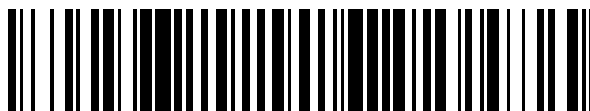


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 295**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 35/00** (2006.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

**G01J 3/00** (2006.01)

**G01J 3/44** (2006.01)

**G01N 21/65** (2006.01)

**B82Y 15/00** (2011.01)

**B82Y 25/00** (2011.01)

**G01N 1/40** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2007 E 07799772 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 2044402**

54 Título: **Aparato y procedimiento para la concentración y representación de partículas de ensayo**

30 Prioridad:

**24.07.2006 US 832921 P**

**05.04.2007 US 910246 P**

**05.04.2007 US 910256 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.09.2013**

73 Titular/es:

**BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)**

**1 Becton Drive**

**Franklin Lakes, NJ 07417-1880, US**

72 Inventor/es:

**NORTON, SCOTT, M.;**

**HOLLAND, EDWARD, ROBERT;**

**WALTON, IAN, D.;**

**CROMER, REMY y**

**STOERMER, REBECCA, LOUISE**

74 Agente/Representante:

**ZEA CHECA, Bernabé**

ES 2 422 295 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

Aparato y procedimiento para la concentración y representación de partículas de ensayo.

5 **Campo técnico**

La presente invención está dirigida a un aparato y un procedimiento para la concentración y representación de partículas asociadas a ciertos ensayos.

10 **Antecedentes de la invención**

Las partículas, y en particular las partículas magnéticas, paramagnéticas o superparamagnéticas, pueden utilizarse en ensayos de diagnóstico como captura o detección de especies en fase sólida. Los ensayos basados en micropartículas pueden dividirse en dos categorías principales: ensayos homogéneos (sin separación) y heterogéneos.

En un formato de ensayo homogéneo (sin separación), se mezclan y se miden reactivos de unión sin ninguna etapa posterior de lavado antes de la detección. Las ventajas de este sistema son una rápida cinética solución-fase, un formato de ensayo simple, una instrumentación más simple, así como menores costes debido a un menor número de etapas de ensayo, menores volúmenes y pocos residuos. Los ensayos inmunológicos homogéneos no requieren una separación física del analito unido y libre y, por lo tanto, puede ser más rápido y más fácil realizar entonces ensayos inmunológicos heterogéneos. Los sistemas de ensayos inmunológicos homogéneos que utilizan un tamaño de muestra pequeño, un bajo volumen de reactivo y pequeños tiempos de incubación, proporcionan un tiempo de respuesta rápido. Los inconvenientes de este tipo de ensayo pueden ser un rango dinámico y una sensibilidad limitados. Puesto que no hay separación de analito libre antes de la detección de la señal, la sensibilidad podría verse comprometida aún más. Además, las interferencias podrían provocar una gran señal de fondo por la interacción entre la muestra y la captura o los reactivos de detección. Los ensayos homogéneos son el formato de ensayo preferido en plataformas de cribado de alto rendimiento tales como AlphaScreen, SPA, ensayos basados en polarización fluorescente y citometría de flujo, así como en ensayos de diagnóstico tales como ensayos de aglutinación de partículas con nefelometría o turbidimetría como procedimientos de detección.

Varios tipos de ensayo implican la asociación de partículas de detección marcadas ópticamente a partículas de captura magnéticas. Cuando se utilizan partículas de captura magnéticas en un formato de ensayo homogéneo (sin separación), el comportamiento de las partículas en un campo magnético puede utilizarse para concentrar o diferenciar las partículas magnéticas y todo aquello que pueda unirse a éstas desde otros componentes del ensayo. En implementaciones de ensayo en las que las partículas de captura se unen o de otro modo se asocian a las partículas de detección marcadas ópticamente, resulta difícil utilizar tecnologías conocidas para concentrar las partículas de captura en el plano focal de un sistema de interrogación óptico. Si se desea que las partículas de captura magnéticas se concentren en un gránulo relativamente compacto y/o pequeño para la interrogación se introduce una dificultad adicional.

La presente invención está dirigida a superar uno o más de los problemas descritos anteriormente.

JP-A-04 348 277 (figuras 1-3) describe un examen clínico de un gran número de sustancias *in-vivo* mediante la concentración de partículas magnéticas que tienen un compuesto que contiene sustancias *in-vivo* unido a las mismas en la zona lateral de la parte de recepción de la solución de análisis de un reactor analítico. El concentrador magnético consiste en unos imanes 3 y un soporte 4 de manera que las partículas magnéticas que tienen una sustancia a medir y una sustancia tal como un anticuerpo unido a las superficies de las mismas se alojan en un recipiente analítico 2. Cuando los imanes 3 se encuentran dispuestos alrededor del recipiente 2 en cuatro direcciones en un mismo intervalo de tiempo, las partículas magnéticas en la parte de recepción de la solución de análisis del recipiente 2 son atraídas hacia los imanes 3 para moverse a través de una solución de análisis hacia la parte inferior de la pared lateral del recipiente. La sustancia marcada unida a la sustancia a medir reacciona con el compuesto formado por la reacción de unión de las partículas magnéticas y la sustancia a medir para medir la absorbencia o la transmisividad mediante un espectrofotómetro.

55 **Descripción de la invención**

La presente invención incluye un aparato de ensayo que tiene un recipiente de muestras en cuyo interior puede realizarse un ensayo. El aparato incluye, además, un soporte configurado para recibir operativamente el recipiente de muestras. La invención incluye, además, un imán asociado operativamente al soporte de manera que un campo magnético generado por el imán cruza una parte del recipiente de muestras definiendo una zona de concentración magnética dentro del recipiente de muestras. El imán puede ser un imán permanente o un electroimán. La invención comprende, además, un espectrómetro. El espectrómetro puede incluir también un aparato configurado específicamente para recibir y sujetar el recipiente de muestras de manera que el foco del espectrómetro quede dentro de la zona de concentración magnética del recipiente de muestras.

Las diversas realizaciones del aparato de ensayo descritas aquí son adecuadas para utilizarse con cualquier ensayo en el que partículas marcadas ópticamente lleguen a asociarse a partículas de captura magnéticas, paramagnéticas o superparamagnéticas. El término partículas magnéticas, tal como aquí se utiliza, incluye partículas magnéticas, partículas paramagnéticas, partículas superparamagnéticas convencionales o cualquier otro tipo de partícula afectada por un campo magnético. En una realización que se describe en detalle aquí, el espectrómetro es un espectrómetro Raman y las partículas detectoras marcadas ópticamente son nano-etiquetas SERS.

La invención incluye un recipiente de muestras, un soporte y un imán que definen una zona de concentración magnética, tal como se ha descrito anteriormente, e incluye un espectrómetro que puede asociarse operativamente al soporte de manera que el foco del espectrómetro queda dentro de la zona de concentración magnética cuando en el soporte o sobre el mismo se coloca un recipiente de muestras. En este aspecto de la presente invención se elimina una etapa intermedia de mover el recipiente de muestras desde el soporte/concentrador hacia un espectrómetro separado. Con una realización con funciones combinadas se consiguen dos ventajas importantes. La primera ventaja es una mejor precisión en la colocación de las partículas magnéticas (o en la definición de la zona de concentración magnética) dentro del recipiente de muestras, de manera que se mejora la repetibilidad de la medición, y se evita la posibilidad de resultados falsos negativos (faltando completamente el gránulo concentrado de partículas magnéticas). La segunda ventaja se refiere a la eliminación de la etapa de mover el recipiente de muestras del soporte/concentrador hacia un espectrómetro separado, de modo que la lectura de la muestra se reduce a una operación de una sola etapa. Además, se elimina el riesgo asociado de movimiento del gránulo dentro del recipiente de muestras o de disociación del gránulo durante la transferencia al espectrómetro, lo cual puede producir errores en la medición.

El aparato de la invención descrito aquí incluye, además, un dispositivo asociado al recipiente de muestras para estimular una concentración relativamente compacta de las partículas de captura magnéticas dentro de la zona de concentración magnética. Alternativamente, ciertos procedimientos descritos aquí pueden utilizarse para ayudar en la compactación y la concentración. Dispositivos representativos que pueden utilizarse para estimular una concentración relativamente compacta incluyen: un estimulador magnético que funcione haciendo pasar un campo magnético en movimiento a través de una parte del recipiente de muestras; un estimulador o vibrador mecánico o electromecánico configurado para sacudir, agitar o vibrar el recipiente de muestras; un transductor acústico que podría ser un transductor ultrasónico configurado para transmitir ondas acústicas a través del recipiente de muestras, pero sin limitarse a éstos. Procedimientos de compactación adecuados incluyen el uso de los dispositivos descritos anteriormente más la manipulación del recipiente con el fin de obligar al gránulo a que vuelva a formarse en una posición distinta en la pared del recipiente. Por ejemplo, la manipulación puede incluir la extracción del tubo del campo magnético y su sustitución en una orientación alternativa, o extraer y volver a aplicar el imán o imanes en una posición diferente en el tubo. Además, los procedimientos de compactación mejorados pueden aplicarse con, o a través de, un aparato localizador separado, o un aparato que incluya un espectrómetro u otro dispositivo de interrogación.

La invención también incluye un procedimiento para realizar un ensayo. Realizaciones del procedimiento de la presente invención incluyen asociar partículas de captura magnéticas a partículas de detección ópticamente activas en un recipiente de muestras, concentrar magnéticamente las partículas de captura magnéticas en una zona de concentración del recipiente de muestras, y obtener un espectro de la zona de concentración magnética utilizando un aparato tal como se ha descrito anteriormente. Realizaciones del procedimiento incluyen estimular una concentración compacta agitando, haciendo vibrar mecánicamente, proyectando ondas acústicas, pasando un campo magnético en movimiento a través de una parte del recipiente de muestras, manipulando el recipiente de muestras, reordenando el campo magnético u otros medios.

En cada realización descrita es ventajoso minimizar la cantidad de fluido de ensayo que se encuentra fuera de la zona de concentración, pero a lo largo de la trayectoria óptica entre el espectrómetro y la zona de concentración. El aparato y las técnicas descritas para conseguir este objetivo incluyen posicionar los diversos componentes de modo que se provoque que la zona de concentración magnética se forme donde la trayectoria óptica cruza inicialmente el soporte de muestra, pero sin limitarse a éstos.

Varios ensayos que permiten el uso de partículas de captura magnéticas y partículas de detección marcadas ópticamente cuyos ensayos pueden implementarse con el aparato y los procedimientos descritos aquí se describen detalladamente en la solicitud también pendiente nº PCT/US07/61878 titulada "SERS NANOTAG ASSAYS".

#### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama esquemático de un recipiente de muestras y el soporte del recipiente de muestras. La figura 2 es un diagrama esquemático en planta de un recipiente de muestras y un conjunto de concentración magnética. La figura 3 es un diagrama esquemático en alzado de un recipiente de muestras y un soporte de recipiente de muestras.

La figura 4 es un diagrama esquemático en planta de un recipiente de muestras, aparato de concentración y espectrómetro integrado.

La figura 5 es una representación gráfica de un aumento de la intensidad de la señal en función del tiempo durante la captura de partículas magnéticas.

5 Las figuras 6A-C son diagramas esquemáticos de procedimientos de compactación de gránulos representativos.

La figura 7 es un diagrama esquemático de un ejemplo que presenta un tubo capilar ópticamente transparente como recipiente de muestras.

La figura 8 es un diagrama esquemático de un ejemplo alternativo que presenta un tubo capilar ópticamente transparente como recipiente de muestras.

10 La figura 9 es un diagrama esquemático de una realización con un recipiente de muestras de tubo capilar y de soporte para cartucho.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15 Tal como se utiliza en toda esta solicitud, el término "partículas magnéticas" se definirá como partículas magnéticas, partículas paramagnéticas, partículas superparamagnéticas convencionales o cualquier otra partícula que se vea afectada por un campo magnético. Pueden obtenerse determinadas ventajas al tener un aparato para la captura y concentración de partículas magnéticas que se utiliza con un ensayo en el que el aparato de captura y concentración es independiente de la instrumentación de detección/interrogación óptica u otra asociada. Por ejemplo, puede ser deseable minimizar el tiempo ocupado por muestras individuales en la unidad de interrogación óptica. Alternativamente, pueden obtenerse ventajas al tener un aparato de captura y concentración magnética integrado con un espectrómetro u otro dispositivo de interrogación óptica. Por ejemplo, un sistema de captura, concentración y representación totalmente integrado minimiza la posibilidad de una mala colocación o descompactación de un gránulo de partículas magnéticas concentradas ya que el recipiente de muestras no tiene que moverse entre la etapa de concentración e interrogación óptica. Por consiguiente, se describen en detalle a continuación ambas realizaciones de aparatos separados e integrados. Los tipos de aparatos que se describen aquí no son realizaciones que se excluyan entre sí. Pueden combinarse características de los diferentes tipos de aparatos descritos en un aparato híbrido para satisfacer las necesidades específicas de un usuario.

30 La figura 1 es un diagrama esquemático de una posible realización de un aparato de captura y concentración magnética 10 que puede implementarse como un aparato autónomo separado de cualquier unidad de interrogación óptica. El aparato de captura magnética 10 incluye un soporte 12 para uno o más recipientes de muestra 14. La figura 1 también muestra un receptáculo 16 en el soporte 12 configurado para sujetar el recipiente de muestras 14. El soporte particular 12, de la figura 1 está configurado para recibir y sujetar un recipiente de muestras 14 que es un tubo de microcentrifugadora. Para poner en práctica esta realización podrían utilizarse también otros tipos de tubos, recipientes, cavidades, cámaras, portaobjetos o superficies, incluyendo cualquier otra forma de recipiente de muestras concebible pero sin limitarse a éstos. En el caso de un recipiente de forma alternativa, un receptáculo dimensionado y conformado adecuadamente 16 se asociaría al soporte 12 para asegurar que la variedad seleccionada de recipiente de muestras 14 pueda posicionarse de manera rápida, precisa y repetible respecto al soporte 12.

En la figura 1 también se muestra un imán 18 asociado operativamente al soporte 12. En el ejemplo mostrado, el imán 18 es un imán permanente esférico posicionado debajo del extremo del receptáculo 16 para el recipiente de muestras 14. Dicho imán 18 puede utilizarse para afectar a un gradiente de campo magnético en todo el volumen suspendido de partículas magnéticas en el recipiente de muestras 14 y de este modo puede utilizarse para definir una zona de concentración magnética 20. En el ejemplo ilustrado en la figura 1, la zona de concentración magnética 20A se encuentra situada en el extremo inferior del receptáculo 16 y en el extremo inferior del recipiente de muestras 14 se forma una zona de concentración magnética correspondiente 20B cuando se coloca en el receptáculo 16.

50 Aunque en la figura 1 se muestra un imán esférico, para la aplicación de la presente invención es igualmente apropiada cualquier otra forma adecuada y tamaño relativo de los imanes, que pueden ser imanes permanentes o bien electroimanes. Por ejemplo, puede utilizarse un imán lineal para proporcionar un gránulo lineal que pueda ser barrido a lo largo de una longitud. Además, puede ser deseable en ciertas implementaciones modificar el perfil del campo magnético generado utilizando una combinación de un imán más una "pieza polar" construida a partir de un material ferromagnético adecuado, por ejemplo, aleaciones de acero u otros materiales adecuados conocidos por los expertos en la materia. Este enfoque puede utilizarse para optimizar el patrón de campo magnético para el propósito de concentración y localización de partículas magnéticas.

Adicionalmente, pueden utilizarse recipientes de muestra que tengan cualquier número de formas personalizadas para poner en práctica el aparato de una manera eficaz. La forma personalizada puede incluir un resalte o una hendidura u otra estructura o forma en la zona de concentración magnética 20 que se ha descrito anteriormente o cerca de la misma. La forma personalizada puede afectar a la naturaleza del gránulo formado en la etapa de concentración. El desarrollo de un gránulo magnético concentrado, bien formado, y consistente a partir de partículas de captura magnéticas y etiquetas ópticas asociadas es una función de la arquitectura del campo magnético, así como la morfología del tubo de muestra en la zona de concentración magnética 20. De este modo, el tamaño y la

forma del gránulo concentrado puede alterarse modificando la forma de la superficie de las partículas de captura magnéticas que se recogen sobre ésta o dentro de la misma. Por lo tanto, la arquitectura del tubo personalizada con una hendidura (o cúspide) u otra estructura o forma conformada en la zona de concentración magnética o cerca de la misma podría ayudar en la formación de un gránulo magnético que tenga un tamaño, forma y consistencia reproducible. Por ejemplo, puede utilizarse una cúspide cóncava para formar un gránulo esférico en la parte inferior o lateral de un recipiente de recogida personalizado.

Pueden idearse otras configuraciones o formas asociadas a un recipiente para facilitar la formación de un gránulo concentrado de una forma y un tamaño seleccionados. De este modo, el recipiente de muestras 14 tiene 4 funciones principales:

- 1) Proporciona un entorno sellado para la contención de los reactivos de ensayo, y para la realización de la reacción de ensayo.
- 2) Puede tener una forma específica o puede incluir una parte formada específicamente propicia para la concentración de partículas magnéticas mediante la aplicación de un campo magnético.
- 3) Es sensiblemente transparente a la radiación asociada a realizar una observación de los reactivos dentro del tubo.
- 4) Tiene una forma general que se ajusta repetidamente y con precisión al interior de un soporte.

El material del recipiente de muestras 14 debe ser compatible con los reactivos y sustancias del analito destinados para utilizarse en el ensayo. Pueden aplicarse al recipiente determinados recubrimientos químicos o biológicos para evitar la unión no específica de partículas magnéticas, etiquetas ópticas o analito a las paredes del recipiente. El recipiente de muestras 14 debe fabricarse en un material no magnético, de manera que un campo magnético aplicado desde una fuente externa pase a través del recipiente de muestras 14 sin que se vea afectado. Por otra parte, debe diseñarse de manera que se tenga en cuenta la distancia máxima que recorrerían los reactivos hacia el punto de localización. Esto regula la velocidad y la eficacia de la captura magnética, ya que la fuerza de atracción disminuye rápidamente a medida que aumenta la distancia desde el sistema de imanes. Además, la forma del recipiente de muestras 14 puede ser útil en la concentración de las partículas y la formación de gránulos, a través de la forma general del recipiente o a través de una estructura especial, tal como una hendidura o cúspide tal como se ha descrito anteriormente. El recipiente de muestras 14 también proporciona un medio para la colocación precisa en soportes para concentración magnética, o medición espectroscópica.

La forma del recipiente de muestras 14 puede incluir características geométricas externas, marcadores o signos 22, para mejorar la repetibilidad de posicionamiento, y evitar una inserción incorrecta del recipiente dentro del aparato de soporte. Las características de posicionamiento podrían incluir (pero sin limitarse a éstas) la inclusión de secciones planas, chavetas, puntos de referencia, etc. Éstas se corresponderían con características similares en un receptáculo de recipientes diseñado específicamente asociado a localización magnética, medición espectroscópica o combinación de estas funciones, todo tal como se describe aquí.

En realizaciones en las que la interrogación del ensayo se realiza ópticamente, típicamente se aplica una salida de láser exclusivo al gránulo concentrado. Así, el recipiente de muestras 14 debe ser sensiblemente transparente en la zona de longitud de onda de interrogación de láser deseada. Por otra parte, es deseable asegurar que la zona de localización tenga unas propiedades ópticas compatibles con el sistema de lentes del espectrómetro u otro dispositivo de detección. Pueden ser deseables superficies ópticas planas que permitan la entrada y salida de luz de excitación y emitida con mínima refracción, reflexión o dispersión. Alternativamente, pueden ser beneficiosas superficies con curvatura en una o más dimensiones para funcionar como lentes. Además, el diseño del recipiente debe permitir la presencia simultánea de un sistema localizador magnético y el funcionamiento del espectrómetro en caso de que ambas funciones se encuentren incluidas en un solo instrumento. La zona de concentración magnética 20 puede encontrarse en cualquier posición en el recipiente de muestras 14 propicia para la capacidad para concentrar y localizar los reactivos de ensayo y realizar mediciones ópticas. Esto incluye (pero sin limitarse a ello) la parte inferior, la pared lateral o la tapa superior del recipiente de muestras 14.

Las distintas realizaciones descritas aquí son particularmente ventajosas para la concentración de partículas de captura magnéticas asociadas a nano-etiquetas SERS o etiquetas SERS similares como partículas de detección marcadas ópticamente. Las nano-etiquetas SERS tienen un núcleo activo SERS asociado a una molécula informante Raman que puede ser interrogada a través de una espectroscopia Raman. En consecuencia, resulta útil en cualquier aplicación de la presente invención que cuente con espectroscopia Raman en la que el material del recipiente de muestras 14 sea transparente a la dispersión de luz Raman. Por ejemplo, el aparato ilustrado esquemáticamente en la figura 1 presenta un recipiente de muestras 14 que es un tubo de microcentrifugadora que está realizado típicamente en polipropileno. La principal limitación respecto a la espectroscopia Raman es que la pared del recipiente de muestras 24 no interfiere por la absorción en las longitudes de onda de excitación de láser, incluyendo, pero sin limitarse a ello, longitudes de onda de 633 nm o 785 nm, así como las longitudes de onda de emisión Raman subsiguientes. En efecto, un material ideal tampoco contribuiría en interferencia y/o fluorescencia Raman a estas longitudes de onda de excitación. Una amplia variedad de recipientes de ensayo de bajo coste y de uso común cumple con este criterio, incluyendo placas de 96 cavidades u otro número, diversos tubos, viales, tubos

Vacutainer, superficies de portaobjetos, cubetas u otras superficies o contenedores. Los materiales en los que están fabricados estos recipientes o superficies pueden seleccionarse de la siguiente lista no exhaustiva: vidrio, sílice, silicio, vidrio siliconado, polipropileno, polietileno, poliuretano, teflón, poliestireno, nitrocelulosa, celulosa, poliéster y policarbonato. También serían adecuados para la fabricación de un recipiente de muestras 14 otros materiales que no interfieran con la luz láser en las longitudes de onda pertinentes.

En la disposición mostrada en la figura 1, es importante que el recipiente de muestras 14 quede sujeto en el receptáculo 16 de manera precisa y repetible como sea posible respecto a la posición del imán 18. La precisión de la colocación del recipiente de muestras 14 garantiza que el gránulo de partículas de captura magnéticas formado durante cualquier etapa de concentración se desarrolle en una posición consistente y con un tamaño y una forma consistente. En una realización, al disponer un soporte 10 que es independiente de cualquier espectrómetro, el recipiente de muestras 14 debe retirarse y colocarse en un espectrómetro óptico para determinar ópticamente el contenido de las partículas marcadas ópticamente asociadas a las partículas de captura magnéticas en el interior de el gránulo. En consecuencia, es imperativo que el recipiente de muestras 14, el soporte 12 y el imán 18 estén configurados de manera que la zona de concentración magnética 20 coincida con el plano focal de la óptica del espectrómetro cuando el recipiente de muestras 14 se introduce en un espectrómetro separado. Por ejemplo, tal como se ilustra en la figura 1, el gránulo se forma en la punta de un tubo de microcentrifugadora ajustando el eje magnético del imán 18 con el eje central longitudinal del tubo de microcentrifugadora. La exacta colocación de la parte inferior del tubo de microcentrifugadora se consigue permitiendo que se asiente en un rebaje cónico 26 del receptáculo 16 de manera que quede centrado por sí mismo de manera automática. La geometría de la cavidad 26 puede replicarse en un soporte separado en el plano focal de un espectrómetro.

Las figuras 2 y 3 son vistas esquemáticas en planta y alzado de una realización alternativa del soporte de la muestra 10 con una formación de gránulos en el lado del recipiente de muestras 14 en lugar de en la punta inferior. En la realización que se muestra en las figuras 2 y 3, el recipiente es un tubo de microcentrifugadora, pero es aplicable a otros recipientes con diferente geometría de pared. La realización de la figura 2 y la figura 3 incluye las siguientes características:

- El recipiente de muestras 14 está contenido en el receptáculo 16 de un soporte 12 en una posición segura y precisa. A través de la incorporación opcional de superficies de referencia o puntos de referencia se garantiza un posicionamiento preciso de repetidas colocaciones de un único recipiente, o una serie de recipientes del patrón apropiado.
- Los receptáculos para una localización discreta y separada y las operaciones de medición del espectrómetro pueden producirse con la suficiente precisión para asegurar que el material localizado en la zona de concentración 20 del recipiente de muestras 14 se encuentre precisamente en el plano focal cuando se retira y se coloca en un receptáculo correspondiente asociado a un espectrómetro.

Tal como se ilustra en la figura 2, el conjunto de imanes no debe oscurecer el láser/vista óptica de la zona de concentración magnética 20. Esta necesidad se satisface asegurando que la trayectoria óptica 30 y el eje central 32 del sistema de imanes se encuentren formando un ángulo entre sí. Esto coloca el gránulo descentrado del eje central del tubo, cuando es interrogado mediante un espectrómetro. Esto requiere un desplazamiento 34 entre la trayectoria óptica 30 y el eje del tubo 36.

En el diagrama esquemático de la figura 4 se muestra un aparato de concentración magnética y representación totalmente integrado alternativo 38. En la figura 4 la implementación de la etapa de captura y concentración magnética se realiza en el plano focal de un espectrómetro asociado 40. Este enfoque es ventajoso ya que se elimina la posibilidad de una mala colocación o disociación del gránulo formado en la etapa de concentración magnética cuando el recipiente de muestras se mueve hacia un espectrómetro separado. El aparato de concentración magnética y representación integrado 38 puede ser implementado como aparato de laboratorio de sobremesa, o, con la miniaturización apropiada, como dispositivo de ensayo de campo portátil. En una realización alternativa que se ilustra en el diagrama esquemático de la figura 4B, puede ser ventajoso en ciertas implementaciones desacoplar el módulo de excitación 41 del espectrómetro 40 de un módulo de detección separado espacialmente 43.

Tal como se muestra mejor en las figuras 2 y 4, en ciertas realizaciones del aparato que se describe aquí, la zona de concentración magnética 20 está situada y el gránulo se forma contra la pared del recipiente 24 en el punto de interrogación óptica. Esta posición para la zona de concentración magnética 20 puede ser seleccionada y es ventajosa, en un aparato concentración separado 10, o bien en un aparato de concentración magnética y representación integrado 38. En esta configuración deseable, sólo la pared del recipiente 24 quedará colocada entre el gránulo y la fuente del espectrómetro 40 u otro dispositivo de interrogación óptica. Esta configuración deseable puede conseguirse colocando el imán 18 y el plano focal del espectrómetro 40 respecto al soporte de muestra 38 para minimizar la cantidad de fluido de ensayo que se encuentra fuera de la zona de concentración magnética 20 pero todavía a lo largo de la trayectoria óptica 30 entre el espectrómetro y la zona de concentración magnética 20. Esta configuración también puede describirse en términos de la posición de la zona de concentración 20 respecto a la pared interior 24 del recipiente de muestras 14. En consecuencia, el imán 18 puede colocarse para hacer que la

zona de concentración magnética 20 se forme sustancialmente adyacente a una posición en la que trayectoria óptica 30 entre el espectrómetro 40 y la zona de concentración magnética 20 se cruce inicialmente con el interior o la pared interior 24 del recipiente de muestras 14. La posición ventajosa de los gránulos también puede describirse en términos de una interfaz óptica 42 definida por el lado interior de la pared del recipiente de muestras 24 por donde cruza inicialmente la trayectoria óptica 30. Por lo tanto, la zona de concentración magnética 20 puede estar formada sustancialmente adyacente a la interfaz 42.

Un aparato y procedimientos en los que se minimiza la cantidad de fluido de ensayo libre a lo largo de la trayectoria óptica son claramente diferentes de los dispositivos conocidos en los que el espectrómetro está situado frente al recipiente desde la zona de concentración magnética. La interrogación óptica a través del medio de ensayo tal como es típico con los dispositivos conocidos puede producir un ruido de lectura sustancial. En particular, el ruido de lectura de etiquetas de detección no unidas puede ser problemático en caso de un ensayo homogéneo (sin lavado). Los problemas asociados a ensayos no unidos en la trayectoria óptica pueden eliminarse o minimizarse utilizando la nueva configuración ilustrada en las figuras 2-4.

Tal como se muestra en la figura 4, el elemento de captura magnética del aparato integrado 38 puede incluir un imán 18 posiblemente asociado a una pieza polar cónica o de otra forma 44. La pieza polar 44 funciona para producir un gradiente de campo magnético en un volumen relativamente más pequeño permitiendo de este modo recoger las partículas magnéticas en una zona de concentración magnética bien definida 20. La zona de concentración magnética 20 se muestra en la figura 4 en el lado de un recipiente de muestras 14. Sin embargo, cualquier posición respecto a un recipiente de muestras 14 que sea adecuada para la concentración magnética y que esté en un plano focal de un espectrómetro asociado 40 sería una posición adecuada para una zona de concentración magnética 20. Tal como se ha descrito anteriormente, puede utilizarse un recipiente de muestras 14 de cualquier forma o tamaño para implementar diversas realizaciones. Pueden obtenerse determinadas ventajas utilizando un recipiente de forma personalizada que tenga una estructura tal como hendiduras o una superficie de otra forma que facilite el desarrollo de gránulos en ciertas dimensiones.

La gráfica 46 de la figura 5 ilustra el progreso de la formación de gránulos durante la concentración magnética en función del tiempo, tal como se determinada por la señal de las etiquetas SERS unidas a perlas magnéticas en un esquema de reacción inmunológica. Es deseable para el análisis espectroscópico que el tamaño de los gránulos sea tan pequeño como sea posible, ya que una parte apreciable del volumen de las partículas capturadas puede encontrarse de otro modo fuera del punto de iluminación láser que presentan instrumentos típicos, el cual generalmente tiene un diámetro de aproximadamente entre 70 y 200 micras. También es deseable que el tamaño de los gránulos sea tan pequeño como sea posible para un número determinado de perlas magnéticas. Esto tiene múltiples ventajas. En primer lugar, un gránulo denso se traduce en una menor área de muestreo. En la captura espectroscópica tradicional, un área de muestreo menor permite hacer corresponder con una abertura de espectrómetro más pequeña, lo que se traduce en una resolución espectral mayor para una eficacia óptica determinada (rendimiento óptico). Además, un gránulo más denso tiene como resultado una relación señal ruido más alta dado que habrá un mayor número de etiquetas por unidad de volumen de muestreo. Un gránulo más denso también debería mejorar la varianza de muestra a muestra ya que un gránulo más pequeño debe coincidir mejor tanto con el punto de láser como con la zona de captación óptica. Por lo tanto una zona de captación que sea ligeramente más grande que el gránulo debe ser relativamente inmune a variaciones de señal de menores diferencias de forma entre gránulos. Por último, un gránulo denso de perlas magnéticas ayuda a oscurecer el mayor volumen de la solución, que contiene una etiqueta óptica no unida. Este mecanismo de oscurecimiento podría reducir el límite inferior de detección, aumentando así la sensibilidad y dando lugar a una mejora en el rango dinámico de la prueba.

La formación de gránulos puede conseguirse con un posicionamiento estático entre el recipiente de muestras 14 y el imán 18. Sin embargo, las partículas magnéticas pueden concentrarse a un menor volumen si el imán 18 se mueve respecto a la superficie del recipiente de muestras - un desplazamiento de menos de 1 mm es suficiente para obtener una mejora de concentración medible. El movimiento del imán 18, sin embargo, puede ser poco práctico, debido al requerimiento de que la posición de la zona de concentración magnética 20 esté en coincidencia con la iluminación láser desde el espectrómetro 40. Sin embargo, es posible estimular una formación ajustada de gránulos mediante el uso de técnicas o procedimientos que incluyen la estimulación mecánica, acústica o magnética del recipiente de muestras 14, pero sin limitarse a estos. Es suficiente una energía de vibración para desalojar las partículas que se han llegado a pegar a la pared del recipiente antes de llegar a la posición final de más baja energía potencial más cerca del imán 18 o pieza polar magnética 44. Los procedimientos prácticos mediante los cuales puede conseguirse esto, incluyen los siguientes, pero sin limitarse a éstos: vibración momentánea del soporte 12; vibración momentánea del recipiente de muestras 14 dentro del soporte de muestra 12, exposición momentánea del recipiente de muestras 14 y el contenido a una onda acústica de alta presión; o la aplicación de un campo magnético en movimiento u oscilante, tal como de un electroimán. Estos procedimientos introducen una perturbación suficiente para facilitar la formación de un gránulo denso de un estado de energía más bajo. Además, existe la opción adicional de hacer que el gránulo se vuelva a formar mediante la manipulación del recipiente de muestras 14 con el fin de obligar al gránulo a volver a formarse en una posición diferente en la pared del recipiente 24, por ejemplo, mediante

la extracción del tubo del campo magnético y su sustitución en una orientación alternativa, o extrayendo y volviendo a aplicar el imán 18 o imanes en una posición diferente en el recipiente de muestras 14.

Las figuras 6A-C ilustran esquemáticamente tres procesos representativos y no exclusivos para una formación de gránulos compactos. En cada caso, la etapa (a) es la captura inicial de reactivos desde el punto de partida de una dispersión completa en el fluido de ensayo, la etapa (b) es la finalización de la captura inicial y la formación de gránulos y la etapa (c) implica obligar al gránulo a volverse a formar y concentrarse en un segundo punto de captura sin una redispersión significativa. Esto puede conseguirse mediante:

- Un único o una combinación de múltiples imanes permanentes que se mueven respecto al recipiente de muestras con el fin de efectuar la formación y manipulación de gránulos deseada. (Figura 6A)
- Una combinación de electroimanes para lograr el mismo efecto. (Figura 6B)
- Un ajuste mecánico de la posición del tubo en el receptáculo, por ejemplo un giro de 180° de un recipiente de muestras cilíndrico para forzar el reposicionamiento de los gránulos. (Figura 6C)

En ciertas realizaciones de una unidad de captura/interrogación integrada 38, tal como se muestra en la figura 4, puede ser un reto para el diseño de un conjunto magnético que genera un campo magnético lo suficientemente fuerte como para arrastrar las partículas magnéticas a través de la solución de ensayo, para formar un gránulo adecuado, así como para proporcionar un espacio libre para la lectura óptica. Por lo tanto, puede ser ventajoso tener una concentración magnética que se produzca en un lado del recipiente de muestras 14 mientras la lectura óptica se produce en el lado opuesto del recipiente. En esta realización, cualquier curvatura del recipiente de muestras 14 más los efectos ópticos de los componentes de ensayo contenidos en el mismo puede actuar como elemento óptico. Es deseable, tal como se ha descrito anteriormente, conseguir un punto de iluminación y una zona de captación pequeños. Por consiguiente, el sistema óptico asociado al espectrómetro 40 puede diseñarse para compensar los efectos ópticos del recipiente de muestras 14. Por ejemplo, pueden ser necesarios elementos ópticos, incluyendo elementos astigmáticos tales como lentes cilíndricas, pero sin limitarse a éstas, para compensar el astigmatismo introducido por un recipiente de muestras 14 determinado. Alternativamente, los efectos ópticos de un recipiente de muestras 14 pueden minimizarse mediante el uso de un recipiente de muestras rectangular 14 de manera que el gránulo se forme en una superficie llana o plana del recipiente de muestras. Potencialmente, la lectura óptica desde el lado opuesto de un recipiente de muestras 14 podría mejorar la eficiencia óptica dado que la recogida de datos ópticos se producirá en el eje a diferencia de la geometría de recogida fuera del eje ilustrada en la figura 4.

Aunque las realizaciones de las figuras 1-4 muestran recipientes de muestra 14 individuales, pueden prepararse y realizarse fácilmente ensayos paralelos de alto rendimiento utilizando múltiples soportes de recipientes de muestra de ensayo paralelos e imanes. Para una implementación paralela pueden ser adecuados dispositivos bien conocidos tales como placas de 96 cavidades. Podrían formarse cúspides, hendiduras u otras estructuras en una placa de cavidades o recipiente de muestras múltiple similar para estabilizar el gránulo y facilitar la concentración. La etapa concentradora magnética y la lectura podrían producirse en paralelo o en serie.

Con un aparato de captura y concentración magnética no integrado 10, tal como se muestra en la figura 1, es necesario garantizar la alineación del mismo recipiente entre dos recipientes separados, el primero asociado al aparato de concentración 10 y el segundo al lector óptico. Puede garantizarse un alineamiento apropiado disponiendo características de alineación tales como signos 22 en el recipiente de muestras. Pueden añadirse características moldeadas al recipiente para ajustar el tubo en tres dimensiones. El recipiente de muestras 14 debe fabricarse o seleccionarse de manera que se controle el grosor de la pared lateral ya que esto puede afectar al posicionamiento del gránulo en un sistema de captura no integrado 10. Es deseable, además, que el lector óptico también contenga un sistema de captura magnético por una o ambas de las siguientes razones:

- Para garantizar un posicionamiento preciso del gránulo después de la transferencia del recipiente de muestras 14 y,
- Para producir una concentración adicional del gránulo haciendo que se vuelva a formar en el interior del recipiente de muestras 14, tal como se ha descrito anteriormente,

Se ha sido utilizado experimentalmente con éxito un imán esférico de NdFeB (tierras raras) de ½" para crear un gránulo de perlas magnéticas y etiquetas SERS asociadas en una única etapa de descenso. El recipiente de muestras 14 utilizado fue un tubo de microcentrifugadora de polipropileno de 200 µL con 100 µL o menos de reactivo. Tal como se muestra en la gráfica 46 de la figura 5, se obtuvo un descenso adecuado de partículas dando lugar a una señal óptica de estado relativamente estacionario en menos de un minuto.

En una realización alternativa del sistema de ensayo, todo un gránulo puede ser representado utilizando un filtro sintonizable (LCTF, AOTF, etc.) para crear una pila de imágenes hiperespectrales. Si la formación de gránulos consistente resulta ser difícil, la representación de todo el gránulo combinado con un análisis de imagen subsiguiente podría proporcionar una métrica para una "etiqueta óptica total" que sea consistente y sin respetar la distribución o la forma del gránulo.



De manera similar, un gránulo difuso, por ejemplo un gránulo lineal formado por un imán lineal, podría ser adecuado para un ensayo "pull-down" reproducible, homogéneo, magnético si la información espacial es capturada por medio de un barrido o un sistema de representación de campo amplio. En esta realización puede representarse el gránulo y emplearse una etapa de análisis de software para determinar una métrica para la señal total (por ejemplo la señal SERS) emitida por cada gránulo. Esta implementación comparte características con lectores de *microarrays* de ADN comúnmente disponibles, a excepción de la necesidad de un número relativamente elevado de canales espectrales (es decir, una representación hiperespectral). No obstante, para un sistema de alto rendimiento que utiliza una configuración de microplacas con múltiples cavidades, esto podría ofrecer beneficios. La resolución óptica, del orden de 50  $\mu\text{m}$ , podría ser adecuada para permitir que un algoritmo de procesamiento de imágenes justificara las diferencias de tamaño y forma de los gránulos para obtener una métrica de señal total consistente a través de gránulos replicados. La investigación previa demuestra que un número mínimo de canales espectrales (~20-30 canales espectrales), podría ser adecuado para diferenciar y cuantificar etiquetas SERS. En una realización de campo amplio esto puede prever el uso de filtros sintonizables de cristal líquido (LCTF), o filtros sintonizables acústico-ópticos (AOTF) para conseguir la separación espectral. Respecto a un sistema de barrido por punto láser, podría ser adecuado un sistema de espectrómetro dispersivo de baja resolución espectral.

En un sistema de detección de alto rendimiento puede ser preferible separar la etapa de concentración magnética de la etapa de lectura óptica. La concentración magnética congela la reacción química y así todas las muestras en un lote, por ejemplo, todas las muestras en una placa de microcavidades, requerirían que sus gránulos pudieran formarse al mismo tiempo. Grandes volúmenes de proceso pueden tener como resultado una variación de la posición exacta de cada gránulo. Una posible solución a este problema para la geometría de alto rendimiento, por lo tanto, es utilizar una etapa de representación inicial, no para recoger información espectral, sino simplemente para localizar los gránulos. Una etapa de procesamiento de imágenes podría extraer las posiciones de todos los gránulos y utilizar esta información para posicionar un sistema de espectrómetro de punto convencional bajo cada gránulo secuencialmente.

Procedimientos de alto rendimiento podrían incluir maquinaria automatizada para realizar las siguientes funciones:

- Uso de una matriz de imanes para la localización de gránulos dentro de cada recipiente, por ejemplo, cada cavidad de una placa de 96 cavidades para concentrar los gránulos en todas las cavidades simultáneamente. Un aparato automatizado podría transferir entonces la placa a un lector de barrido capaz de leer las cavidades en secuencia. El sistema debe ser de suficiente precisión para garantizar el registro de gránulos en cada cavidad con el lector, o bien debe disponerse un medio de representación para localizar los gránulos antes de realizar mediciones espectroscópicas en las posiciones de los gránulos así determinados.
- Alternativamente, las cavidades podrían localizarse individualmente o fila por fila (o columna por columna), para mejorar la exactitud de tiempo de reacción. La medición espectroscópica podría implementarse utilizando cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente.

Podría fabricarse un aparato de alto rendimiento en el que los recipientes de muestra sean tubos discretos. Los tubos podrían ser transportados dentro del aparato a diferentes "estaciones" de función de una pista transportadora, cinta o sistema robótico. La posición y el momento preciso de cada tubo de muestra podrían seguirse mediante un sistema de microprocesador que controle la función del aparato, lo que permite un control preciso de tiempos, temperaturas, mezcla y medición de la reacción, etc. Dicho aparato de la invención podría incluir una disposición para etapas de proceso, que incluya, pero sin limitarse a éstas:

- Suministro de reactivos, analito al recipiente de muestras.
- Control de la temperatura del recipiente y tiempo de reacción.
- Localización de los componentes del ensayo mediante la aplicación de un campo magnético.
- Optimización de la formación de gránulos mediante los procedimientos descritos anteriormente.
- Medición óptica de los reactivos localizados dentro del recipiente.

La secuencia de etapas podría incluir los procedimientos de localización separados de la fabricación de las mediciones ópticas, o coincidentes con ésta, de la misma manera que ya se ha descrito, de modo que el aparato de alto rendimiento incorporaría receptáculos para los recipientes que tienen conjuntos de imanes para la localización, y/o espectrómetros asociados operativamente a conjuntos de imanes. Otras variaciones sobre el aparato de alto rendimiento básicas descritas aquí están dentro del alcance de esta descripción.

Otra realización de la presente invención utiliza una pequeña perla compuesta de un material de alta permeabilidad magnética (por ejemplo, níquel, cobalto, etc.) colocada en el recipiente de reacción. La presencia de la perla de alta permeabilidad centrará las líneas de campo magnético, creando así un gradiente de campo magnético elevado para atraer las partículas magnéticas. El complejo partícula magnética/etiqueta de ensayo podría asociarse alrededor de la perla y todo el gran conjunto, que consiste en una gran "perla" con las partículas magnéticas pequeñas

circundantes y etiquetas de ensayo sería representado. Esta técnica podría ayudar a obtener un gránulo esférico reproducible para una interrogación óptima.

Otra realización presenta un posicionamiento automático del recipiente de muestras 14 en el detector óptico. Se trata de una variación de un procedimiento de alto rendimiento, donde la lectura posiblemente se realiza en serie, pero la concentración magnética puede realizarse en paralelo. Un conjunto de recipientes de muestra que contienen todos los reactivos premezclados, tal vez introducidos a los recipientes utilizando un sistema controlador de fluido automatizado, tendría un conjunto magnético para concentrar las partículas magnéticas con reactivo correspondiente. Esto, en efecto, detendría la reacción, pero también sería un descenso grueso formando una gran diversidad de gránulos. Cada recipiente podría colocarse entonces en un soporte 38 tal como se muestra en la figura 4, que concentraría, además, el gránulo grueso y permitiría una lectura óptica de la SERS u otra señal. Por lo tanto, en esta realización, todos los recipientes tendrían una concentración magnética gruesa inicial que funcionaría en paralelo. La concentración sería "gruesa" en el sentido de que las partículas magnéticas se han retirado de la suspensión, pero podrían haber formado un conjunto de gránulos grandes y dispersos en cada recipiente. No obstante, la reacción habría cesado, y la interrogación óptica continuaría en serie con un sistema robótico automatizado que colocaría cada tubo para un posicionamiento, condensación, y lectura finos del gránulo.

Puede ser deseable, ya sea en un sistema de rendimiento normal o alto, eliminar la necesidad de volver a formar o acondicionar los gránulos. En las figuras 7 y 8 se ilustra esquemáticamente un aparato adecuado para utilizarse sin acondicionamiento de gránulos. El aparato 50 incluye un tubo capilar 52 en lugar de los otros tipos de recipientes de muestra descritos anteriormente. El tubo capilar 52 está en comunicación fluida con una suspensión de partículas de ensayo 54. Cuando la suspensión de partículas 54 fluye a través del tubo capilar 52, las partículas magnéticas se concentran dentro del tubo 52 mediante un imán de captura 18 que puede o no estar asociado a una pieza polar 44. El imán de captura 18 sirve para concentrar partículas magnéticas en una zona de concentración magnética específica 20 dentro del tubo capilar 52. Un espectrómetro u otro dispositivo de interrogación que puede ser un espectrómetro Raman 40 está asociado operativamente al tubo capilar 52 y enfocado en la zona de concentración magnética 20. Tal como se muestra en las figuras 7 y 8, la interrogación óptica puede producirse a lo largo de una trayectoria óptica que es opuesta al eje magnético o simplemente desplazada del mismo.

El uso de un tubo capilar 52 como formato de recipiente de muestras alternativo proporciona varias ventajas diferentes que incluyen, pero sin limitarse a éstas:

- Una colocación precisa de partículas magnéticas respecto al área pequeña interrogada por un sistema típico basado en láser. Esto potencialmente mejorará la precisión de la medida donde se requiera una determinación cuantitativa.

- El recipiente de muestreo tiene inherentemente una elevada calidad óptica. Por ejemplo, el tubo capilar 52 puede tener lados planos y estar fabricado en un material que sea transparente a las longitudes de onda necesarias. El tubo capilar 52 también es potencialmente fijo en una posición respecto a componentes magnéticos y ópticos.

- Un aparato de tubo capilar 50 permite llevar a cabo pruebas con pequeños volúmenes de muestra de menos de 100 microlitros y pequeñas cantidades de reactivos, lo que puede resultar en una mejor sensibilidad.

- Un aparato de tubo capilar 50 permite una rápida recogida de una muestra de gránulos que no requiera acondicionamiento. El gránulo está contenido en un área pequeña e inherentemente queda firmemente empaquetado. No se requiere que el elemento magnético proporcione fuerzas de atracción a gran distancia ya que la pared del tubo capilar y el polo magnético se encuentran dispuestos muy ajustados (por ejemplo, con una separación de no más de 1 mm). Esto es ventajoso ya que la fuerza de atracción experimentada por las partículas magnéticas cae rápidamente al aumentar la distancia desde el polo o pieza polar 44 de un sistema de imanes.

- El volumen de fluido interrogado por el lector se reduce significativamente por el uso de un recipiente capilar estrecho. Por lo tanto, la cantidad de etiqueta no unida, que de otra manera contribuiría con una "señal de fondo" no deseada puede hacerse muy pequeña.

- El uso de electroimanes en el mecanismo de captura puede permitir la recogida de partículas magnéticas en la zona de concentración y un posterior enjuague de las partículas de esta zona. De esta manera, el recipiente podría utilizarse en serie para leer desde múltiples reacciones de ensayo de muestra. Esto podría funcionar a petición, o de una manera semi-continua formando parte de un sistema automatizado más grande en el cual se ejecuten muchas pruebas en secuencia.

- También podría utilizarse un aparato de tubo capilar 50 para implementar un dispositivo de ensayo de flujo lateral. En un ensayo de flujo lateral, un tubo capilar asociado a un imán sustituye la tira de fibra de celulosa típica u otra matriz. Puede disponerse un depósito o una almohadilla de depósito que contenga reactivos adsorbidos (por ejemplo: etiquetas SERS y partículas magnéticas) en comunicación con una abertura en el tubo capilar. La introducción de fluido analito en el depósito tiene como resultado una liberación de partículas de reactivos, a las cuales se les obliga a fluir a lo largo del capilar con el analito en solución. El imán atrapa partículas magnéticas en una posición definida con precisión. Cualquier etiqueta tal como partículas SERS unidas a partículas magnéticas puede ser

detectada por medio de un espectrómetro Raman dirigido en el punto de captura. La posición precisa del punto de captura respecto al espectrómetro puede efectuarse a través del sistema de imanes.

5 El ejemplo de flujo lateral basado en un tubo capilar descrito anteriormente es adecuado para utilizarse como sistema de ensayo integrado que, si se desea, podría desarrollarse en un factor de forma muy compacto para un uso en ensayo de campo altamente preciso y repetible. En la figura 9 se ilustra esquemáticamente un sistema integrado 60 consistente con este ejemplo. En el ejemplo de la figura 9, el tubo capilar 52 está montado en un cartucho de muestra 62. El tubo capilar 52 está en comunicación con un depósito de muestra 64 formado en el cartucho de muestra 62. La suspensión de partículas de ensayo 54 necesaria para llevar a cabo un ensayo que incluye 10 partículas magnéticas y reactivos puede mezclarse en el depósito de muestra 64. Como que el depósito de muestra 64 está en comunicación fluida con el tubo capilar 52, la suspensión ensayo completamente reaccionada 54 se extrae fácilmente hacia la zona de concentración magnética 20 por acción capilar. Además, el exceso de partículas de ensayo se elimina de la zona de concentración magnética 20 minimizando la señal de fondo. En la zona de 15 captura magnética 20, un imán 18 concentrará partículas magnéticas tal como se ha descrito anteriormente en el plano focal de un espectrómetro 40, donde puede producirse la interrogación óptica de la muestra concentrada.

El sistema integrado 60 de la figura 9 puede fabricarse con un receptáculo de soporte para cartuchos 66 configurado para recibir y posicionar el cartucho 62 de modo que la zona de captura magnética 20 quede correctamente alineada con precisión. El sistema 60 también puede incluir elementos de procesamiento de datos 68 asociados al 20 espectrómetro que permitan utilizar el aparato 60 como dispositivo de ensayo portátil y potencialmente independiente y manual.

# REIVINDICACIONES

## 1. Aparato de ensayo que comprende:

- 5 un recipiente de muestras (14);  
un soporte (10) configurado para recibir operativamente el recipiente de muestras (14);  
un imán (18) asociado operativamente al soporte del recipiente de muestras (10) de manera que un  
campo magnético cruza con una parte del recipiente de muestras definiendo una zona de  
concentración magnética para la concentración de partículas de captura magnéticas; y  
10 un espectrómetro (40) asociado operativamente al recipiente de muestras (14), o configurado para  
recibir operativamente el mismo, de manera que el foco del espectrómetro (10) se encuentra dentro de  
la zona de concentración magnética;
- 15 caracterizado por el hecho de que el aparato de ensayo comprende, además, medios para estimular  
una concentración compacta de las partículas de captura magnéticas en dicha zona de concentración  
magnética, estando asociados operativamente dichos medios al recipiente de muestras.

## 2. Aparato de ensayo según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el espectrómetro es un espectrómetro Raman.

## 3. Aparato de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por el hecho de que los medios para estimular la concentración compacta se seleccionan de un grupo que consiste en un estimulador electromagnético; un vibrador; un transductor acústico y un agitador mecánico.

## 4. Aparato de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por el hecho de que el imán y el espectrómetro están posicionados para minimizar la cantidad de fluido de ensayo fuera de la zona de concentración magnética, pero dentro de una trayectoria óptica entre el espectrómetro y la zona de concentración magnética.

## 5. Aparato de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por el hecho de que el imán está posicionado para hacer que la zona de concentración magnética se forme sustancialmente adyacente a una posición en la que una trayectoria óptica entre el espectrómetro y la zona de concentración magnética cruza inicialmente el interior del recipiente de muestras.

## 6. Aparato de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por el hecho de que el recipiente de muestras comprende, además, una pared interna en el que una parte de la pared interna inicialmente cruza una trayectoria óptica desde el espectrómetro define una interfaz y en el que la zona de concentración magnética se forma sustancialmente adyacente a la interfaz.

## 7. Aparato de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por el hecho de que el recipiente de muestras es un tubo capilar.

## 8. Aparato de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por el hecho de que comprende, además, una pieza polar para producir un gradiente de campo magnético.

## 9. Aparato de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por el hecho de que comprende, además:

- un cartucho de muestra; y  
un soporte asociado al aparato de ensayo configurado para recibir el cartucho de muestra; en el que  
preferiblemente el cartucho de muestra comprende:  
un tubo capilar; y  
un depósito de muestra en comunicación fluida con el tubo capilar.

## 10. Procedimiento para realizar un ensayo, que comprende:

- asociar partículas de captura magnéticas a partículas de detección en un recipiente de muestras;  
colocar el recipiente de muestras en un soporte configurado para recibir el recipiente de muestras y  
sujetarlo en una relación de selección con un imán asociado al soporte;  
concentrar magnéticamente las partículas de captura magnéticas en una zona de concentración  
magnética del recipiente de muestras;  
60 opcionalmente retirar el recipiente de muestras del soporte y colocar el recipiente de muestras en un  
espectrómetro configurado para recibir operativamente el recipiente de muestras de manera que el  
foco del espectrómetro se encuentre dentro de la zona de concentración magnética; y

obtener un espectro de la zona de concentración magnética con un espectrómetro asociado operativamente al recipiente de muestras de manera que el foco del espectrómetro se encuentre dentro de la zona de concentración magnética;

en el que el procedimiento comprende, además, simular una concentración compacta de las partículas de captura magnéticas en la zona de concentración magnética.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado por el hecho de el espectro obtenido de la zona de concentración magnética es un espectro Raman, preferiblemente en el que el espectro Raman se obtiene a partir de una etiqueta SERS asociada a las partículas de captura magnéticas en la zona de concentración magnética.

12. Procedimiento para realizar un ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, caracterizado por el hecho de que la etapa de estimulación comprende por lo menos una de agitar mecánicamente el recipiente de muestras; hacer vibrar el recipiente de muestras; proyectar una onda acústica a través del recipiente de muestras y pasar un campo magnético en movimiento a través de una parte del recipiente de muestras.

13. Procedimiento para realizar un ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, caracterizado por el hecho de que el imán y el espectrómetro están posicionados para minimizar la cantidad de fluido de ensayo fuera de la zona de concentración magnética, pero dentro de una trayectoria óptica entre el espectrómetro y la zona de concentración magnética.

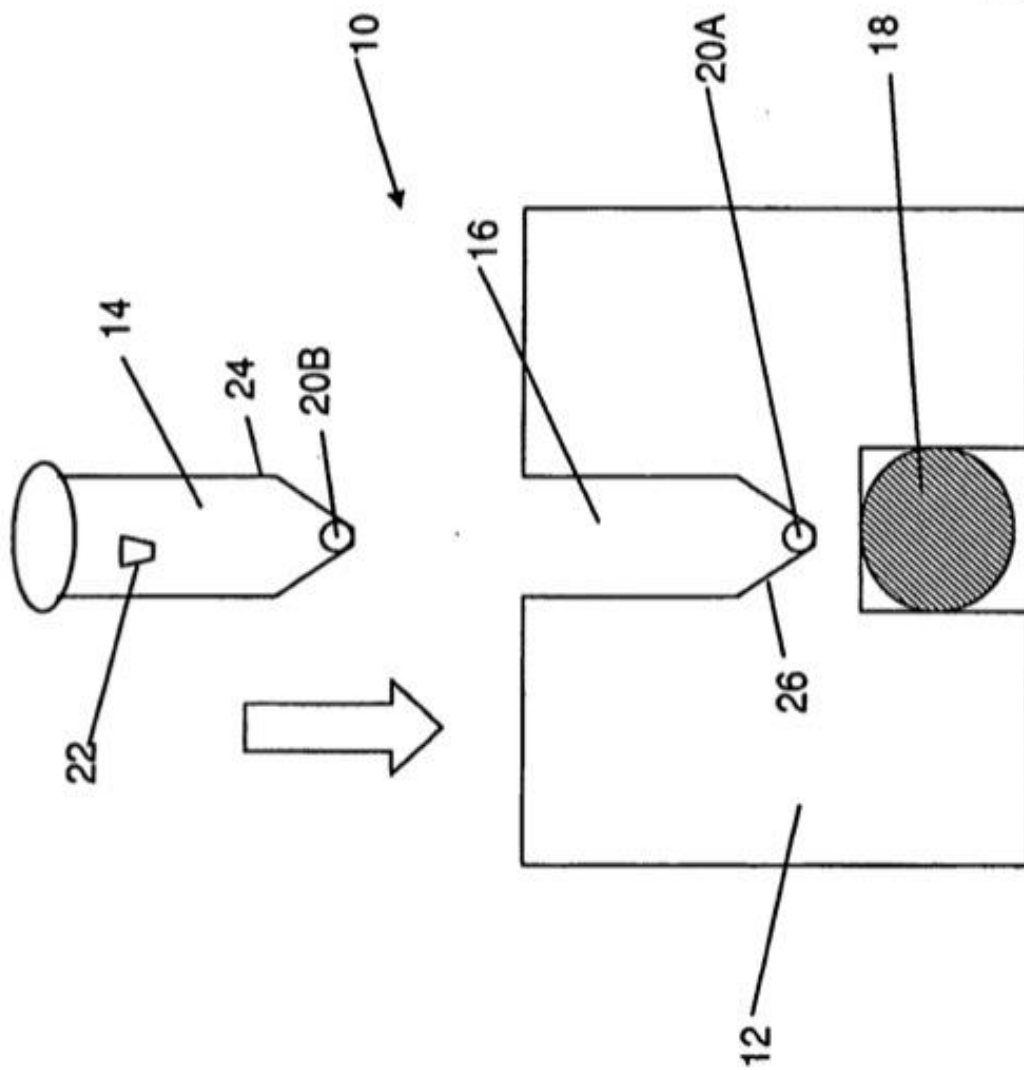
14. Procedimiento para realizar un ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, caracterizado por el hecho de que el imán está posicionado para hacer que la zona de concentración magnética se forme sustancialmente adyacente a una posición en la que una trayectoria óptica entre el espectrómetro y la zona de concentración magnética cruza inicialmente el interior del recipiente de muestras.

15. Procedimiento para realizar un ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, caracterizado por el hecho de que el recipiente de muestras comprende, además, una pared interna en el que una parte de la pared interna, que la cruzada inicialmente una trayectoria óptica desde el espectrómetro, define una interfaz y en el que la zona de concentración magnética se forma sustancialmente adyacente a la interfaz.

16. Procedimiento para realizar un ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, caracterizado por el hecho de que la etapa de simulación comprende por lo menos una de reposicionar el recipiente respecto al imán; reposicionar el imán respecto al recipiente de muestras y aplicar un campo magnético desde más de un imán al recipiente de muestras.

17. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado por el hecho de que recipiente de muestras y el tubo capilar están asociados operativamente a un cartucho de muestra.

18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, caracterizado por el hecho de que comprende, además, producir un gradiente de campo magnético por medio de una pieza polar.



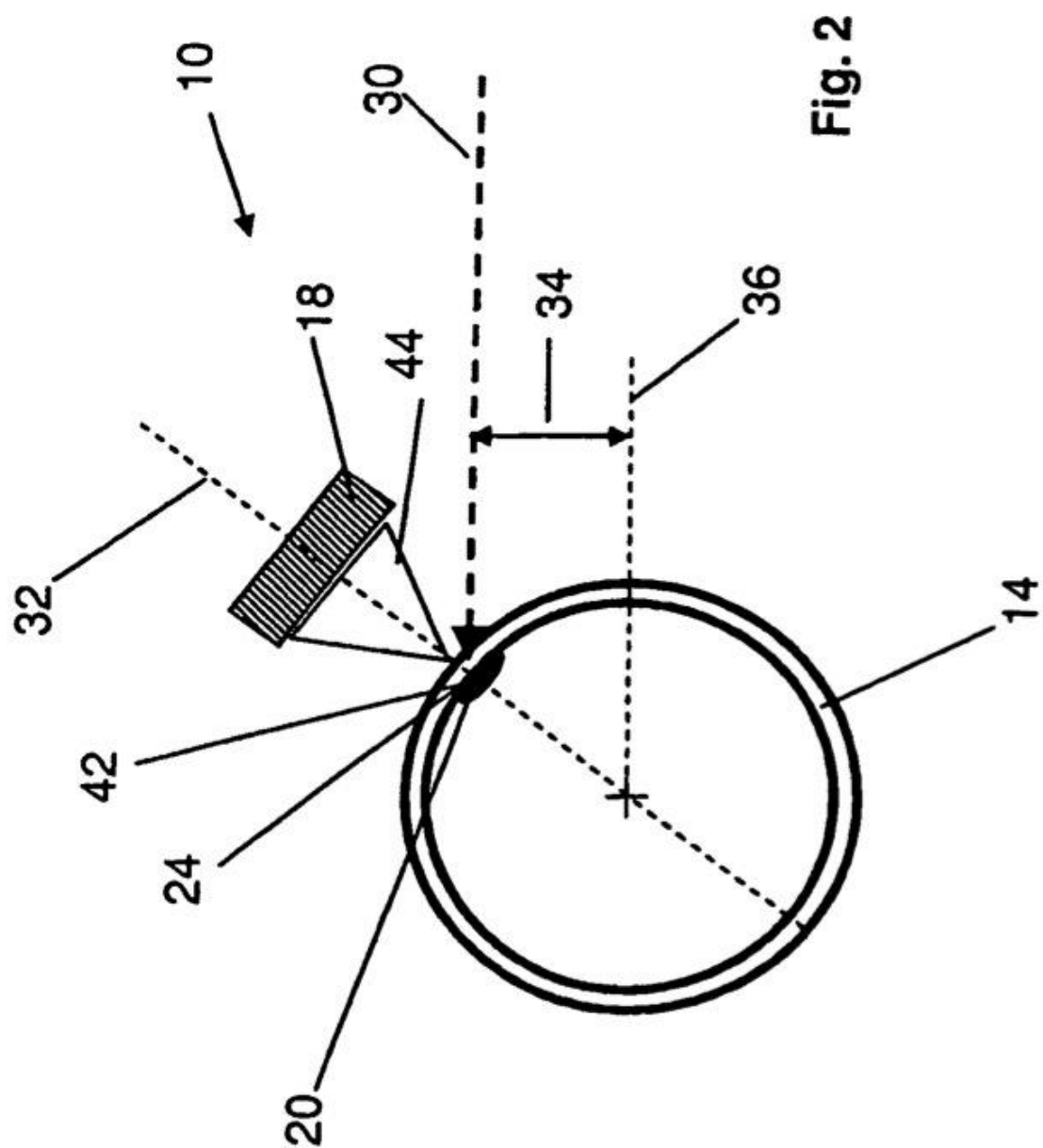
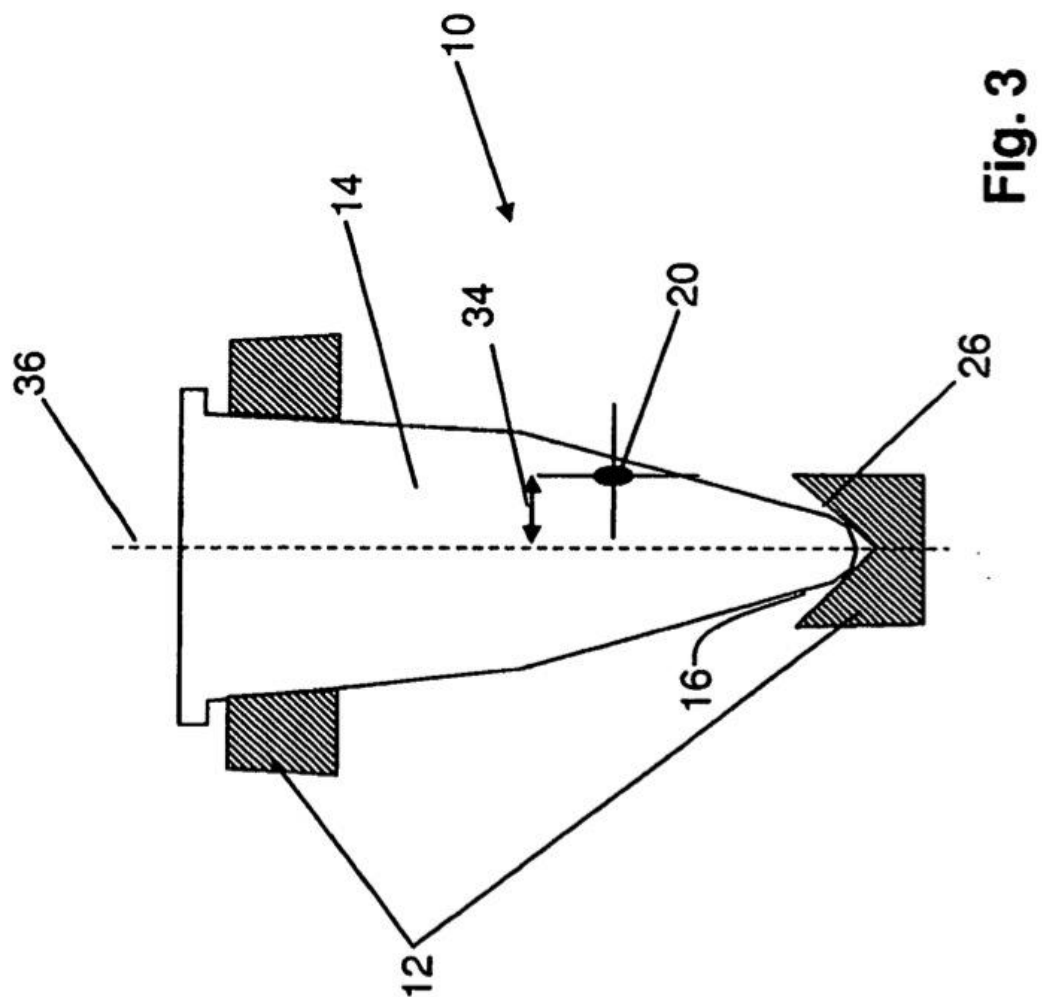


Fig. 2





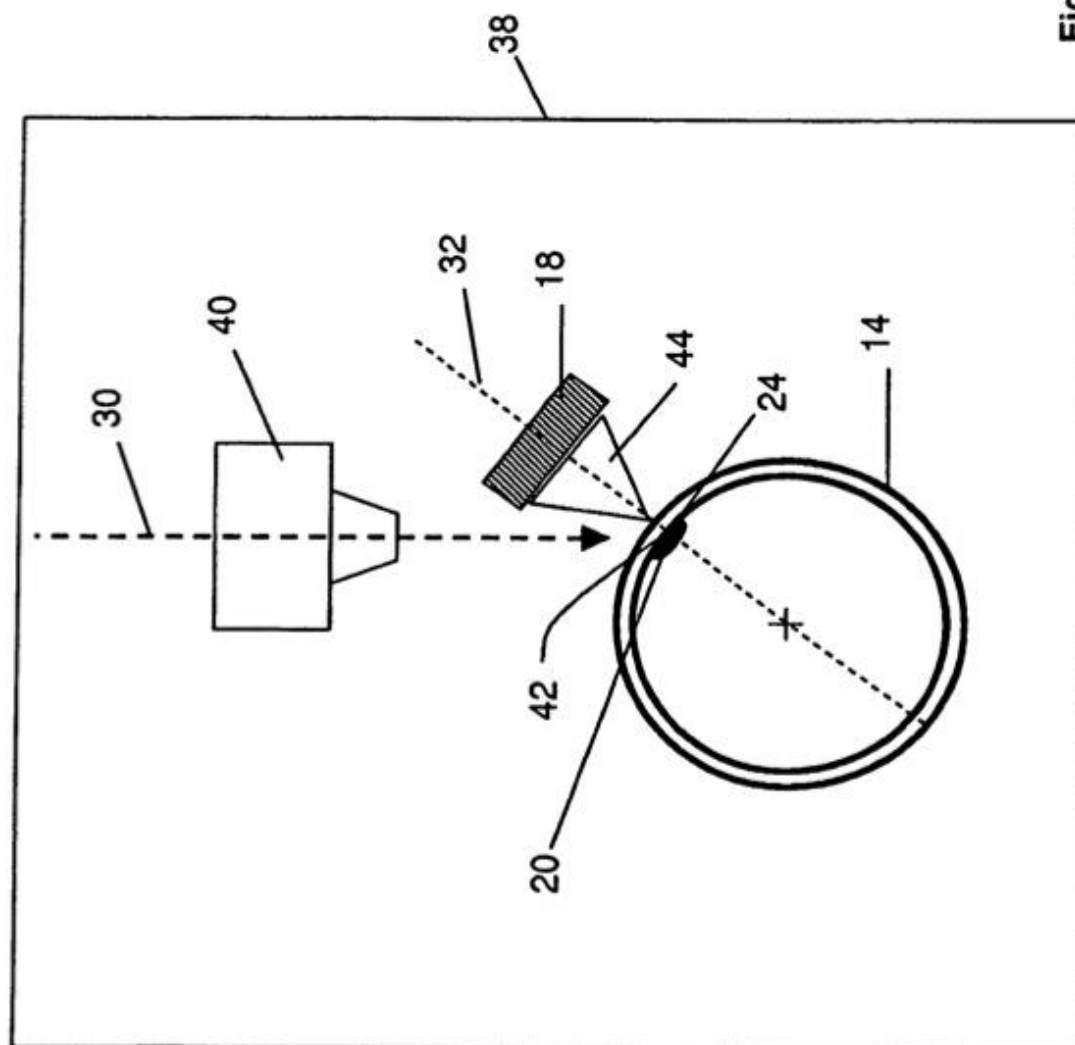


Fig. 4A

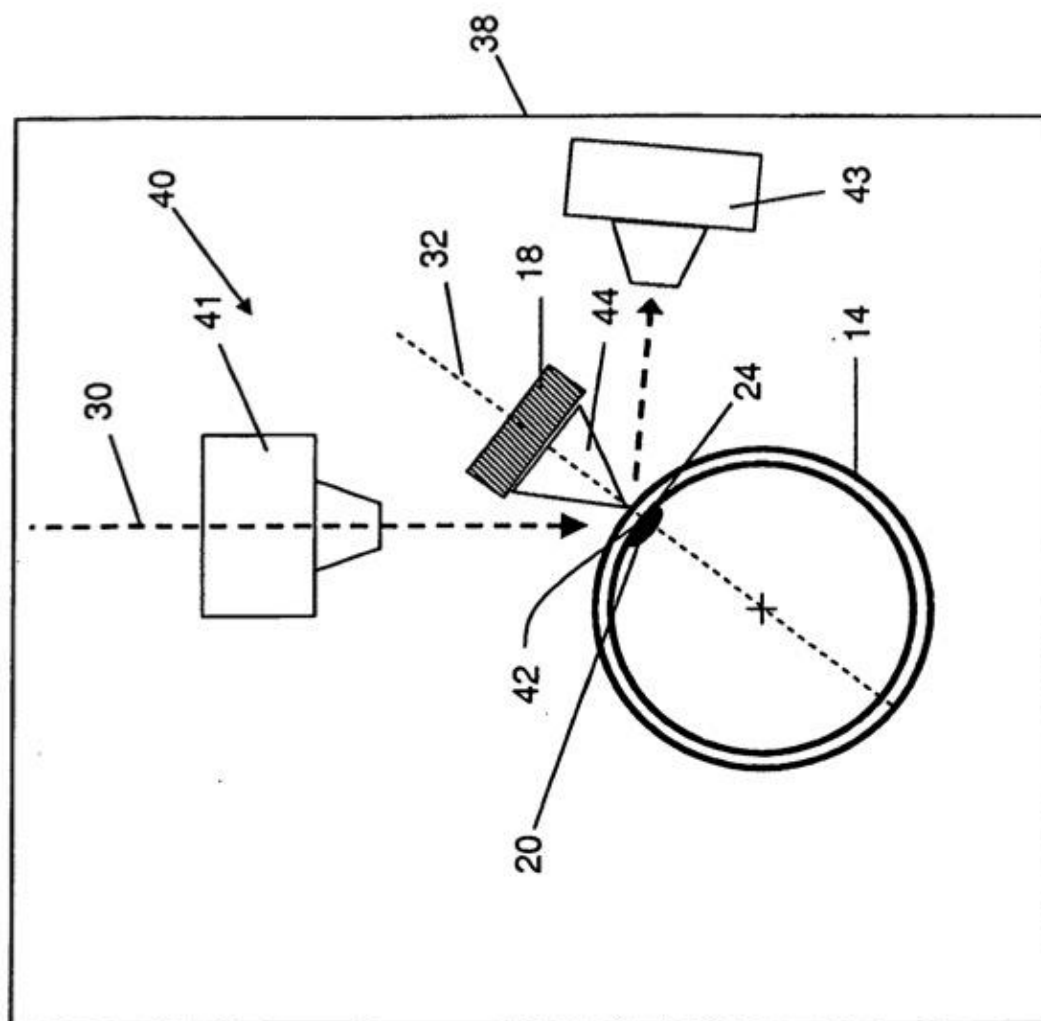


Fig. 4B

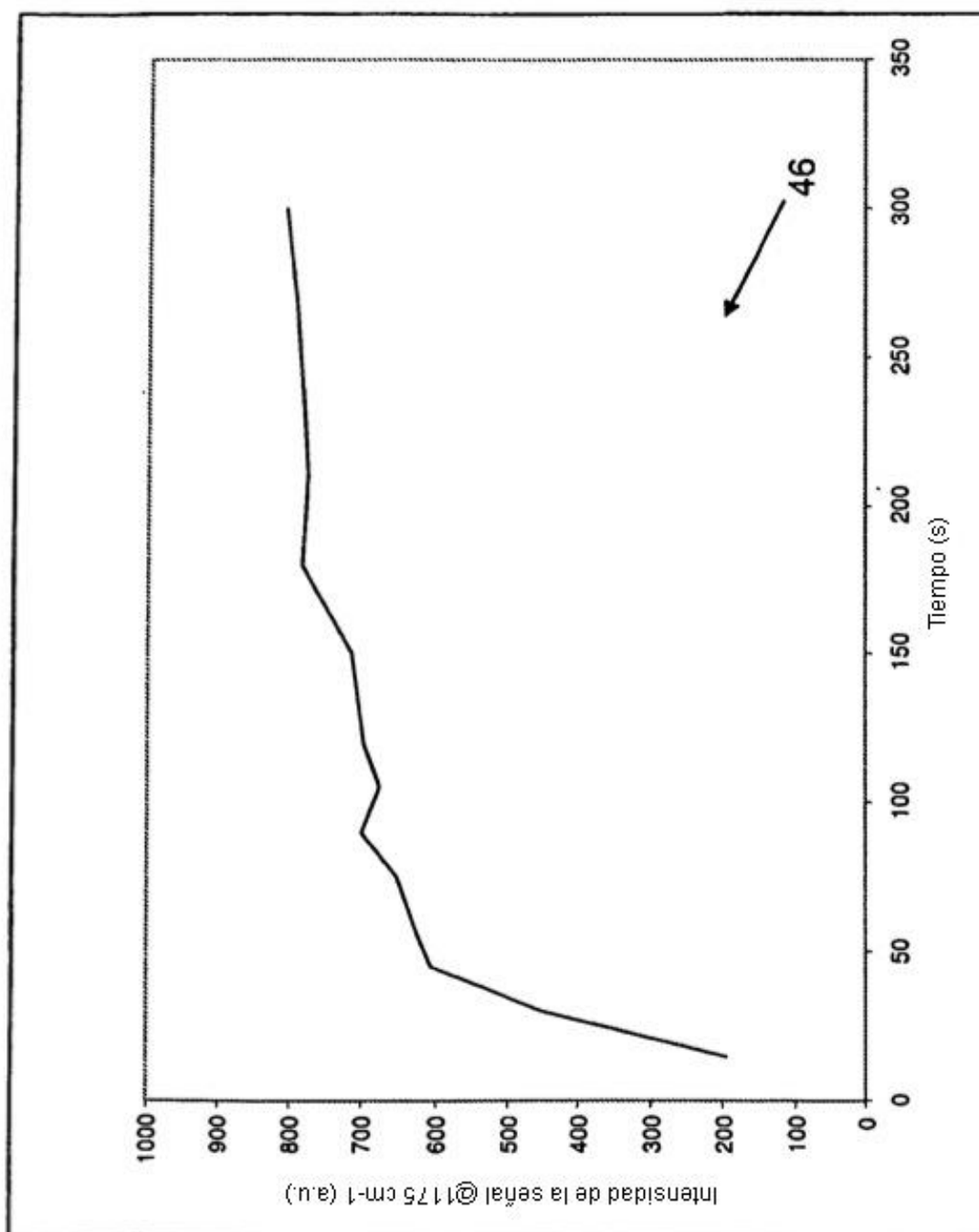


Fig. 5

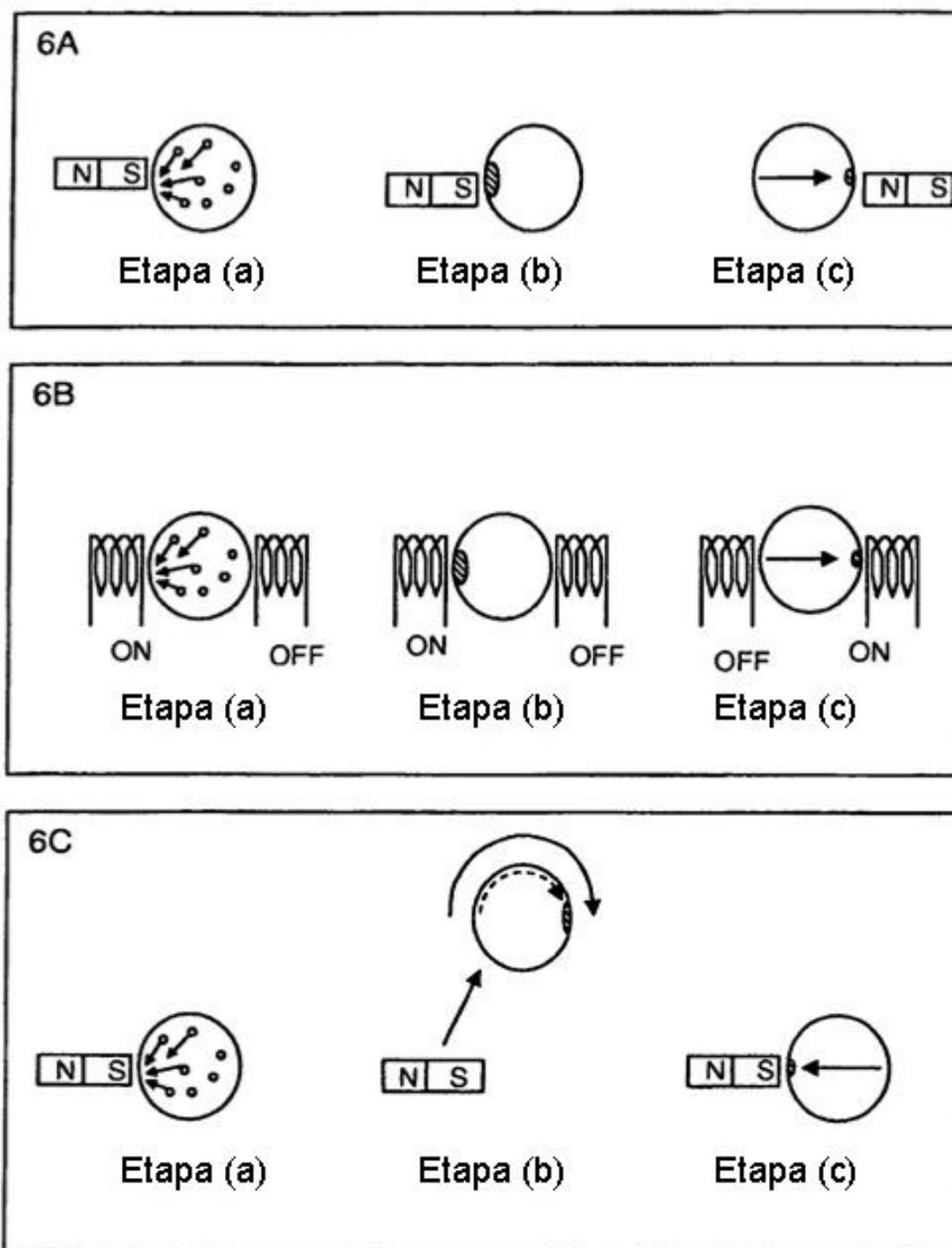


Fig. 6

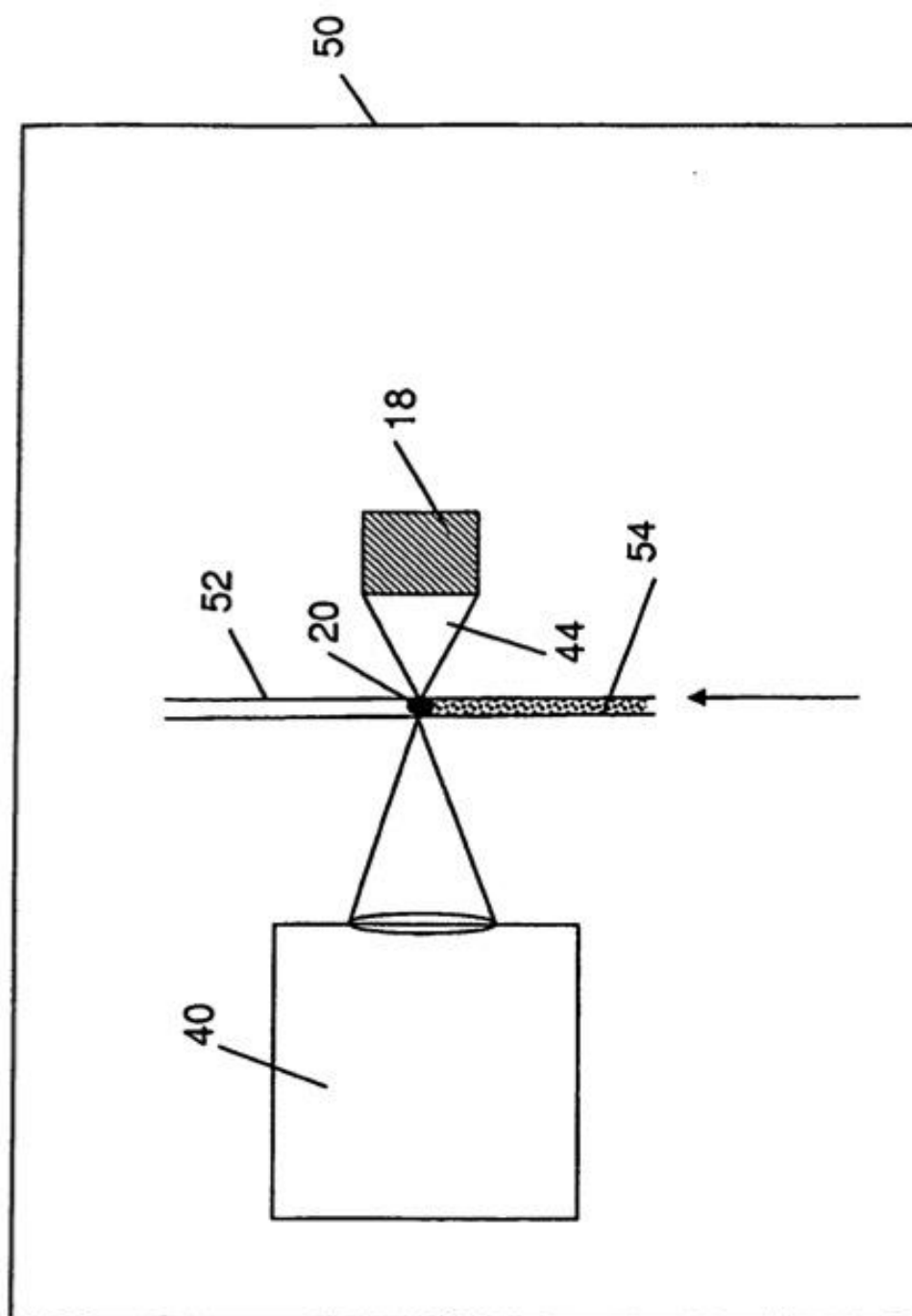


Fig. 7

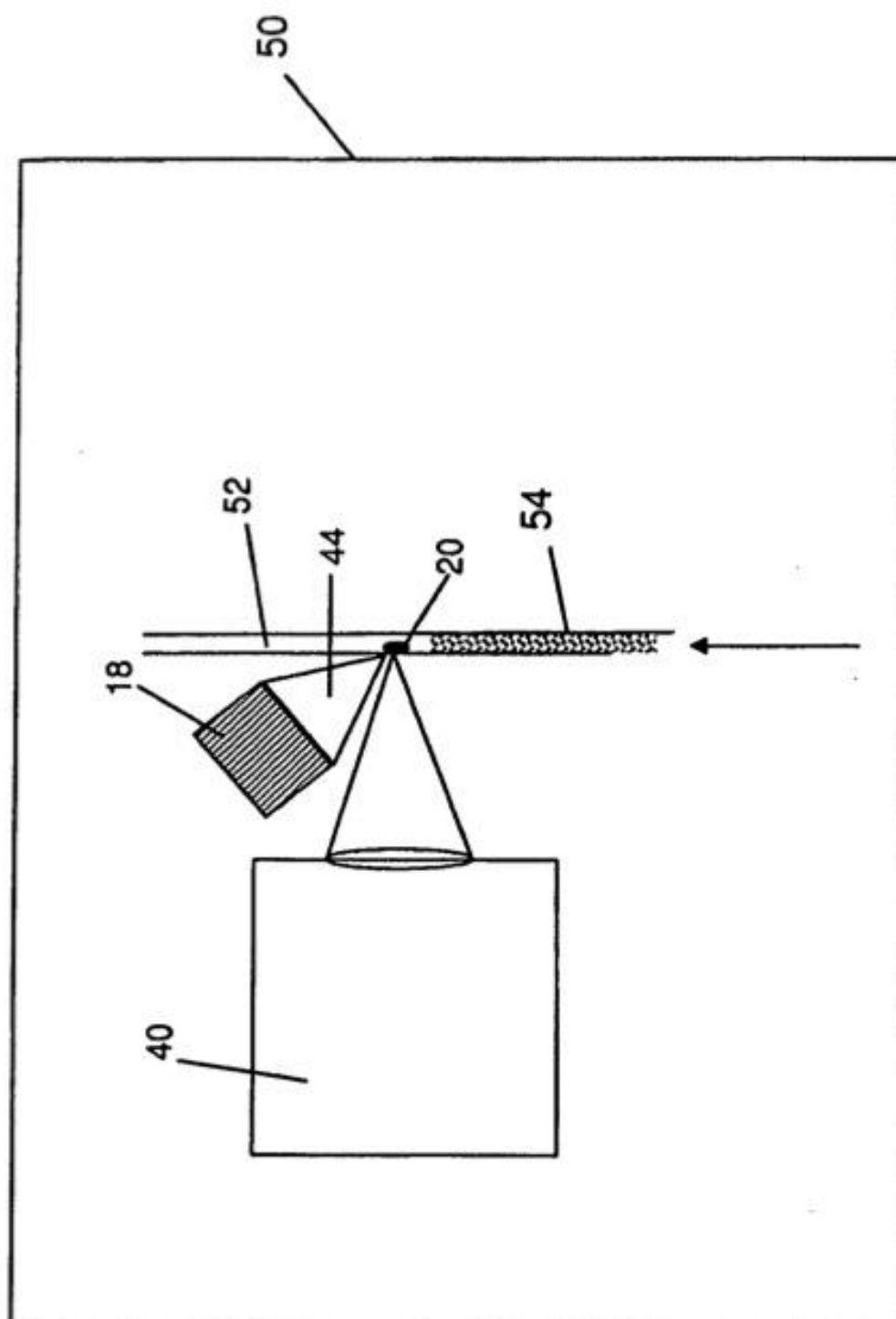


Fig. 8

