliminan las bacterias capturadas de las partículas magnéticas a las que están unidas y la muestra procesada se mezcla con anticuerpos marcados fluorescentes específicos para las bacterias o con tinción fluorescente de Gram. Después de la incubación, la mezcla de reacción se filtra a través de un filtro de 0,2 μm a 1,00 μm para capturar las bacterias marcadas mientras permite a la mayoría de las perlas libres marcadas con fluorescencia pasar a través del filtro. Las bacterias se visualizan en el filtro usando técnicas microscópicas, p. ej., observación microscópica directa, escaneo láser u otros métodos automatizados de captura de imagen. La presencia de bacterias se detecta a través del análisis de imágenes. Después de la detección positiva mediante técnicas visuales, las bacterias se pueden caracterizar adicionalmente mediante PCR o métodos genómicos.

La detección de bacterias de interés puede realizarse mediante el uso de sondas de ácido nucleico siguiendo procedimientos que son conocidos en la técnica. Se describen procedimientos adecuados para la detección de bacterias usando sondas de ácidos nucleicos, por ejemplo, en Stackebrandt et al. (E.E.U.U. 5.089.386), King et al. (WO 90/08841), Foster et al. (WO 92/15883), y Cossart et al. (WO 89/06699). Un ensayo con sonda de ácido nucleico adecuado generalmente incluye el tratamiento de la muestra y la lisis, la hibridación con la(s) sonda(s) seleccionada(s), captura híbrida, y detección. Es necesaria la lisis de la bacteria para liberar el ácido nucleico para las sondas. Las moléculas diana de ácido nucleico se liberan mediante tratamiento con cualquiera de varios agentes de lisis, que incluyen álcali (como NaOH), sales de guanidina (como tiocianato de guanidina), enzimas (como lisozima, mutanolisina y proteinasa K), y detergentes. La lisis de la bacteria, por lo tanto, libera tanto ADN como ARN, particularmente ARN ribosómico y ADN cromosómico, los cuales pueden utilizarse como las moléculas diana con la selección apropiada de una sonda adecuada. El uso del ARN como la(s) molécula(s) diana(s) puede ser ventajoso porque los ARNr constituyen un componente significativo de la masa celular, proporcionando así una abundancia de moléculas diana. El uso de las sondas de ARNr también mejora la especificidad de las bacterias de interés, es decir, la detección positiva sin reactividad cruzada indeseable que puede dar lugar a falsos positivos o a una detección falsa.

La hibridación incluye la adición de las sondas de ácido nucleico específicas. En general, la hibridación es el procedimiento por el que se combinan dos ácidos nucleicos, parcialmente o completamente complementarios, en condiciones de reacción definidas, de forma antiparalela para formar enlaces de hidrógeno específicos y estables. La selección o astringencia de las condiciones de hibridación/reacción se define por la longitud y la composición de bases del dúplex sonda/diana, así como por el nivel y la geometría del emparejamiento incorrecto entre las dos cadenas de ácido nucleico. La astringencia también se rige por los parámetros de reacción como la temperatura, los tipos y las concentraciones de los agentes desnaturizantes presentes y el tipo y la concentración de las especies iónicas presentes en la solución de hibridación.

La fase de hibridación del ensayo de la sonda de ácido nucleico se realiza con una única sonda seleccionada o con una combinación de dos, tres o más sondas. Se seleccionan las sondas que tengan secuencias que son homólogas a secuencias de ácido nucleico únicas del organismo diana. En general, se utiliza una primera sonda de captura para capturar moléculas híbridadas formadas. La molécula híbrida se detecta después mediante el uso de la reacción de anticuerpos o mediante el uso de una segunda sonda detectora que puede marcarse con un radioisótopo (como fósforo-32) o un marcador fluorescente (como fluoresceína) o un marcador quimioluminiscente.

La detección de bacterias de interés también puede realizarse mediante el uso de técnicas de PCR. Se describe una técnica de PCR adecuada, por ejemplo, en Verhoef et al. (WO 92/08805). Tales protocolos se pueden aplicar directamente a la bacteria capturada en las perlas magnéticas. La bacteria se combina con un tampón de lisis y las moléculas diana de ácido nucleico recogidas se utilizan a continuación como molde para la reacción de PCR.

5 Para la detección de las bacterias seleccionadas mediante el uso de anticuerpos, las bacterias aisladas se ponen en contacto con anticuerpos específicos de la bacteria de interés. Como se indicó anteriormente, se pueden utilizar anticuerpos policlonales o monoclonales, pero en cualquier caso tener afinidad por la bacteria particular a detectar. Estos anticuerpos se adherirán/unirán al material de la bacteria diana específica. Con respecto al marcaje de los anticuerpos, estos se marcan directa o indirectamente con marcadores usados en otros inmunoensayos conocidos.
 10 Los marcadores directos pueden incluir moléculas fluorescentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes, radioactivas, metálicas, de biotina o enzimáticas. Los métodos para combinar estos marcadores con anticuerpos u otras macromoléculas son bien conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos incluyen los métodos de Hijmans, W. et al. (1969), Clin. Exp. Immunol. 4, 457-, para isotiocianato de fluoresceína, el método de Goding, J. W. (1976), J. Immunol. Meth. 13, 215-, para isotiocianato de tetrametilrodamina, y el método de Ingrassia, E. (1980), Meth. in Enzymol. 70, 419-439 para enzimas.

Estos anticuerpos detectores también pueden marcarse indirectamente. En este caso, la molécula de detección real se une a un anticuerpo secundario u otra molécula con afinidad de unión por el anticuerpo antibacteriano de la superficie de la célula. Si se usa un anticuerpo secundario, es preferible un anticuerpo general para una clase de anticuerpo (IgG e IgM) de la especie animal usada para crear los anticuerpos antibacterianos de la superficie celular.
 20 Por ejemplo, el segundo anticuerpo puede conjugarse con una enzima, ya sea fosfatasa alcalina o a peroxidasa. Para detectar el marcaje, después de poner en contacto la bacteria de interés con el segundo anticuerpo y del lavado, el componente aislado de la muestra se sumerge en una solución que contiene un sustrato cromogénico para fosfatasa alcalina o peroxidasa. Un sustrato cromogénico es un compuesto que puede ser escindido por una enzima para dar como resultado la producción de algún tipo de señal detectable que solo aparece cuando el sustrato se escinde de la molécula base. El sustrato cromogénico es incoloro, hasta que reacciona con la enzima, en ese momento se crea un producto intensamente coloreado. Por lo tanto, el material de las colonias de bacterias adheridas a la lámina de membrana se convertirá en un intenso color azul/morado/negro, o marrón/rojo, mientras que el material de otras colonias permanecerá incoloro. Ejemplos de moléculas de detección incluyen sustancias fluorescentes, como 4-metilumbeliferil fosfato, y sustancias cromogénicas, como 4-nitrofenilfosfato, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina y 2,2'-azino-di-[3-etilbenz-tiazoliano sulfonato (6)]. Además de la fosfatasa alcalina y la peroxidasa, otras enzimas útiles incluyen β -galactosidasa, β -glucuronidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, α -manosidasa, galactosa oxidasa, glucosa oxidasa y hexoquinasa.

La detección de bacterias de interés usando RMN puede realizarse de la siguiente manera. El uso de RMN como metodología de detección, en la que una muestra se distribuye a una bobina detectora centrada en un imán, puede suministrarse la diana de interés, como una bacteria marcada magnéticamente, mediante un medio fluido, como un fluido sustancialmente compuesto de agua. En tal caso, la diana marcada magnéticamente puede ir desde una región de campo magnético muy bajo a una región de campo magnético alto, por ejemplo, un campo producido por un imán de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 Tesla. De esta manera, la muestra puede atravesar un gradiente magnético, en el camino hacia el imán y al salir del imán. Como se puede ver a través de las ecuaciones 1 y 2 a continuación, la diana puede experimentar una fuerza que tira hacia el imán en la dirección del flujo de muestra en el camino hacia el imán, y una fuerza dentro del imán en la dirección opuesta al flujo en el camino de salida del imán. La diana puede experimentar una fuerza de retención atrapando a la diana en el imán si el flujo no es suficiente para superar la fuerza del gradiente.

45	$m \cdot \dot{B} = F$	Ecuación 1
	$v_i = -F / (6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r^3)$	Ecuación 2

donde η es la viscosidad, r es el diámetro de la perla, F es la fuerza del vector, B es el campo del vector y m es el momento del vector de la perla.

Los campos magnéticos en una ruta hacia el imán pueden ser no uniformes en la dirección transversal con respecto al flujo dentro del imán. Como tal, puede haber una fuerza transversal que atraiga a las dianas al lado de un contenedor o un conducto que proporcione el flujo de la muestra hacia el imán. En general, el tiempo que tarda una diana en llegar a la pared de un conducto está asociado con la velocidad terminal y es menor con el aumento de la viscosidad. La velocidad terminal está asociada con la fuerza de arrastre, que puede ser indicativa del flujo de deslizamiento en ciertos casos. En general, puede ser ventajoso tener una alta viscosidad para proporcionar una mayor fuerza de arrastre de modo que una diana tenderá a ser transportada con el flujo de fluido a través del imán sin quedar atrapada en el imán o contra las paredes del conducto.
 55

Los fluidos Newtonianos tienen una característica de flujo en un conducto, como una tubería redonda, por ejemplo, que es parabólica, de modo que la velocidad del flujo es cero en la pared y máxima en el centro, y que tiene una característica parabólica con el radio. La velocidad disminuye en una dirección hacia las paredes, y es más fácil atrapar magnéticamente las dianas cerca de las paredes, ya sea con fuerza de gradientes transversales en la diana

hacia la pared del conducto, o en gradientes longitudinales suficientes para prevenir el flujo de la diana en la tubería en cualquier posición. Con el fin de proporcionar una fuerza de arrastre de fluido favorable para evitar que las muestras queden atrapadas en el conducto, puede ser ventajoso tener una condición de flujo de pistón, en donde la velocidad del fluido sea sustancialmente uniforme en función de la posición radial en el conducto.

5 Cuando se emplea la detección de RMN en relación con una muestra que fluye, la detección puede basarse en una perturbación de la señal de agua de RMN originada por una diana marcada magnéticamente (Sillerud et al., JMR (Journal of Magnetic Resonance), vol. 181, 2006). En tal caso, la muestra se puede excitar a tiempo 0, y después de algún retraso, como aproximadamente 50 ms o aproximadamente 100 ms, puede producirse una medición aceptable (basada en una señal de RMN detectada). Alternativamente, tal medición puede producirse inmediatamente
10 después de la excitación, con la detección que continúa por algún tiempo, como aproximadamente 50 ms o aproximadamente 100 ms. Puede ser ventajoso detectar la señal de RMN durante periodos de tiempo sustancialmente más largos después de la excitación.

A modo de ejemplo, la detección de la señal de RMN puede continuar durante un periodo de aproximadamente 2 segundos con el fin de grabar información espectral a alta resolución. En el caso del flujo parabólico o Newtoniano, la perturbación excitada a tiempo 0 típicamente se ensucia porque el agua alrededor de la fuente de perturbación
15 viaja a diferente velocidad, dependiendo de la posición radial en el conducto. Además, puede perderse información espectral debido a los efectos de difuminado o mezclado del movimiento diferencial del fluido de muestra durante la detección de la señal. Cuando se lleva a cabo una aplicación de detección de RMN que implica una muestra de fluida que fluye, puede ser ventajoso proporcionar un flujo de muestra similar a un pistón para facilitar el contraste RMN deseable y/o la detección deseable de la señal RMN.
20

El movimiento diferencial dentro de un fluido Newtoniano que fluye puede tener efectos perjudiciales en ciertas situaciones, como una situación en la que se desea la detección de RMN espacialmente localizada, como en la imagen de resonancia magnética. En un ejemplo, un objeto magnético, como una bacteria marcada magnéticamente, se hace fluir a través del detector de RMN y su presencia y ubicación se detectan usando técnicas
25 de MRN. La detección puede ser posible debido al campo magnético del objeto magnético, ya que este campo perturba el campo magnético del fluido en las proximidades del objeto magnético. La detección del objeto magnético mejora si el fluido cerca del objeto permanece cerca del objeto. En estas condiciones, se puede permitir que actúe más tiempo la perturbación magnética sobre cualquier elemento de volumen dado del fluido, y los elementos de volumen del fluido así afectados permanecerán en proximidad espacial cercana. Dicha perturbación magnética más fuerte y más localizada se detectará más fácilmente usando técnicas de RMN o MRI.
30

Si se usa un fluido Newtoniano para transportar los objetos magnéticos a través del detector, la velocidad de los elementos de volumen del fluido dependerá de la posición radial en el conducto de fluido. En tal caso, el fluido cerca de un objeto magnético no permanecerá cerca del objeto magnético mientras el objeto fluye a través del detector. El efecto de la perturbación magnética del objeto sobre el fluido circundante puede extenderse en el espacio, y la
35 intensidad de la perturbación en cualquier elemento de volumen del fluido puede reducirse porque ese elemento no permanece dentro del intervalo de la perturbación. La perturbación más débil y menos localizada en el fluido de muestra puede ser indetectable usando técnicas de RMN o MRI.

Ciertos líquidos o mezclas de líquidos exhiben perfiles de flujo no parabólicos en conductos circulares. Tales fluidos pueden exhibir perfiles de flujo no Newtonianos en otras formas de conducto. El uso de tal fluido puede ser ventajoso como el fluido de detección en una aplicación que emplea un dispositivo de detección basado en RMN. Cualquiera de tales efectos ventajosos puede ser atribuible a la alta viscosidad del fluido, a su perfil de flujo similar a un pistón asociado con el fluido, y/u otra(s) característica(s) atribuida(s) al fluido que facilita la detección. Como ejemplo, un fluido de pseudoplasticidad de alta viscosidad puede exhibir un perfil de velocidad de flujo que es sustancialmente uniforme a través de las regiones centrales de la sección transversal del conducto. El perfil de
40 velocidad de dicho fluido puede pasar a un valor cero o muy bajo cerca o en las paredes del conducto, y esta región de transición puede confinarse a una capa muy delgada cerca de la pared.
45

No todos los fluidos, o todas las mezclas de fluidos, son compatibles con la metodología de detección de RMN. En un ejemplo, una mezcla de glicerol y agua puede proporcionar una alta viscosidad, pero la medición de RMN se degrada porque se detectan señales de RMN separadas del agua y de las moléculas de glicerol que forman la
50 mezcla. Esto puede debilitar la sensibilidad del detector de RMN. En otro ejemplo, puede elegirse el componente no acuoso de la mezcla de fluidos para que no tenga señal de RMN, lo que se puede lograr usando un componente fluido perdeuterado, por ejemplo, o usando un componente fluido perfluorado. Este enfoque puede sufrir la pérdida de la intensidad de la señal ya que una porción del fluido en la bobina de detección no produce una señal.

Otro enfoque puede ser usar un componente fluido secundario que constituye solo una pequeña fracción de la mezcla del fluido total. Tal componente de fluido secundario de baja concentración puede producir una señal de RMN que es de intensidad insignificante cuando se compara con la señal del componente principal del fluido, que puede ser agua. Puede ser ventajoso usar un componente de fluido secundario de baja concentración que no produzca una señal de RMN en el detector. Por ejemplo, se puede usar un componente fluido secundario perfluorado o perdeuterado.
55

La mezcla de fluidos usada en el detector de RMN puede incluir uno, dos o más de dos componentes secundarios además del componente fluido principal. Los componentes de fluido empleados pueden actuar en concierto para producir las características de flujo de fluido deseadas, como alta viscosidad y/o flujo de pistón. Los componentes de fluido pueden ser útiles para proporcionar características de fluido que son ventajosas para el rendimiento del detector de RMN, por ejemplo, proporcionando tiempos de relajación de RMN que permiten una operación más rápida o intensidades de señal más altas.

Un fluido no Newtoniano puede proporcionar ventajas adicionales para la detección de objetos mediante técnicas de RMN o MRI. Como un ejemplo, todos los objetos que se detectan pueden tener todos sustancialmente la misma velocidad a medida que pasan por la bobina de detección. Esta característica de velocidad puede permitir algoritmos más simples o más robustos para el análisis de los datos de detección. Como otro ejemplo, los objetos que se detectan pueden tener velocidad fija, conocida y uniforme. Esto puede ser ventajoso en dispositivos donde es necesaria la posición del objeto detectado en tiempos posteriores, como por ejemplo en un dispositivo que tiene una cámara de secuestro o una cámara de detección secundaria corriente debajo de la bobina de detección de RMN o IRM.

En una realización a modo de ejemplo, se logró con éxito el suministro de la muestra dentro y fuera de un imán cilíndrico de 1,7 T usando un medio de suministro de fluido que contiene de 0,1% a 0,5% de goma de Xantano en agua. Tal suministro es adecuado para proporcionar un flujo sustancialmente tipo pistón, alta viscosidad, como de aproximadamente 10 cP a aproximadamente 3000cP, y un buen contraste de RMN en relación al agua. La goma de Xantano actúa como un fluido no Newtoniano, que tiene características de un fluido no Newtoniano que son bien conocidas en la técnica, y no compromete las características de señal de RMN deseables para una buena detección en un modo de operación deseable.

En ciertas realizaciones, los métodos de la invención son útiles para la detección directa de bacterias de sangre. Dicho proceso se describe aquí. Se recoge la muestra en tubo de heparina sódica por venopunción, el volumen de muestra aceptable es aproximadamente 1 ml a 10 ml. La muestra se diluye con tampón de unión y se añaden a la muestra partículas superparamagnéticas que tienen restos de unión específicos a la diana, seguido de incubación en un incubador con agitación a 37°C durante aproximadamente 30 min a 120 min. También se pueden usar métodos alternativos de mezcla. En una realización particular, la muestra se bombea a través de un mezclador estático, de manera que el tampón de reacción y las perlas magnéticas se añaden a la muestra a medida que la muestra se bombea a través del mezclador. Este proceso permite la integración eficaz de todos los componentes dentro de una única parte fluida, evita partes móviles y separa los recipientes de incubación y reduce el tiempo de incubación.

La captura de las dianas marcadas permite la eliminación de componentes sanguíneos y la reducción del volumen de muestra de 30 ml a 5 ml. La captura se realiza en una variedad de configuraciones de imán/flujo. En ciertas realizaciones, los métodos incluyen la captura en un tubo de muestra en una plataforma de agitación o la captura en un dispositivo de flujo continuo a una velocidad de flujo de 5 ml/min, lo que da como resultado un tiempo de captura total de 6 min.

Después de la captura, la muestra se lava con tampón de lavado que incluye heparina para eliminar los componentes sanguíneos y liberar las perlas. Se optimiza la composición del tampón de lavado para reducir la agregación de perlas libres, al tiempo que se mantiene la integridad de los complejos perla/diana.

El método de detección se basa en un detector de RMN en miniatura calibrado a la resonancia magnética del agua. Cuando la muestra es magnéticamente homogénea (sin dianas unidas), la señal de RMN del agua es claramente detectable y fuerte. La presencia de material magnético en la bobina del detector perturba el campo magnético, lo que da como resultado una reducción de la señal del agua. Uno de los principales beneficios de este método de detección es que no hay antecedentes magnéticos en las muestras biológicas, lo que reduce significativamente los requisitos de rigurosidad en el procesamiento de la muestra. Además, dado que la señal detectada es generada por agua, hay una amplificación de señal incorporada que permite la detección de una única bacteria marcada.

Este método proporciona el aislamiento y la detección de tan solo o incluso menos de 1 UFC/ml de bacterias en una muestra de sangre.

Ejemplos

Ejemplo 1. Muestra

Se enriquecieron muestras de sangre de voluntarios sanos con concentraciones de bacterias clínicamente relevantes (1-10 UFC/ml), que incluyen tanto cepas de laboratorio como los aislados clínicos de las especies bacterianas que se encuentran con mayor frecuencia en las infecciones del torrente sanguíneo.

Ejemplo 2. Preparación del anticuerpo

Con el fin de generar IgG policlonal, pan-específica de bacterias Gram-positivas, se inmunizó una cabra mediante primera administración de antígenos bacterianos suspendidos en adyuvante completo de Freund dentro del nódulo

linfático, seguido de inyección subcutánea de antígenos bacterianos en adyuvante incompleto de Freund en intervalos de 2 semanas. Se prepararon los antígenos para la producción de anticuerpos cultivando bacterias a fase exponencial ($OD_{600} = 0,4-0,8$). Después de recoger las bacterias por centrifugación, las bacterias se inactivaron usando fijación con formalina en formaldehído al 4% durante 4 horas a 37°C. Después de 3 lavados de bacterias en PBS (15 min de lavado, centrifugación durante 20 min a 4000 rpm) se midió la concentración de antígeno usando el ensayo de BCA y se usó el antígeno a 1 mg/ml para la inmunización. Con el fin de generar IgG específica de bacterias Gram-positivas, se usaron varias especies bacterianas para la inoculación: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*.

El suero inmune se purificó usando cromatografía de afinidad en una columna de proteína G sepharosa (GE Healthcare), y se determinó la reactividad usando ELISA. Se eliminaron los anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con bacterias Gram-negativas y hongos mediante absorción de IgG purificada con bacterias Gram-negativas y hongos fijados con formalina. Los organismos fijados en formalina se prepararon de forma similar a la descrita anteriormente y se mezclaron con IgG. Después de la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente, se centrifugó la preparación para eliminar las bacterias. La preparación final de anticuerpo se clarificó mediante centrifugación y se usó para la preparación de perlas magnéticas específicas de antígeno.

Ejemplo 3. Preparación de perlas magnéticas específicas de antígeno

Las perlas superparamagnéticas se sintetizaron mediante encapsulación de nanopartículas de óxido de hierro (5-15 nm de diámetro) en un núcleo de látex y marcaje con IgG de cabra. Las nanopartículas que contienen ferrofluido en disolvente orgánico se precipitaron con etanol, las nanopartículas se resuspendieron en una solución acuosa de estireno y tensioactivo Hitenol BC-10, y se emulsionaron usando sonicación. La mezcla se dejó equilibrar durante toda la noche con agitación y se filtró a través de filtros de 1,2 y 0,45 μm para conseguir un tamaño de micela uniforme. Se añadieron estireno, ácido acrílico y divinilbenceno en tampón carbonato a pH 9,6. La polimerización se inició en una mezcla a 70°C con la adición de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ y se dejó completar la reacción durante toda la noche. Las partículas sintetizadas se lavaron 3 veces con SDS al 0,1% usando captura magnética, se filtraron a través de filtros de 1,2, 0,8 y 0,45 μm y se usaron para la conjugación con anticuerpos.

La producción de perlas dio como resultado una distribución de tamaños que se puede caracterizar por un tamaño promedio y una desviación estándar. En el caso de marcaje y extracción de bacterias de sangre, se encontró que el tamaño promedio para un rendimiento óptimo estaba entre 100 y 350 nm, por ejemplo, entre 200 nm y 250 nm.

La IgG purificada se conjugó a perlas preparadas usando química estándar. Después de la conjugación, las perlas se resuspendieron en BSA al 0,1% que se usa para bloquear sitios de unión no específicos en la perla y para aumentar la estabilidad de la preparación de la perla.

Ejemplo 4. Marcaje de células escasas usando un exceso de nanopartículas magnéticas

Las bacterias, presentes en sangre durante la infección en el torrente sanguíneo, se marcaron magnéticamente usando las perlas superparamagnéticas preparadas en el Ejemplo 3 anterior. Las muestras enriquecidas como se describe en el Ejemplo 1 se diluyeron 3 veces con un tampón de unión a base Tris y perlas específicas para la diana, seguido de incubación en una plataforma de agitación a 37°C hasta 2 horas. Después de la incubación, las dianas marcadas se separaron magnéticamente seguido de una etapa de lavado diseñada para eliminar los productos sanguíneos. Véase el ejemplo 5 a continuación.

Ejemplo 5. Captura magnética de bacterias unidas

La sangre que incluye las bacterias diana marcadas magnéticamente y perlas libres en exceso se inyectó en una célula de captura de flujo continuo con un número imanes de tierras raras de barra fuertes colocados perpendicularmente al flujo de la muestra. Con el uso de una cámara de flujo con una sección de flujo de sección transversal de 0,5 mm x 20 mm (h x w) y 7 barras de imanes de NdFeB se logró una velocidad de flujo tan alta como 5 ml/min. Después de hacer fluir la mezcla a través del canal en presencia del imán, se hizo fluir una solución de lavado que incluía heparina a través del canal. Las dianas unidas se lavaron una vez con tampón que contenía heparina para eliminar los componentes sanguíneos y para reducir la formación de agregados de partículas magnéticas. Con el fin de lavar eficazmente las dianas unidas, se retiró el imán y se resuspendió el material magnético capturado en el tampón de lavado, seguido de la re-aplicación del campo magnético y la captura del material magnético en la misma célula de captura de flujo continuo.

La eliminación de las dianas marcadas capturadas fue posible después de alejar los imanes de la cámara de captura y eluyendo con flujo de solución tampón.

REIVINDICACIONES

1. Un método para aislar bacterias de una muestra, el método que comprende las etapas de:
incubar una muestra que comprende bacterias en una mezcla, la mezcla que comprende:
5 un tampón para prevenir la lisis de células y reducir la agregación de partículas, el tampón que comprende hidrocloreuro de Tris(hidroximetil)-aminometano a una concentración de 75 mM, NaCl 300 mM, y Tween 20 al 0,1%, y en donde el tampón se mezcla en una proporción de 1:1 con la muestra; y
partículas magnéticas que tienen unido a ellas un resto de unión que se une específicamente a las bacterias, formando así complejos de bacterias/partícula;
10 hacer fluir la muestra a través de un canal de una célula de captura de flujo continuo y aplicar un campo magnético a la muestra que fluye para separar los complejos de bacterias/partícula de los componentes restantes en la muestra; y
aislar tan solo 1 UFC/ml de bacterias de la muestra.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la muestra es un tejido o un fluido corporal humano.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el fluido corporal es sangre.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la bacteria es una bacteria transmitida por la sangre.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la muestra es una muestra alimentaria.
- 20 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la bacteria es una bacteria transmitida por los alimentos.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además caracterizar la bacteria.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la etapa de caracterización comprende identificar la bacteria.
- 25 9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la identificación se selecciona a partir de la secuenciación del ácido nucleico derivado de la bacteria o la amplificación del ácido nucleico derivado de la bacteria.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la bacteria es gram positiva.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la bacteria es gram negativa.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además lavar la mezcla en una solución que imparte una carga neta negativa a las partículas magnéticas.
- 30 13. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el resto de unión es un anticuerpo.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además lavar la mezcla en una solución que reduce la agregación de partículas.