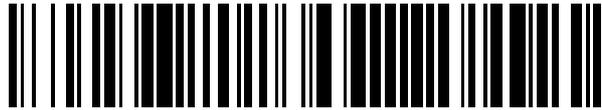


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 927**

51 Int. Cl.:

B82Y 25/00	(2011.01)
C12Q 1/68	(2006.01)
C12Q 1/70	(2006.01)
G01N 24/08	(2006.01)
G01R 33/09	(2006.01)
G01N 33/543	(2006.01)
G01R 33/12	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2011 E 11835088 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2630517**

54 Título: **Sistemas de RMN y métodos para la detección rápida de analitos**

30 Prioridad:

22.10.2010 US 910594
15.06.2011 US 201161497374 P
16.11.2010 US 414141 P
01.12.2010 US 418465 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.07.2016

73 Titular/es:

T2 BIOSYSTEMS, INC. (100.0%)
101 Hartwell Avenue
Lexington, Massachusetts 02421, US

72 Inventor/es:

LOWERY, THOMAS JAY, JR.;
AUDEH, MARK JOHN;
BLANCO, MATTHEW;
CHEPIN, JAMES FRANKLIN;
DEMAS, VASILIKI;
DHANDA, RAHUL;
FRITZEMEIER, MARILYN LEE;
KOH, ISAAC;
KUMAR, SONIA;
NEELY, LORI ANNE;
MOZELESKI, BRIAN;
PLOURDE, DANIELLA LYNN;
RITTERSHAUS, CHARLES WILLIAM y
WELLMAN, PARRIS

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 576 927 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

Sistemas de RMN y métodos para la detección rápida de analitos

Esta invención muestra ensayos para la detección de analitos.

5 Se han diseñado sensores magnéticos para detectar interacciones moleculares en una variedad de medios, incluyendo biofluidos, productos alimenticios, y muestras de suero, entre otros medios. Por enlazamiento a las dianas, estos sensores producen cambios en las propiedades de moléculas de agua vecinas (o cualquier molécula de solvente con hidrógenos libres) de una muestra, las cuales pueden ser detectadas por técnicas de resonancia magnética (RMN/IRM). Así, utilizando estos sensores en una muestra líquida, es posible detectar la presencia, y potencialmente cuantificar la cantidad, de un analito una concentración muy baja. Por ejemplo, pueden detectarse moléculas pequeñas, ADN, ARN, proteínas, carbohidratos, organismos, metabolitos y patógenos (por ejemplo virus) utilizando sensores magnéticos.

10 En general, los sensores magnéticos son partículas magnéticas que se enlazan o de alguna otra manera se unen a su diana molecular previsto para formar aglomerados (agregados). Se cree que cuando las partículas magnéticas se ensamblan en aglomerados y el área transversal efectiva se hace más grande (y la densidad del número de aglomerados es más pequeña), las interacciones con el agua u otras moléculas de solventes se alteran, llevando a un cambio en las ratas de relajación medidas (por ejemplo, T_2 , T_1 , T_2^*), susceptibilidad, frecuencia de precisión, entre otros cambios físicos. Adicionalmente, la formación de aglomerados puede diseñarse para hacer reversible (por ejemplo, por desplazamiento de temperatura, escisión química, desplazamiento de pH, etc.), de tal manera que pueden desarrollarse ensayos "de avance" o "reversos" (competitivos e inhibición) para la detección de analitos específicos. Los tipos de ensayos de avance (aglomeración) y reversos (desaglomeración) pueden utilizarse para detectar una amplia variedad de materiales biológicamente relevantes. El fenómeno de SRM (conmutación de resonancia magnética) fue descrito previamente (véase la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20090029392).

25 Muchos ensayos diagnósticos requieren sensibilidad en el rango picomolar o subpicomolar. En tales ensayos se emplea una concentración igualmente baja de partículas paramagnéticas. Como resultado, los eventos de enlazamiento que llevan a la formación de aglomerados pueden convertirse en una etapa limitante de la velocidad en la terminación del ensayo puesto que la frecuencia de colisión de los antígenos, partículas paramagnéticas y aglomerados formados parcialmente es baja en este rango de concentración (véase Baudry et al., Proc Natl Acad Sci USA, 103:16076 (2006)). La detección actual de agentes infecciosos, ácidos nucleicos, moléculas pequeñas, agentes y organismos de guerra biológica, y dianas moleculares (biomarcadores) o la combinación de dianas moleculares y de inmunoensayo requiere usualmente preparación previa de la muestra, tiempo para analizar la muestra, y pruebas simples para cada uno de los analitos individuales. Hay necesidad de un dispositivo de detección de analitos rápido, comercialmente realizable basado en RMN adecuado para uso con nanosensores magnéticos que tienen cuatro características y calidades únicas: 1) poca o ninguna preparación de la muestra, 2) detección múltiple a través de tipos moleculares múltiples, 3) adquisición rápida de información de diagnóstico y 4) información exacta para tomar decisiones clínicas en el sitio de atención.

La US 2009/134869 A1 divulga un método para detectar la presencia de un analito en una muestra líquida en donde la presencia o concentración de los analitos de interés puede detectarse a través de métodos de relajación por RMN.

40 La WO 2009/026164 A1 divulga un método basado en resonancia magnética para medir la viscosidad de un líquido utilizando partículas de óxido de hierro supermagnéticas.

La US 2010/259259 A1 divulga sistemas y métodos para generar imágenes que incluyen preparar un ferrofluido que incluye nanopartículas magnéticas en un portador líquido, posicionar el ferrofluido en una región de campo de un sistema de imágenes por resonancia magnética, y accionar una velocidad de giro o velocidad lineal de las nanopartículas magnéticas para alterar la susceptibilidad magnética compleja escalar o tensora del ferrofluido.

45 La US 2007/190543 A1 divulga métodos para detectar un analito diana traslocando una molécula codificada a través de un nanoporo, en donde la molécula codificada comprende una pluralidad ordenada de regiones de código.

La WO 2009/045551 A1 divulga dispositivos, sistemas y técnicas relacionadas con una plataforma de diagnóstico por RMN miniaturizada, basada en chip, para la detección cuantitativa y en multicanales rápida de dianas biológicas.

50 Akira Tsukamoto et al. (Development of a SQUID System Using Field Reversal for Rapidly Detecting Bacteria", IEEE TRANSACTIONS ON APPLIED SUPERCONDUCTIVITY, IEEE Service Center, Los Alamitos, CA, US, vol. 19, no. 3, (2009), pages 853-856) divulga un método para la detección de patógenos utilizando HTS_SQUID y marcadores magnéticos.

Resumen de la invención

La invención presenta métodos para la detección de analitos.

La invención se relaciona con un método para detectar la presencia de un patógeno en una muestra de sangre entera, comprendiendo el método:

- 5 (a) proveer una muestra de sangre entera de un sujeto;
- (b) mezclar la muestra de sangre entera con un agente de lisis de eritrocitos para producir glóbulos rojos sanguíneos destruidos;
- 10 (c) después de la etapa (b), centrifugar la muestra para formar un sobrenadante y una pella, descargando una parte o todo el sobrenadante, y resuspendiendo la pella para formar un extracto, lavando opcionalmente la pella antes de resuspender la pella y repetir opcionalmente la etapa (c);
- (d) someter a lisis las células del extracto para formar un lisado;
- (e) colocar el lisado de la etapa (d) en un contenedor y amplificar un ácido nucleico diana en el lisado para formar una solución de lisado amplificada que comprende el ácido nucleico diana, en donde el ácido nucleico diana es característico del patógeno que se va a detectar;
- 15 (f) después de la etapa (e) mezclar la solución lisada amplificada con 1×10^6 a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro de la solución de lisado amplificada para formar una muestra líquida, en donde las partículas magnéticas tienen un diámetro medio que va de 700 nm a 950 nm, una capacidad de relajación T_2 por partícula que va de 1×10^9 a 1×10^{12} $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, y enlazar unidades estructurales sobre su superficie, siendo operativas las unidades estructurales enlazadas para alterar la agregación de las partículas magnéticas en la presencia de un ácido nucleico diana o un agente de enlazamiento multivalente;
- 20 (g) colocar la muestra líquida en un dispositivo, comprendiendo el dispositivo un soporte que define un pozo para sostener el tubo de detección que comprende las partículas magnéticas y el ácido nucleico diana, y teniendo una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina de RF para detectar una señal producida por exposición de la muestra líquida a un campo magnético polarizado creado utilizando uno o más imanes y una secuencia de pulsos de RF;
- 25 (h) exponer la muestra a un campo magnético polarizado y una secuencia de RF;
- (i) después de la etapa (h), medir la señal de la muestra líquida, en donde la muestra líquida comprende opcionalmente proteínas de sangre entera y oligonucleótidos no diana; y
- 30 (j) sobre la base del resultado de la etapa (i) detectar el patógeno, en donde opcionalmente el patógeno es bacterias u hongos, y en donde el método es capaz de detectar una concentración de patógenos de 10 células/mL en la muestra de sangre entera,
- preferiblemente en donde las etapas (a) a (i) se completan al cabo de 3 horas y/o la etapa (i) se lleva a cabo sin ninguna purificación previa de la solución lisada amplificada.

35 Según un método para detectar la presencia de un analito en una muestra líquida, incluyendo el método: (a) poner en contacto una solución con partículas magnéticas para producir una muestra líquida que incluye desde 1×10^6 a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro de la muestra líquida (e.g., desde 1×10^6 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o 1×10^{10} a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro), en donde las partículas magnéticas tienen un diámetro medio desde 150 nm a 699 nm (e.g., desde 150 a 250, 200 a 350, 250 a 450, 300 a 500, 450 a 650, o desde 500 a 699 nm), una capacidad de relajación T_2 por partícula desde 1×10^8 a 1×10^{12} $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (e.g., desde 1×10^8 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o desde 1×10^{10} a 1×10^{12} $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), y unidades estructurales de enlazamiento sobre su superficie, siendo las unidades estructurales de enlazamiento operativas para alterar la agregación de las partículas magnéticas en la presencia del analito o de un agente de enlazamiento multivalente; (b) colocar la muestra líquida en un dispositivo, incluyendo el dispositivo un soporte que define un pozo que contiene la muestra líquida que incluye las partículas magnéticas, el agente de enlazamiento multivalente y el analito, y teniendo una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo configurada la bobina de RF para detectar una señal producida por la exposición de la muestra líquida a un campo magnético polarizado creado utilizando uno o más imanes y una secuencia de pulso RF; (c) exponer la muestra a un campo magnético polarizado y una secuencia de pulso RF; (d) después de la etapa (c), medir la señal; y (e) con base en el resultado de la etapa (d), detectar el analito. En ciertas realizaciones, las partículas magnéticas son sustancialmente monodispersas; exhiben reversibilidad no específica en la ausencia del analito y agente de enlazamiento

40

45

50

- multivalente; y/o las partículas magnéticas incluyen adicionalmente una superficie cubierta con un agente de bloqueo seleccionado de albúmina, gelatina de piel de pez, gammaglobulina, lisozima, caseína, peptidasa, y una unidad estructural que porta amina (por ejemplo, amino polietilenglicol, glicina, etilendiamina, o amino dextrano). En realizaciones particulares, la muestra líquida incluye adicionalmente un regulador, de 0.1% a 3% (p/p) de albúmina (por ejemplo, desde 0.1 % a 0.5%, 0.3% a 0.7%, 0.5% a 1%, 0.8% a 2%, o desde 1.5% a 3% (p/p) de albúmina), de 0.01% a 0.5% de surfactante no iónico (por ejemplo, desde 0.01% a 0.05%, 0.05% a 0.1%, 0.05% a 0.2%, 0.1% a 0.3%, 0.2% a 0.4%, o desde 0.3% a 0.5% surfactante no iónico), o una combinación de los mismos. En todavía otras realizaciones, las partículas magnéticas incluyen una superficie cubierta con 40 µg a 100 µg (por ejemplo, 40 µg a 60 µg, 50 µg a 70 µg, 60 µg a 80 µg, o 80 µg a 100 µg), de una o más proteínas por miligramos de las partículas magnéticas. La muestra líquida puede incluir un agente de enlazamiento multivalente que porta una pluralidad de analitos conjugados a un armazón polimérico. Por ejemplo, el analito puede ser creatinina, la muestra líquida puede incluir un agente de enlazamiento multivalente que porta una pluralidad de conjugados de creatinina y las partículas magnéticas pueden incluir una superficie cubierta con anticuerpos de creatinina. En otra realización, el analito puede ser tacrolimus, la muestra líquida puede incluir un agente de enlazamiento multivalente que porta una pluralidad de conjugados de tacrolimus, y las partículas magnéticas pueden incluir una superficie cubierta con anticuerpos de tacrolimus. En particular las realizaciones del método, etapa (d) incluyen medir la respuesta a relajación T_2 de la muestra líquida, y en donde la aglomeración creciente en la muestra líquida produce un incremento en la rata de relajación T_2 observada de la muestra. En ciertas realizaciones, el analito es un ácido nucleico diana (por ejemplo, ácido nucleico diana extraído de un leucocito, o un patógeno).
- Se divulga un método para detectar la presencia de un analito en una muestra líquida, incluyendo el método (a) poner en contacto una solución con partículas magnéticas para producir una muestra líquida que incluye desde 1×10^6 a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro de la muestra líquida (e.g., desde 1×10^6 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o 1×10^{10} a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro), en donde las partículas magnéticas tiene un diámetro medio de 700 nm a 1200 nm (e.g., desde 700 a 850, 800 a 950, 900 a 1050, o desde 1000 a 1200 nm), una capacidad de relajación T_2 por partícula de 1×10^9 a $1 \times 10^{12} \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (e.g., desde 1×10^9 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o desde 1×10^{10} a $1 \times 10^{12} \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), y tienen unidades estructurales de enlazamiento sobre su superficie, siendo las unidades de enlazamiento operativas para alterar una agregación de las partículas magnéticas en la presencia del analito; (b) colocar la muestra líquida en un dispositivo, incluyendo el dispositivo un soporte que define un pozo que contiene la muestra líquida que incluye las partículas magnéticas, el agente de enlazamiento multivalente y el analito, y que tiene una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina de RF para detectar una señal producida al exponer la muestra líquida a un campo magnético polarizado creado utilizando uno o más magnetos y la secuencia de pulsos RF; (c) exponer la muestra a un campo magnético polarizado y una secuencia de pulsos RF; (d) después de la etapa (c), medir la señal y (e) sobre la base del resultado de la etapa (d), detectar la presencia o concentración de un analito. En ciertas realizaciones, las partículas magnéticas son sustancialmente monodispersas; exhiben reversibilidad no específica en la ausencia del analito y del agente de enlazamiento multivalente; y/o las partículas magnéticas incluyen adicionalmente una superficie cubierta con un agente de bloqueo seleccionado de albúmina, gelatina de piel de pez, gammaglobulina, lisozima, caseína, peptidasa, y una unidad estructural que porta amina (por ejemplo, amino polietilenglicol, glicina, etilendiamina, o amino dextrano). En realizaciones particulares, la muestra líquida incluye además un regulador, desde 0.1% a 3% (p/p) de albúmina (e.g., desde 0.1% a 0.5%, 0.3% a 0.7%, 0.5% a 1%, 0.8% a 2%, o desde 1.5% a 3% (p/p) de albúmina), desde 0.01 % a 0.5% de surfactante no iónico (e.g., desde 0.01 % a 0.05%, 0.05% a 0.1%, 0.05% a 0.2%, 0.1% a 0.3%, 0.2% a 0.4%, o desde 0.3% a 0.5% de surfactante no iónico), o una combinación de los mismos. En todavía otras realizaciones, las partículas magnéticas incluyen una superficie cubierta con 40 mg a 100 mg (e.g., 40 mg a 60 mg, 50 mg a 70 mg, 60 mg a 80 mg, o 80 mg a 100 mg,) de una o más proteínas por miligramo de las partículas magnéticas. La muestra líquida puede incluir un agente de enlazamiento multivalente que porta una pluralidad de analitos conjugados a un armazón polimérico. Por ejemplo, el analito puede ser creatinina, la muestra líquida puede incluir un agente de enlazamiento multivalente que porta una pluralidad de conjugados de creatinina, y las partículas magnéticas pueden incluir una superficie cubierta con anticuerpos de creatinina. En otra realización, el analito puede ser tacrolimus, la muestra líquida puede incluir un agente de enlazamiento multivalente que porta una pluralidad de conjugados de tacrolimus, y las partículas magnéticas pueden incluir una superficie cubierta con anticuerpos de tacrolimus. En realizaciones particulares del método, la etapa (d) incluye medir la respuesta a la relajación T_2 de la muestra líquida, y en donde la aglomeración creciente en la muestra líquida produce un incremento en la rata de relajación T_2 observada de la muestra. En ciertas realizaciones, el analito es un ácido nucleico diana (por ejemplo, un ácido nucleico diana extraído de un leucocito, o un patógeno).
- La invención presenta adicionalmente un método para detectar la presencia de un patógeno en una muestra de sangre entera, incluyendo el método: (a) proveer una muestra de sangre entera de un sujeto; (b) mezclar la muestra de sangre entera con una solución de agente de lisis de eritrocitos para producir células de glóbulos rojos destruidas; (c) después de la etapa (b), centrifugar la muestra para formar un sobrenadante de una pella, descargando una parte o todo el sobrenadante, y resuspendiendo la pella para formar un extracto, opcionalmente lavando la pella (por ejemplo, con regulador TE) antes de resuspender la pella y opcionalmente repetir la etapa (c); (d) someter a lisis las células del extracto para formar un lisado; (e) colocar el lisado de la etapa (d) en un tubo de detección y amplificar un ácido nucleico diana en el lisado para formar una solución de lisado amplificada que incluye el ácido nucleico diana, en donde el ácido nucleico diana es característico del patógeno que va a ser

detectado; (f) después de la etapa (e) agregar al tubo de detección desde 1×10^6 a 1×10^{13} de partículas magnéticas por mililitro de la solución de lisado amplificada (por ejemplo, desde 1×10^6 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o 1×10^{10} a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro), en donde las partículas magnéticas tiene un diámetro medio desde 700 nm a 950 nm, una capacidad de relajación T_2 por partícula de 1×10^9 a 1×10^{12} $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ y unidades de enlazamiento sobre su superficie, siendo las unidades de enlazamiento operativas para alterar la agregación de las partículas magnéticas en la presencia de ácidos nucleico diana o un agente de enlazamiento multivalente; (g) colocar el tubo de detección en un dispositivo, incluyendo el dispositivo un soporte que define un pozo para sostener el tubo de detección que incluye las partículas magnéticas del ácido nucleico diana, y que tiene una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina de RF para detectar una señal producida por la exposición de la muestra líquida al campo magnético polarizado creado utilizando uno o más magnetos y una secuencia de pulsos RF; (h) exponer la muestra a un campo magnético polarizado y una secuencia de pulsos RF; (i) después de la etapa (h), medir la señal del tubo de detección; y (j) sobre la base del resultado de la etapa (i), detectar el patógeno. En ciertas realizaciones, las etapas (a) a (i) se completan al cabo de 4 horas (por ejemplo, al cabo de 3.5 horas, 3.0 horas, 2.5 horas, 2 horas, 1.5 horas, o 1 hora). En otra realización, la etapa (i) se lleva a cabo sin ninguna purificación previa de la solución de lisado amplificada (esto es, la solución lisada no es fraccionada después de que se forma). En realizaciones particulares, la etapa (c) incluye lavar la pella antes de resuspender la pella para formar el extracto. En realizaciones particulares la etapa (d) incluye combinar el extracto con perlas para formar una mezcla y agitar la mezcla para formar un lisado. Las partículas magnéticas pueden incluir una o más poblaciones que tengan una primera sonda y una segunda sonda conjugadas a su superficie, siendo la primera sonda operativa para enlazarse a un primer segmento del ácido nucleico diana y siendo la segunda sonda operativa para enlazarse a un segundo segmento del ácido nucleico diana, en donde las partículas magnéticas forman agregados en la presencia del ácido nucleico diana. Alternativamente, el ensayo puede ser un ensayo de desagregación en el cual las partículas magnéticas incluyen una primera población que tiene una primera unidad estructural de enlazamiento sobre su superficie y una segunda población que tiene una segunda unidad de enlazamiento sobre su superficie, e incluyendo la unidad estructural de enlazamiento multivalente una primera sonda y una segunda sonda, operativa a la primera sonda para enlazarse a la primera unidad estructural de enlazamiento y operativa a la segunda sonda para enlazarse a una segunda unidad estructural de enlazamiento, siendo operativa las unidades de enlazamiento y la unidad de enlazamiento multivalente para alterar una agregación de las partículas magnéticas en la presencia de un ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones las partículas magnéticas son sustancialmente monodispersas; exhiben reversibilidad no específica en la ausencia del analito y agente de enlazamiento multivalente; y/o las partículas magnéticas incluyen adicionalmente una superficie cubierta con un agente de bloqueo seleccionado de albúmina, gelatina de piel de pez, gammaglobulina, lisozima, caseína, peptidasa y una unidad estructural que porta amina (por ejemplo, aminopolietilenglicol, glicina, etilendiamina o aminodextrano). En realizaciones particulares, el lisado incluye adicionalmente un regulador, desde 0.1 % a 3% (p/p) albúmina (e.g., desde 0.1 % a 0.5%, 0.3% a 0.7%, 0.5% a 1%, 0.8% a 2%, o desde 1.5% a 3% (p/p) albúmina), desde 0.01% a 0.5% de surfactante no iónico (e.g., desde 0.01 % a 0.05%, 0.05% a 0.1%, 0.05% a 0.2%, 0.1% a 0.3%, 0.2% a 0.4%, o desde 0.3% a 0.5% de surfactante no iónico), o una combinación de los mismos. en todavía otras realizaciones, las partículas magnéticas incluyen una superficie cubierta con 40 mg a 100 mg (e.g., 40 mg a 60 mg, 50 mg a 70 mg, 60 mg a 80 mg, o 80 mg a 100 mg,) de una o más proteínas por miligramo de las partículas magnéticas. El lisado puede incluir un agente de enlazamiento multivalente que porta una pluralidad de analitos conjugados a un armazón polimérico.

La invención presenta un método para detectar la presencia de un ácido nucleico diana en una muestra de sangre entera, incluyendo el método: (a) proveer una o más células de una muestra de sangre entera de un sujeto; (b) someter a lisis las células de un lisado; (c) amplificar un ácido nucleico diana en el lisado para formar una solución de lisado que comprende el ácido nucleico diana; (d) después de la etapa (c), agregar a un tubo de detección la solución amplificada lisada y desde 1×10^6 a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro de la solución lisada amplificada, en donde las partículas magnéticas tienen un diámetro medio desde 700 nm a 950 nm y unidades estructurales de enlazamiento sobre su superficie, siendo operativas las unidades estructurales de enlazamiento para alterar la agregación de las partículas magnéticas en la presencia del ácido nucleico diana o un agente de enlazamiento multivalente; (e) colocar el tubo de detección en un dispositivo, incluyendo el dispositivo un soporte que define un pozo para contener el tubo de detección que incluye las partículas magnéticas y el ácido nucleico diana, y que tiene una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina de RF para detectar una señal producida exponiendo la muestra líquida a un campo magnético polarizado creado usando uno o más magnetos y una secuencia de pulsos de RF; (f) exponer la muestra a un campo magnético polarizado y una secuencia de pulsos de RF; (g) después de la etapa (f), medir la señal desde el tubo de detección; y (h) sobre la base del resultado de la etapa (g), detectar el ácido nucleico diana. En realizaciones particulares, el ácido nucleico diana es purificado antes de una etapa (d). En realizaciones particulares, la etapa (b) incluye combinar el extracto con perlas para formar una mezcla y agitar la mezcla para formar un lisado. Las partículas magnéticas pueden incluir una o más poblaciones que tienen una primera sonda y una segunda sonda conjugadas a su superficie, siendo operativa la primera sonda para enlazarse a un primer segmento del ácido nucleico diana y siendo operativa la segunda sonda para enlazarse a un segundo segmento del ácido nucleico diana, en donde las partículas magnéticas forman agregados en la presencia del ácido nucleico diana. Alternativamente, el ensayo puede ser un ensayo de desagregación en el cual las partículas magnéticas incluyen una primera población que tiene una primera unidad de enlazamiento sobre su superficie y una segunda población que tiene una segunda unidad estructural de enlazamiento en su superficie, e incluyendo la unidad estructural de enlazamiento multivalente una primera sonda y

una segunda sonda, siendo operativa la primera sonda en la primera unidad estructural de enlazamiento y siendo operativa la segunda para enlazarse a una segunda unidad estructural de enlazamiento, siendo operativas las unidades estructurales de enlazamiento y la unidad estructural de enlazamiento multivalente para alterar una agregación de las partículas magnéticas en la presencia del ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, las partículas magnéticas son sustancialmente monodispersas; exhiben reversibilidad no específica en la ausencia del analito y el agente de enlazamiento multivalente; y/o las partículas magnéticas incluyen adicionalmente una superficie cubierta con un agente bloqueador seleccionado de albúmina, gelatina de piel de pez, gamma globulina, lisozima, caseína, peptidasa y una unidad estructural portadora de amina (e.g., amino polipolietilenglicol, glicina, polietilenediamina, o amino dextrano). En realizaciones particulares, el lisado incluye adicionalmente un regulador, desde 0.1 % a 3% (p/p) albúmina (e.g., desde 0.1 % a 0.5%, 0.3% a 0.7%, 0.5% a 1%, 0.8% a 2%, o desde 1.5% a 3% (p/p) albúmina), desde 0.01% a 0.5% de surfactante no iónico (e.g., desde 0.01% a 0.05%, 0.05% a 0.1%, 0.05% a 0.2%, 0.1% a 0.3%, 0.2% a 0.4%, o desde 0.3% a 0.5% de surfactante no iónico), o una combinación de los mismos. En todavía otras realizaciones, las partículas magnéticas incluyen opcionalmente una superficie cubierta con 40 mg a 100 mg (e.g., 40 mg a 60 mg, 50 mg a 70 mg, 60 mg a 80 mg, o 80 mg a 100 mg,) de una o más proteínas por miligramo de las partículas magnéticas. El lisado puede incluir un agente de enlazamiento multivalente que porta una pluralidad de analitos conjugados a un armazón polimérico.

La invención presenta adicionalmente un método para detectar la presencia de un ácido nucleico diana en una muestra de sangre entera, incluyendo el método: (a) proveer un extracto producido por lisis de los glóbulos rojos en una muestra de sangre entera de un sujeto, centrifugar la muestra para formar un sobrenadante y una pella, descartar todo o una parte del sobrenadante, y resuspender la pella para formar un extracto, lavar opcionalmente la pella (por ejemplo, con un regulador TE)) antes de resuspender la pella y repetir opcionalmente la centrifugación, descartar y lavado de la etapa (a); (b) someter a lisis las células en el extracto para formar un lisado; (c) colocar el lisado de la etapa (b) en un tubo de detección y amplificar los ácidos nucleicos contenidos para formar una solución lisada amplificada que incluye desde 40% (p/p) a 95% (p/p) del ácido nucleico diana (e.g., desde 40 a 60%, desde 60 a 80%, o desde 85 a 95% (p/p) del ácido nucleico diana) y desde 5% (p/p) a 60% (p/p) de ácido nucleico no diana (e.g., desde 5 a 20%, desde 20 a 40%, o desde 40 a 60% (p/p) de ácido nucleico no diana); (d) después de la etapa (c), agregar al tubo de detección de 1×10^6 a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro de la solución lisada amplificada, en donde las partículas magnéticas tienen un diámetro medio desde 700 nm a 950 nm y unidades estructurales de enlazamiento sobre su superficie, siendo operativas las unidades estructurales de enlazamiento para alterar la agregación de las partículas magnéticas en la presencia del ácido nucleico diana o un agente de enlazamiento multivalente; (e) colocar el tubo de detección en un dispositivo, incluyendo el dispositivo un soporte que define un pozo para contener el tubo de detección que incluye las partículas magnéticas y el ácido nucleico diana, y que tiene una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina de RF para detectar una señal producida exponiendo la muestra líquida a un campo magnético polarizado creado usando uno o más magnetos y una secuencia de pulsos de RF; (f) exponer la muestra a un campo magnético polarizado y una secuencia de pulsos de RF; (g) después de la etapa (f), medir la señal desde el tubo de detección; y (h) sobre la base del resultado de la etapa (g), detectar el ácido nucleico diana, en donde la etapa (g) se lleva a cabo sin ninguna purificación previa de la solución lisada amplificada. En realizaciones particulares, la etapa (b) incluye combinar el extracto con perlas para formar una mezcla y agitar la mezcla para formar un lisado. Las partículas magnéticas pueden incluir una o más poblaciones que tienen una primera sonda y una segunda sonda conjugadas a su superficie, siendo operativa la primera sonda para enlazarse a un primer segmento del ácido nucleico diana y siendo operativa la segunda sonda para enlazarse a un segundo segmento del ácido nucleico diana, en donde las partículas magnéticas forman agregados en la presencia del ácido nucleico diana. Alternativamente, el ensayo puede ser un ensayo de desagregación en el cual las partículas magnéticas incluyen una primera población que tiene una primera unidad de enlazamiento sobre su superficie y una segunda población que tiene una segunda unidad estructural de enlazamiento en su superficie, e incluyendo la unidad estructural de enlazamiento multivalente una primera sonda y una segunda sonda, siendo operativa la primera sonda en la primera unidad estructural de enlazamiento y siendo operativa la segunda para enlazarse a una segunda unidad estructural de enlazamiento, siendo operativas las unidades estructurales de enlazamiento y la unidad estructural de enlazamiento multivalente para alterar una agregación de las partículas magnéticas en la presencia del ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, las partículas magnéticas son sustancialmente monodispersas; exhiben reversibilidad no específica en la ausencia del analito y el agente de enlazamiento multivalente; y/o las partículas magnéticas incluyen adicionalmente una superficie cubierta con un agente bloqueador seleccionado de albúmina, gelatina de piel de pez, gamma globulina, lisozima, caseína, peptidasa y una unidad estructural portadora de amina (e.g., amino polipolietilenglicol, glicina, polietilenediamina, o amino dextrano). En realizaciones particulares, el lisado incluye adicionalmente un regulador, desde 0.1 % a 3% (p/p) albúmina (e.g., desde 0.1% a 0.5%, 0.3% a 0.7%, 0.5% a 1%, 0.8% a 2%, o desde 1.5% a 3% (p/p) albúmina), desde 0.01% a 0.5% de surfactante no iónico (e.g., desde 0.01 % a 0.05%, 0.05% a 0.1%, 0.05% a 0.2%, 0.1% a 0.3%, 0.2% a 0.4%, o desde 0.3% a 0.5% de surfactante no iónico), o una combinación de los mismos. En todavía otras realizaciones, las partículas magnéticas incluyen una superficie cubierta con 40 mg a 100 mg (e.g., 40 mg a 60 mg, 50 mg a 70 mg, 60 mg a 80 mg, o 80 mg a 100 mg,) de una o más proteínas por miligramo de las partículas magnéticas. El lisado puede incluir un agente de enlazamiento multivalente que porta una pluralidad de analitos conjugados a un armazón polimérico.

En una realización preferida, la invención presenta un método para detectar la presencia de un patógeno en una

muestra de sangre entera como se describió más arriba, en donde el patógeno es una especie de *Candida*, en donde dicha amplificación se hace en la presencia de un cebador de avance y un cebador reverso, cada uno de los cuales es universal para múltiples especies de *Candida* para formar una solución que incluye un amplicón de *Candida*; dichas unidades estructurales de enlazamiento son operativas para alterar la agregación de las partículas magnéticas en la presencia de un amplicón de *Candida* o un agente de enlazamiento multivalente. En ciertas realizaciones, las partículas magnéticas son sustancialmente monodispersas; exhiben reversibilidad no específica en la ausencia del analito y el agente de enlazamiento multivalente; y/o las partículas magnéticas incluyen adicionalmente una superficie cubierta con un agente bloqueador seleccionado de albúmina, gelatina de piel de pez, gamma globulina, lisozima, caseína, peptidasa y una unidad estructural portadora de amina (e.g., amino polipolietilenglicol, glicina, polietilenediamina, o amino dextrano). En realizaciones particulares, la muestra líquida incluye adicionalmente un regulador, desde 0.1% a 3% (p/p) albúmina (e.g., desde 0.1% a 0.5%, 0.3% a 0.7%, 0.5% a 1%, 0.8% a 2%, o desde 1.5% a 3% (p/p) albúmina), desde 0.01% a 0.5% de surfactante no iónico (e.g., desde 0.01 % a 0.05%, 0.05% a 0.1%, 0.05% a 0.2%, 0.1% a 0.3%, 0.2% a 0.4%, o desde 0.3% a 0.5% de surfactante no iónico), o una combinación de los mismos. En todavía otras realizaciones, las partículas magnéticas incluyen una superficie cubierta con 40 mg a 100 mg (e.g., 40 mg a 60 mg, 50 mg a 70 mg, 60 mg a 80 mg, o 80 mg a 100 mg,) de una o más proteínas por miligramo de las partículas magnéticas. La muestra líquida puede incluir un agente de enlazamiento multivalente que porta una pluralidad de analitos conjugados a un armazón polimérico. El cebador de avance puede incluir, por ejemplo, la secuencia 5'-GGC ATG CCT GTT TGA GCG TC-3' (SEQ ID NO. 1). El cebador reverso puede incluir, por ejemplo, la secuencia 5'-GCT TAT TGA TAT GCT TAA GTT CAG CGG GT-3' (SEQ ID NO. 2). En ciertas realizaciones, (i) la especie de *Candida* es *Candida albicans*, la primera sonda incluye la secuencia de oligonucleótidos 5'-ACC CAG CGG TTT GAG GGA GAA AC-3' (SEQ ID NO. 3), y la segunda sonda incluye la secuencia de oligonucleótidos 5'-AAA GTT TGA AGA TAT ACG TGG TGG ACG TTA-3' (SEQ ID NO. 4); (ii) la especie de *Candida* es *Candida krusei* y la primera sonda y la segunda sonda incluyen una secuencia de oligonucleótidos seleccionada de: 5'-CGC ACG CGC AAG ATG GAA ACG-3' (SEQ ID NO. 5), 5'-AAG TTC AGC GGG TAT TCC TAC CT-3' (SEQ ID NO. 6), y 5'-AGC TTT TTG TTG TCT CGC AAC ACT CGC-3' (SEQ ID NO. 32); (iii) la especie de *Candida* es *Candida glabrata*, la primera sonda incluye la secuencia de oligonucleótidos: 5'-CTA CCA AAC ACA ATG TGT TTG AGA AG-3' (SEQ ID NO. 7), y la segunda sonda incluye la secuencia de oligonucleótidos: 5'-CCT GAT TTG AGG TCA AAC TTA AAG ACG TCT G-3' (SEQ ID NO. 8); y (iv) la especie de *Candida* es *Candida parapsilosis* o *Candida tropicalis* y la primera sonda y la segunda sonda incluyen una secuencia de oligonucleótidos seleccionada de: 5'-AGT CCT ACC TGA TTT GAG GTCNitIndAA-3' (SEQ ID NO. 9), 5'-CCG NitIndGG GTT TGA GGG AGA AAT-3' (SEQ ID NO. 10), AAA GTT ATG AAATAA ATT GTG GTG GCC ACT AGC (SEQ ID NO. 33), ACC CGG GGGTTT GAG GGA GAA A (SEQ ID NO. 34), AGT CCT ACC TGA TTT GAG GTC GAA (SEQ ID NO. 35), y CCG AGG GTT TGA GGG AGA AAT (SEQ ID NO. 36). En ciertas realizaciones, las etapas (a) a (h) son completadas al cabo de 4 horas (e.g., al cabo de 3.5 horas, 3.0 horas, 2.5 horas, 2 horas, 1.5 horas, o 1 hora o menos). En realizaciones particulares, las partículas magnéticas incluyen dos poblaciones, una primera población que porta la primera sonda sobre su superficie, y la segunda población que porta la segunda sonda sobre su superficie. En otra realización, las partículas magnéticas son una población simple que porta tanto la primera sonda como la segunda sonda sobre la superficie de las partículas magnéticas. Las partículas magnéticas pueden incluir una o más poblaciones que tienen una primera sonda y una segunda sonda conjugada a su superficie, operativa la primera sonda para enlazarse a un primer segmento del amplicón de *Candida* y la segunda sonda operativa para enlazarse a un segundo segmento del amplicón de *Candida* en donde las partículas magnéticas forman agregados en la presencia del ácido nucleico diana. Alternativamente, el ensayo puede ser un ensayo de desagregación en el cual las partículas magnéticas incluyen una primera población que tiene una primera unidad estructural de enlazamiento sobre su superficie y una segunda población que tiene una segunda unidad estructural de enlazamiento sobre su superficie, y la unidad estructural de enlazamiento multivalente que incluye una primera sonda y una segunda sonda, siendo operativa la primera sonda para enlazarse a la primera unidad estructural de enlazamiento y siendo operativa la segunda sonda para enlazarse a la segunda unidad estructural de enlazamiento, siendo las unidades estructurales de enlazamiento y unidad estructural de enlazamiento multivalente operativas para alterar una agregación de las partículas magnéticas en la presencia del amplicón de *Candida*. En realizaciones particulares, el método puede producir (i) un coeficiente de variación en el valor T2 de menos de 20% sobre muestras positivas en *Candida*; (ii) al menos 95% de detección correcta a menos de o igual a 5 células/mL en muestras tomadas en 50 muestras individuales de sangre de pacientes saludables; (iii) al menos 95% de detección correcta menor de o igual a 5 células/mL en muestras seleccionadas en 50 muestras individuales de sangre de pacientes no saludables; y (iv) más de o igual a 80% de detección correcta en muestras de pacientes clínicamente positivos (esto es, positivos en *Candida* por otra técnica, tal como por cultivo celular) comenzando con 2 mL de sangre.

Se divulga un método para detectar la presencia de una especie de *Candida* en una muestra de sangre entera, incluyendo el método: (a) proveer un extracto producido por lisis de las células de los glóbulos rojos sanguíneos en una muestra de sangre entera de un sujeto; (b) centrifugar la muestra para formar un sobrenadante y una pella, descartando una parte o todo el sobrenadante; (c) lavar la pella (por ejemplo, con regulador TE) mezclando la pella con un regulador, agitando la muestra (por ejemplo, por vórtex), centrifugando la muestra para formar un sobrenadante y una pella, descartando una parte o todo el sobrenadante; (d) repetir opcionalmente las etapas (b) y (c); (e) agitar con perlas la pella para formar un lisado en la presencia de un regulador (por ejemplo, regulador TE); (f) centrifugar la muestra para formar un sobrenadante que contiene el lisado; (g) amplificar los ácidos nucleicos en el lisado de la etapa (f) para formar un amplicón de *Candida*; y (h) detectar la presencia de amplicón de *Candida*, en

5 donde, el método puede producir (i) al menos 95% de detección correcta a menos de o igual a 5 células/mL en muestras sembradas en 50 muestras individuales de sangre de pacientes saludables; (ii) al menos 95% de detección correcta menor o igual a 5 células/mL en muestras sembradas de 50 muestras individuales de sangre de pacientes no saludables; y/o (iii) mayor de o igual a 80% de detección correcta en muestras de pacientes clínicamente positivos (esto es, positivos en Candida por cultivos celulares) comenzando con 2 mL de sangre en la etapa (a).

10 Se divulga un método para detectar la presencia de un patógeno en una muestra de sangre entera, incluyendo el método de las etapas de (a) proveer desde 0.05 a 4.0 mL de la muestra de sangre entera (por ejemplo, de 0.05 a 0.25, 0.25 a 0.5, 0.25 a 0.75, 0.4 a 0.8, 0.5 a 0.75, 0.6 a 0.9, 0.65 a 1.25, 1.25 a 2.5, 2.5 a 3.5, o 3.0 a 4.0 mL de sangre entera); (b) colocar un alícuota de la muestra de la etapa (a) en un contenedor y amplificar un ácido nucleico diana en la muestra para formar una solución amplificada que incluye el ácido nucleico diana, en donde el ácido nucleico diana es característico del patógeno que va a ser detectado; (c) colocar la muestra líquida amplificada en un dispositivo de detección; (d) sobre la base del resultado de la etapa (c), detectar el patógeno, en donde el patógeno es seleccionado de bacterias y hongos, y en donde el método es capaz de detectar una concentración de patógeno de 10 células/mL (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 células/mL) en la muestra de sangre entera. El dispositivo de detección puede detectar el patógeno a través de una medición óptica, fluorescente, de masa, densidad, magnética, cromatográfica y/o electroquímica de la muestra líquida amplificada. En ciertas realizaciones, las etapas (a) a (d) se completan al cabo de 3 horas (por ejemplo, al cabo de 3.2, 2.9, 2.7, 2.5, 2.3, 2.2, 2.1, 2.0, 1.9, 1.8, 1.7, 1.6, o 1.5 horas o 1 hora). En todavía otras realizaciones, la etapa (c) se lleva a cabo sin ninguna purificación previa de la solución amplificada y/o la muestra líquida de la etapa (c) incluye proteínas de la sangre entera y oligonucleótidos no diana. En ciertas realizaciones, el patógeno se selecciona de bacterias y hongos. El patógeno puede ser cualquier patógeno bacteriano o fúngico descrito aquí.

25 La invención también presenta un método para detectar la presencia de un patógeno en una muestra de sangre entera, incluyendo el método las etapas de: (a) proveer una muestra de sangre entera de un sujeto; (b) mezclar de 0.05 a 4.0 mL de la muestra de sangre entera (e.g., desde 0.05 a 0.25, 0.25 a 0.5, 0.25 a 0.75, 0.4 a 0.8, 0.5 a 0.75, 0.6 a 0.9, 0.65 a 1.25, 1.25 a 2.5, 2.5 a 3.5, o 3.0 a 4.0 mL de sangre entera) con una solución de agente de lisis de eritrocitos para producir glóbulos rojos destruidos; (c) después de la etapa (b), centrifugar la muestra para formar un sobrenadante y una pella, descartar todo o una parte del sobrenadante, y resuspender la pella para formar un extracto, lavar opcionalmente la pella (por ejemplo, con un regulador TE)) antes de resuspender la pella y opcionalmente repetir la etapa (c); (d) someter a lisis las células del extracto para formar un lisado; (e) colocar el lisado de la etapa (d) en un contenedor y amplificar un ácido nucleico diana en el lisado para formar una solución de lisado amplificado que incluye el ácido nucleico diana, en donde el ácido nucleico diana es característico del patógeno que va a ser detectado; (f) después de la etapa (e), mezclar la solución de lisado amplificada desde 1×10^6 a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro de la solución lisada amplificada para formar una muestra líquida (e.g., desde 1×10^6 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o 1×10^{10} a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro), en donde las partículas magnéticas tienen un diámetro medio desde 700 nm a 950 nm, una capacidad de relajación T2 por partícula desde 1×10^9 a 1×10^{12} $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, y unidades estructurales de enlazamiento sobre su superficie, siendo operativas las unidades estructurales de enlazamiento para alterar la agregación de las partículas magnéticas en la presencia del ácido nucleico diana o un agente de enlazamiento multivalente; (g) colocar la muestra líquida en un dispositivo, incluyendo el dispositivo un soporte que define un pozo para contener el tubo de detección que incluye las partículas magnéticas y el ácido nucleico diana, y que tiene una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina de RF para detectar una señal producida exponiendo la muestra líquida a un campo magnético polarizado creado usando uno o más magnetos y una secuencia de pulsos de RF; (h) exponer la muestra a un campo magnético polarizado y una secuencia de pulsos de RF; (i) después de la etapa (h), medir la señal de la muestra líquida; y (j) sobre la base del resultado de la etapa (i), detectar el patógeno, en donde el patógeno es seleccionado de bacterias y hongos, y en donde el método es capaz de detectar una concentración de patógeno de 10 células/mL (e.g., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 células/mL) en la muestra de sangre entera. En ciertas realizaciones, las etapas (a) a (i) son completadas al cabo de 3 horas (e.g., al cabo de 3.2, 2.9, 2.7, 2.5, 2.3, 2.2, 2.1, 2.0, 1.9, 1.8, 1.7, 1.6, 1.5, o 1 o menos horas). En todavía otras realizaciones, la etapa (i) se lleva a cabo sin ninguna purificación previa de la solución lisada amplificada, y/o la muestra líquida de la etapa (i) incluye proteínas de sangre entera y oligonucleótidos no diana. En ciertas realizaciones, donde el patógeno es seleccionado de bacterias y hongos. El patógeno puede ser cualquier patógeno bacteriano o fúngico descrito aquí. En realizaciones particulares el método es capaz de medir una concentración de patógeno de 10 células/mL en la muestra de sangre entera con un coeficiente de variación de menos de 15% (e.g., 10 células/mL con un coeficiente de variación de menos de 15%, 10%, 7.5%, o 5%; o 25 células/mL con un coeficiente de variación de menos de 15%, 10%, 7.5%, o 5%; o 50 células/mL con un coeficiente de variación de menos de 15%, 10%, 7.5%, o 5%). En ciertas realizaciones, las partículas magnéticas son sustancialmente monodispersas; exhiben reversibilidad no específica en la ausencia del analito y el agente de enlazamiento multivalente; y/o las partículas magnéticas incluyen adicionalmente una superficie cubierta con un agente bloqueador seleccionado de albúmina, gelatina de piel de pez, gamma globulina, lisozima, caseína, peptidasa y una unidad estructural portadora de amina (e.g., amino polipolietilenglicol, glicina, polietilenediamina, o amino dextrano). En realizaciones particulares, la muestra líquida incluye adicionalmente un regulador, desde 0.1% a 3% (p/p) albúmina (e.g., desde 0.1% a 0.5%, 0.3% a 0.7%, 0.5% a 1%, 0.8% a 2%, o desde

1.5% a 3% (p/p) albúmina), desde 0.01% a 0.5% de surfactante no iónico (e.g., desde 0.01% a 0.05%, 0.05% a 0.1%, 0.05% a 0.2%, 0.1% a 0.3%, 0.2% a 0.4%, o desde 0.3% a 0.5% de surfactante no iónico), o una combinación de los mismos. En todavía otras realizaciones, las partículas magnéticas incluyen una superficie cubierta con 40 mg a 100 mg (e.g., 40 mg a 60 mg, 50 mg a 70 mg, 60 mg a 80 mg, o 80 mg a 100 mg,) de una o más proteínas por miligramo de las partículas magnéticas. La muestra líquida puede incluir un agente de enlazamiento multivalente que porta una pluralidad de analitos conjugados a un armazón polimérico. El método para monitorización puede incluir cualquiera de los métodos de aglomeración magnética asistidos descritos aquí. Las partículas magnéticas pueden incluir una o más poblaciones que tienen una primera sonda y una segunda sonda conjugadas a su superficie, siendo operativa la primera sonda para enlazarse a un primer segmento del ácido nucleico diana y siendo operativa la segunda sonda para enlazarse a un segundo segmento del ácido nucleico diana, en donde las partículas magnéticas forman agregados en la presencia del ácido nucleico diana. Alternativamente, el ensayo puede ser un ensayo de desagregación en el cual las partículas magnéticas incluyen una primera población que tiene una primera unidad de enlazamiento sobre su superficie y una segunda población que tiene una segunda unidad estructural de enlazamiento en su superficie, e incluyendo la unidad estructural de enlazamiento multivalente una primera sonda y una segunda sonda, siendo operativa la primera sonda en la primera unidad estructural de enlazamiento y siendo operativa la segunda para enlazarse a una segunda unidad estructural de enlazamiento, siendo operativas las unidades estructurales de enlazamiento y la unidad estructural de enlazamiento multivalente para alterar una agregación de las partículas magnéticas en la presencia del ácido nucleico diana.

La invención adicionalmente presenta un método para detectar la presencia de un virus en una muestra de sangre entera, incluyendo el método las etapas de: (a) proveer una muestra de plasma de un sujeto; (b) mezclar de 0.05 a 4.0 mL de la muestra de plasma (e.g., desde 0.05 a 0.25, 0.25 a 0.5, 0.25 a 0.75, 0.4 a 0.8, 0.5 a 0.75, 0.6 a 0.9, 0.65 a 1.25, 1.25 a 2.5, 2.5 a 3.5, o 3.0 a 4.0 mL de sangre entera) con un agente de lisis para producir una mezcla que comprende virus destruidos; (c) colocar la muestra de la etapa (b) en un contenedor y amplificar un ácido nucleico diana en el filtrado para formar una solución filtrada amplificada que incluye el ácido nucleico diana, en donde el ácido nucleico diana es característico del virus que va a ser detectado; (d) después de la etapa (c), mezclar la solución filtrada amplificada con desde 1×10^6 a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro de la solución filtrada amplificada para formar una muestra líquida (e.g., desde 1×10^6 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^8 , 13107 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o 1×10^{10} a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro), en donde las partículas magnéticas tienen un diámetro medio desde 700 nm a 950 nm, una capacidad de relajación T2 por partícula desde 1×10^9 a 1×10^{12} $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, y unidades estructurales de enlazamiento sobre su superficie, siendo operativas las unidades estructurales de enlazamiento para alterar la agregación de las partículas magnéticas en la presencia del ácido nucleico diana o un agente de enlazamiento multivalente; (e) colocar la muestra líquida en un dispositivo, incluyendo el dispositivo un soporte que define un pozo para contener el tubo de detección que incluye las partículas magnéticas y el ácido nucleico diana, y que tiene una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina de RF para detectar una señal producida exponiendo la muestra líquida a un campo magnético polarizado creado usando uno o más magnetos y una secuencia de pulsos de RF; (f) exponer la muestra líquida a un campo magnético polarizado y una secuencia de pulsos de RF; (g) después de la etapa (f), medir la señal de la muestra líquida; y (h) sobre la base del resultado de la etapa (g), detectar el virus, en donde el método es capaz de detectar menos de 100 copias de virus (e.g., menos de 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, o 10 copias) en la muestra de sangre entera. En ciertas realizaciones, las etapas (a) a (g) son completadas al cabo de 3 horas (e.g., al cabo de 3.2, 2.9, 2.7, 2.5, 2.3, 2.2, 2.1, 2.0, 1.9, 1.8, 1.7, 1.6, 1.5 horas, o 1 hora o menos). El virus puede ser cualquier patógeno viral descrito aquí. En ciertas realizaciones, las partículas magnéticas son sustancialmente monodispersas; exhiben reversibilidad no específica en la ausencia del analito y el agente de enlazamiento multivalente; y/o las partículas magnéticas incluyen adicionalmente una superficie cubierta con un agente bloqueador seleccionado de albúmina, gelatina de piel de pez, gamma globulina, lisozima, caseína, peptidasa y una unidad estructural portadora de amina (e.g., amino polipolietilenglicol, glicina, polietilenediamina, o amino dextrano). En realizaciones particulares, la muestra líquida incluye adicionalmente un regulador, desde 0.1 % a 3% (p/p) albúmina (e.g., desde 0.1 % a 0.5%, 0.3% a 0.7%, 0.5% a 1%, 0.8% a 2%, o desde 1.5% a 3% (p/p) albúmina), desde 0.01% a 0.5% de surfactante no iónico (e.g., desde 0.01% a 0.05%, 0.05% a 0.1%, 0.05% a 0.2%, 0.1% a 0.3%, 0.2% a 0.4%, o desde 0.3% a 0.5% de surfactante no iónico), o una combinación de los mismos. En todavía otras realizaciones, las partículas magnéticas incluyen una superficie cubierta con 40 mg a 100 mg (e.g., 40 mg a 60 mg, 50 mg a 70 mg, 60 mg a 80 mg, o 80 mg a 100 mg,) de una o más proteínas por miligramo de las partículas magnéticas. La muestra líquida puede incluir un agente de enlazamiento multivalente que porta una pluralidad de analitos conjugados a un armazón polimérico. El método para monitorización puede incluir cualquiera de los métodos de aglomeración magnética asistidos descritos aquí. Las partículas magnéticas pueden incluir una o más poblaciones que tienen una primera sonda y una segunda sonda conjugadas a su superficie, siendo operativa la primera sonda para enlazarse a un primer segmento del ácido nucleico diana y siendo operativa la segunda sonda para enlazarse a un segundo segmento del ácido nucleico diana, en donde las partículas magnéticas forman agregados en la presencia del ácido nucleico diana. Alternativamente, el ensayo puede ser un ensayo de desagregación en el cual las partículas magnéticas incluyen una primera población que tiene una primera unidad de enlazamiento sobre su superficie y una segunda población que tiene una segunda unidad estructural de enlazamiento en su superficie, e incluyendo la unidad estructural de enlazamiento multivalente una primera sonda y una segunda sonda, siendo operativa la primera sonda en la primera unidad estructural de enlazamiento y siendo operativa la segunda para enlazarse a una segunda unidad estructural de enlazamiento, siendo operativas las unidades estructurales de enlazamiento y la unidad estructural de enlazamiento multivalente para alterar una agregación de las partículas magnéticas en la

presencia del ácido nucleico diana.

En cualquiera de los métodos de la invención en los cuales se lleva a cabo la amplificación por PCR, el método de PCR puede ser PCR en tiempo real para cuantificar la cantidad de un ácido nucleico diana presente en una mezcla.

5 Se divulga un método para cuantificar una molécula de ácido nucleico diana en una muestra amplificando la molécula de ácido nucleico diana (por ejemplo utilizando amplificación por PCR o isotérmica) en una mezcla de reacción de amplificación en tubo de detección dando como resultado la producción de amplicones correspondientes a la molécula de ácido nucleico objetivo, en donde la mezcla de reacción de amplificación incluye (1) una molécula de ácido nucleico diana, (2) cebadores de amplificación marcados con biotina específicos para la molécula de ácido nucleico diana, y (3) partículas superparamagnéticas marcadas con avidina. En este método, la amplificación se
10 lleva a cabo en un dispositivo que incluye un soporte que define un pozo para contener el tubo de detección incluyendo las partículas superparamagnéticas y la molécula de ácido nucleico diana, y que tiene una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina de RF para detectar una señal producida por la exposición de la muestra a un campo magnético polarizado creado utilizando uno o más magnetos y una secuencia de pulsos de RF. En este método, la amplificación incluye las siguientes etapas:

- 15 (a) ejecutar uno o más ciclos de amplificación;
- (b) exponer la mezcla de reacción de amplificación a condiciones que permitan la agregación o desagregación de las partículas superparamagnéticas marcadas con avidina,
- (c) exponer la muestra a un campo magnético polarizado y una secuencia de pulsos de RF;
- (d) después de la etapa (c), medir la señal desde el tubo de detección;
- 20 (e) repetir las etapas (a)-(d) hasta que se obtenga una cantidad deseada de amplificación; y
- (f) sobre la base del resultado de la etapa (d), cuantificar los amplicones presentes en el ciclo correspondiente de amplificación.

En este método, la cantidad inicial de la molécula de ácido nucleico diana en la muestra se determina con base en la cantidad de amplicones en cada ciclo del PCR.

25 Se divulga un método para cuantificar una molécula de ácido nucleico en una muestra amplificando la molécula de ácido nucleico diana (e.g., usando PCR o amplificación isotérmica) en una mezcla de reacción de amplificación en un tubo de detección en la producción de amplicones correspondiente a la molécula de ácido nucleico diana. En este método, la mezcla de reacción de amplificación incluye (1) una molécula de ácido nucleico diana, (2) cebadores de amplificación que incluyen un sobrante 5', en donde los cebadores de amplificación son específicos para la molécula
30 de ácido nucleico diana, y (3) partículas superparamagnéticas marcadas con oligonucleótidos, en donde el marcador oligonucleótido es sustancialmente complementario al sobrante en 5' de los cebadores de amplificación. En este método, la amplificación se lleva a cabo en un dispositivo que incluye un soporte que define un pozo para contener el tubo de detección que incluye las partículas superparamagnéticas y la molécula de ácido nucleico diana, y que tiene una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina de RF para detectar una señal
35 producida al exponer la muestra a un campo magnético polarizado creado usando uno o más magnetos y una secuencia de pulsos de RF. En este método, la amplificación incluye después las etapas de la etapas:

- (a) ejecutar uno o más ciclos de amplificación;
- (b) exponer la mezcla de reacción de amplificación a condiciones que permiten la hibridación de las partículas superparamagnéticas marcadas con oligonucleótidos con el sobrante en 5';
- 40 (c) exponer la muestra a un campo magnético polarizado y una secuencia de pulsos de RF;
- (d) después de la etapa (c), medir la señal desde el tubo de detección;
- (e) repetir las etapas (a)-(d) hasta que se obtenga una cantidad deseada de amplificación; y
- (f) sobre la base del resultado de la etapa (d), cuantificar los amplicones presentes en el ciclo correspondiente de amplificación.

45 En este método, la cantidad inicial de la molécula de ácido nucleico diana en la muestra se determina con base en la cantidad de amplicones en cada ciclo de amplificación.

Se divulga un método para cuantificar una molécula de ácido nucleico en una muestra amplificando la molécula de ácido nucleico diana (e.g., usando PCR o amplificación isotérmica) en una mezcla de reacción de amplificación en un tubo de detección en la producción de amplicones correspondiente a la molécula de ácido nucleico diana. En este método la mezcla de reacción de amplificación incluye (1) una molécula de ácido nucleico diana, (2) cebadores de amplificación específicos para la molécula de ácido nucleico diana, y (3) partículas superparamagnéticas marcadas con oligonucleótidos, en donde el marcador de oligonucleótido contiene una estructura de horquilla y una porción de la estructura de horquilla es sustancialmente complementaria a una porción de la secuencia de ácidos nucleicos de los amplicones. En este método, la amplificación se lleva a cabo en un dispositivo que incluye un soporte que define un pozo para contener el tubo de detección que incluye las partículas superparamagnéticas y la molécula de ácido nucleico diana, y que tiene una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina de RF para detectar una señal producida al exponer la muestra a un campo magnético polarizado creado usando uno o más magnetos y una secuencia de pulsos de RF. Esta amplificación de este método incluye después las etapas de:

(a) ejecutar uno o más ciclos de amplificación;

(b) exponer la mezcla de reacción de amplificación a condiciones que permiten la hibridación de la porción de la estructura de horquilla (3) con los amplicones;

(c) exponer la muestra a un campo magnético polarizado y una secuencia de pulsos de RF;

(d) después de la etapa (c), medir la señal desde el tubo de detección;

(e) repetir las etapas (a)-(d) hasta que se obtenga una cantidad deseada de amplificación; y

(f) sobre la base del resultado de la etapa (d), cuantificar los amplicones presentes en el ciclo correspondiente de amplificación.

En este método, la cantidad inicial de la molécula de ácido nucleico diana en la muestra se determina con base en la cantidad de amplicones en cada ciclo de amplificación.

Se divulga también un método para cuantificar una molécula de ácido nucleico diana en una muestra amplificando la molécula de ácido nucleico diana usando PCR en una mezcla de reacción de amplificación en un tubo de detección dando como resultado la producción de amplicones correspondientes a la molécula de ácido nucleico diana. En este método, la mezcla de reacción de amplificación incluye (1) una molécula de ácido nucleico diana, (2) una polimerasa con actividad de 5' exonucleasa, (3) cebadores de amplificación específicos para la molécula de ácido nucleico diana, y (4) partículas superparamagnéticas unidas a oligonucleótidos, en donde la unión a los oligonucleótidos conecta al menos dos partículas superparamagnéticas y la unión con el oligonucleótido es sustancialmente complementaria a una porción de la secuencia de ácidos nucleicos de los amplicones. En este método, la amplificación se lleva a cabo en un dispositivo que incluye un soporte que define un pozo para contener el tubo de detección que incluye las partículas superparamagnéticas y la molécula de ácido nucleico diana, y que tiene una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina de RF para detectar una señal producida al exponer la muestra a un campo magnético polarizado creado usando uno o más magnetos y una secuencia de pulsos de RF. La amplificación de este método incluye después etapas de:

(a) llevar a cabo uno o más ciclos de PCR bajo condiciones que permitan la hibridación de la unión al oligonucleótido a un amplicón durante la fase de extensión del PCR, en donde durante la fase de extensión del PCR, la actividad de 5' exonucleasa de la polimerasa desune las al menos dos partículas superparamagnéticas permitiendo un descenso en la agregación de las partículas superparamagnéticas;

(b) exponer la muestra a un campo magnético polarizado y una secuencia de pulsos de RF;

(c) después de la etapa (b), medir la señal desde el tubo de detección;

(d) repetir las etapas (a)-(c) hasta que el PCR esté completo; y

(e) sobre la base del resultado de la etapa (c), cuantificar los amplicones presentes en el correspondiente ciclo de PCR.

En este método, la cantidad inicial de la molécula de ácido nucleico diana en la muestra se determina con base en la cantidad de amplicones en cada ciclo del PCR.

Se divulga también un método para cuantificar una molécula de ácido nucleico diana en una muestra amplificando la molécula de ácido nucleico diana (e.g., usando PCR o amplificación isotérmica) en una mezcla de reacción de

amplificación en un tubo de detección dando como resultado la producción de amplicones correspondiente a la molécula de ácido nucleico diana. En este método, la mezcla de reacción de amplificación incluye (1) una molécula de ácido nucleico diana, (2) cebadores de amplificación específicos para la molécula de ácido nucleico diana, y (3) partículas superparamagnéticas marcadas con una pluralidad de oligonucleótidos, en donde un primer grupo de la pluralidad de oligonucleótidos es sustancialmente complementario a una porción de la secuencia de ácidos nucleicos de los amplicones y sustancialmente complementario a un segundo grupo de la pluralidad de oligonucleótidos, en donde el primer grupo de la pluralidad de oligonucleótidos tiene un afinidad de hibridación menor por el segundo grupo de la pluralidad de oligonucleótidos que para los amplicones. En este método, la amplificación se lleva a cabo en un dispositivo que incluye un soporte que define un pozo para contener el tubo de detección que incluye las partículas superparamagnéticas y la molécula de ácido nucleico diana, y que tiene una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina de RF para detectar una señal producida al exponer la muestra a un campo magnético polarizado creado usando uno o más magnetos y una secuencia de pulsos de RF. La amplificación de este método incluye después las etapas:

- (a) ejecutar uno o más ciclos de amplificación;
- 15 (b) exponer la mezcla de reacción de amplificación a condiciones que permitan la hibridación preferencial del primer grupo de la pluralidad de oligonucleótidos con los amplicones permitiendo por lo tanto la desagregación de las partículas superparamagnéticas;
- (c) exponer la muestra a un campo magnético polarizado y una secuencia de pulsos de RF;
- (d) después de la etapa (c), medir la señal desde el tubo de detección;
- 20 (e) repetir las etapas (a)-(d) hasta que se obtenga una cantidad deseada de amplificación; y
- (f) sobre la base del resultado de la etapa (d); cuantificar los amplicones presentes en el ciclo correspondiente de amplificación.

En este método, la cantidad inicial de la molécula de ácido nucleico diana en la muestra se determina con base en la cantidad de amplicones en cada ciclo de amplificación.

25 Se divulga un método para cuantificar una molécula de ácido nucleico en una muestra amplificando la molécula de ácido nucleico diana (e.g., usando PCR o amplificación isotérmica) en una mezcla de reacción de amplificación en un tubo de detección en la producción de amplicones correspondiente a la molécula de ácido nucleico diana. En este método, la mezcla de reacción de amplificación incluye (1) una molécula de ácido nucleico diana, (2) cebadores de amplificación específicos para la molécula de ácido nucleico diana, y (3) superparamagnéticas. En este

30 método, la amplificación se lleva a cabo en un dispositivo que incluye un soporte que define un pozo para contener el tubo de detección que incluye las partículas superparamagnéticas y la molécula de ácido nucleico diana, y que tiene una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina de RF para detectar una señal producida al exponer la muestra a un campo magnético polarizado creado usando uno o más magnetos y una secuencia de pulsos de RF. La amplificación de este método incluye después las etapas de:

- 35 (a) ejecutar uno o más ciclos de amplificación;
- (b) exponer la mezcla de reacción de amplificación a condiciones que permitan la agregación o desagregación de las partículas superparamagnéticas,
- (c) exponer la muestra a un campo magnético polarizado y una secuencia de pulsos de RF;
- (d) después de la etapa (c), medir la señal desde el tubo de detección;
- 40 (e) repetir las etapas (a)-(d) hasta que se obtenga una cantidad deseada de amplificación; y
- (f) sobre la base del resultado de la etapa (d), cuantificar los amplicones presentes en el ciclo correspondiente de amplificación.

En este método, la cantidad inicial de la molécula de ácido nucleico diana en la muestra se determina con base en la cantidad de amplicones en cada ciclo de amplificación.

45 En cualquiera de los métodos anteriores para cuantificar una molécula de ácido nucleico, el tubo de detección puede permanecer sellado a lo largo de la reacción de amplificación. Las partículas superparamagnéticas de estos métodos pueden ser mayores o menores de 100 nm en diámetro (por ejemplo, 30 nm en diámetro).

También, en cualquiera de los métodos anteriores de cuantificar una molécula de ácido nucleico diana, los métodos pueden incluir adicionalmente aplicar un campo magnético al tubo de detección después de medir la señal del tubo de detección, dando como resultado el secuestro de las partículas superparamagnéticas hacia el lado del tubo de detección, y liberar el campo magnético subsecuente hasta terminar uno o más ciclos adicionales de amplificación.

5 También, en cualquiera de los métodos anteriores de cuantificar una molécula de ácido nucleico diana, la muestra, por ejemplo puede no incluir moléculas de ácido nucleico aisladas antes de la etapa (a) (por ejemplo la muestra puede ser sangre entera o no contener una molécula de ácido nucleico diana antes de la etapa (a)).

Se divulga un método para monitorizar uno o más analitos en una muestra líquida derivada de un paciente para el diagnóstico, manejo y tratamiento de una condición médica en un paciente, incluyendo el método (a) combinar con la muestra líquida de 1×10^6 a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro de la muestra líquida (e.g., desde 1×10^6 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o 1×10^{10} a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro), en donde las partículas magnéticas tienen un diámetro que va de 150 nm a 1200 nm (e.g., desde 150 a 250, 200 a 350, 250 a 450, 300 a 500, 450 a 650, 500 a 700 nm, 700 a 850, 800 a 950, 900 a 1050, o desde 1000 a 1200 nm), y una capacidad de relajación T2 por partícula desde 1×10^8 a 1×10^{12} $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (e.g., desde 1×10^8 a 1×10^9 , 1×10^8 a 131010 , 13109 a 131010 , 13109 a 131011 , o desde 131010 a 131012 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), y en donde las partículas magnéticas tienen unidades estructurales de enlazamiento sobre sus superficies, siendo operativas las unidades estructurales de enlazamiento para alterar la agregación específica de las partículas magnéticas en la presencia de uno o más analitos o un agente de enlazamiento multivalente; (b) colocar la muestra líquida en un dispositivo, incluyendo el dispositivo un soporte que define un pozo para contener la muestra líquida que incluye las partículas magnéticas y el uno o más analitos, y que tiene una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina de RF para detectar una señal producida exponiendo la muestra líquida a un campo magnético polarizado creado usando uno o más magnetos y una secuencia de pulsos de RF; (c) exponer la muestra al campo magnético polarizado y a la secuencia de pulsos de RF; (d) después de la etapa (c), medir la señal; (e) sobre la base del resultado de la etapa (d), monitorizar el uno o más analitos; y (f) usar el resultado de la etapa (e) para diagnosticar, manejar o tratar la condición médica. En una realización, el uno o más analitos incluyen creatinina. En otra realización, el paciente esta inmunocomprometido, y el uno o más analitos incluyen un analito seleccionado de analitos asociados con patógenos, agentes antibióticos, agentes antifúngicos, y agentes antivirales, (por ejemplo el uno o más analitos pueden incluir *Candida* spp., tacrolimus, fluconazol y/o creatinina). En otra realización, el paciente tiene cáncer, y el uno o más analitos son seleccionados de agentes anticáncer, y marcadores genéticos presentes en una célula de cáncer. El paciente puede tener, o estar en riesgo de, una infección, y el uno o más analitos incluyen un analito seleccionado de analitos asociados con patógenos, agentes antibióticos, agentes antifúngicos y agentes antivirales. El paciente puede tener una condición inmunoinflamatoria, y el uno o más analitos incluyen un analito seleccionado de agentes antiinflamatorios y TNF-alfa. El paciente puede tener una enfermedad cardíaca, y uno o más analitos pueden incluir un marcador cardíaco. El paciente puede tener VIH/SIDA, y el uno o más analitos pueden incluir CD3, carga viral y AZT. En ciertas realizaciones, el método se utiliza para monitorizar la función del hígado del paciente, y en donde el uno o más analitos son seleccionados de albúmina, aspartato transaminasa, alanina transaminasa, fosfatasa alcalina, gamma glutamil transpeptidasa, bilirrubina, alfa fetoproteína, lactasa deshidrogenasa, anticuerpos mitocondriales y citocromo P450. Por ejemplo, el uno o más analitos incluyen polimorfismos de citocromo P450, y se evalúa la capacidad del paciente para metabolizar un fármaco. El método puede incluir identificar el paciente como un metabolizador pobre, un metabolizador normal, un metabolizador intermedio o un metabolizador ultrarrápido. El método puede ser utilizado para determinar una dosis apropiada de un agente terapéutico en un paciente (i) administrando el agente terapéutico al paciente; (ii) después de la etapa (i), obtener una muestra que incluye el agente terapéutico o un metabolito del mismo del paciente; (iii) poner en contacto la muestra con las partículas magnéticas y exponer la muestra al campo magnético polarizado y la secuencia de pulsos de RF y detectar una señal producida por la muestra; y (iv) sobre la base del resultado de la etapa (iii) determinar la concentración del agente terapéutico como metabolito del mismo. El agente terapéutico puede ser un agente anticáncer, agente antibiótico, agente antifúngico, o cualquier agente terapéutico descrito aquí. En cualquiera de los métodos anteriores de monitorización, la monitorización puede ser intermitente (por ejemplo periódica), o continua. En ciertas realizaciones, las partículas magnéticas están sustancialmente monodispersas; exhiben reversibilidad no específica en la ausencia del analito y el agente de enlazamiento multivalente; y/o las partículas magnéticas incluyen adicionalmente una superficie cubierta con un agente de bloqueo seleccionado de albúmina, gelatina de piel de pez, gammaglobulina, lisozima, caseína, peptidasa y una unidad estructural portadora de amina (e.g., amino polipolietilenglicol, glicina, polietilenediamina, o amino dextrano). En realizaciones particulares, la muestra líquida incluye adicionalmente un regulador, desde 0.1% a 3% (p/p) albúmina (e.g., desde 0.1 % a 0.5%, 0.3% a 0.7%, 0.5% a 1%, 0.8% a 2%, o desde 1.5% a 3% (p/p) albúmina), desde 0.01% a 0.5% de surfactante no iónico (e.g., desde 0.01% a 0.05%, 0.05% a 0.1%, 0.05% a 0.2%, 0.1% a 0.3%, 0.2% a 0.4%, o desde 0.3% a 0.5% de surfactante no iónico), o una combinación de los mismos. En todavía otras realizaciones, las partículas magnéticas incluyen una superficie cubierta con 40 mg a 100 mg (e.g., 40 mg a 60 mg, 50 mg a 70 mg, 60 mg a 80 mg, o 80 mg a 100 mg,) de una o más proteínas por miligramo de las partículas magnéticas. La muestra líquida puede incluir un agente de enlazamiento multivalente que porta una pluralidad de analitos conjugados a un armazón polimérico. El método para monitorizar puede incluir cualquiera de los métodos magnéticos de aglomeración asistida descrito aquí.

Se divulga un método para diagnosticar sepsis en un sujeto, incluyendo el método (a) obtener una muestra líquida

derivada de la sangre de un paciente; (b) preparar una primera muestra de ensayo por combinación con una porción de la muestra líquida desde 1×10^6 a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro de la muestra líquida (e.g., desde 1×10^6 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o 1×10^{10} a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro), en donde las partículas magnéticas tienen un diámetro medio desde 150 nm a 1200 nm (e.g., desde 150 a 250, 200 a 350, 250 a 450, 300 a 500, 450 a 650, 500 a 700 nm, 700 a 850, 800 a 950, 900 a 1050, o desde 1000 a 1200 nm), y una capacidad de relajación T2 por partícula desde 1×10^8 a 1×10^{12} $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (e.g., desde 1×10^8 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o desde 1×10^{10} a 1×10^{12} $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), y en donde las partículas magnéticas tienen unidades estructurales de enlazamiento sobre sus superficies, siendo operativas las unidades estructurales de para alterar la agregación específica de las partículas magnéticas en la presencia de uno o más analitos asociados con los patógenos o un agente de enlazamiento multivalente; (c) preparar una segunda muestra de ensayo por combinación de una porción de la muestra líquida desde 1×10^6 a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro de la muestra líquida (e.g., desde 1×10^6 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o 1×10^{10} a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro), en donde las partículas magnéticas tienen un diámetro medio desde 150 nm a 1200 nm (e.g., desde 150 a 250, 200 a 350, 250 a 450, 300 a 500, 450 a 650, 500 a 700 nm, 700 a 850, 800 a 950, 900 a 1050, o desde 1000 a 1200 nm), y una capacidad de relajación T2 por partícula desde 1×10^8 a 1×10^{12} $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (e.g., desde 1×10^8 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o desde 1×10^{10} a 1×10^{12} $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), y en donde las partículas de campo magnético tienen unidades estructurales que se enlazan sobre sus superficies, siendo las unidades estructurales de enlazamiento operativas para alterar la agregación específica de las partículas magnéticas en la presencia de uno o más analitos característicos de sepsis seleccionados de GRO-alfa, proteína del grupo caja 1 de alta movilidad (HMBG-1), receptor de IL-1, antagonista de receptor de IL-1, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, proteína inflamatoria de macrófago (MIP-1), factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), osteopontina, RANTES (regulados por activación, expresados por células T normales y secretados; o CCL5), TNF- α , proteína reactiva a C (PCR), CD64, proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1), proteína de enlazamiento de adenosina desaminasa (ABP-26), óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), proteína de enlazamiento de lipopolisacáridos, y procalcitonina; (d) colocar cada muestra de ensayo en un dispositivo, incluyendo el dispositivo un soporte que define un pozo para contener la muestra líquida incluyendo las partículas magnéticas y el uno o más analitos, y tener una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina de RF para detectar una señal producida por la exposición de la muestra líquida a un campo magnético polarizado creado utilizando uno o más magnetos y una secuencia de pulsos de RF; (e) exponer cada muestra de ensayo al campo magnético polarizado y la secuencia de pulsos de RF; (f) después de la etapa (e), medir la señal producida por la primera muestra de ensayo y la señal producida por la segunda muestra de ensayo; (g) sobre la base de resultado de la etapa (f), monitorizar el uno o más analitos de la primera muestra de ensayo y monitorizar el uno o más analitos de la segunda muestra de ensayo; y (h) usar los resultados de la etapa (g) para diagnosticar el sujeto. En una realización, el uno o más analitos asociados con patógenos de la primera muestra de ensayos son derivados de un patógeno asociado con sepsis seleccionados de *Acinetobacter baumannii*, *Aspergillus fumigatus*, *Bacteroides fragilis*, *B. fragilis*, blaSHV, *Burkholderia cepacia*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Candida guilliermondii*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Clostridium perfringens*, estafilococo negativo a coagulasa, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Kingella Kingae*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Listeria monocitogenes*, gen Mec A (MRSA), *Morganella morgana*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria spp. no-meningitidis*, *Prevotella buccae*, *P. intermedia*, *P. melaninogenica*, *Propionibacterium acnes*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *S. haemolyticus*, *S. maltophilia*, *S. saprophyticus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *S. maltophilia*, *Streptococcus agalactiae*, *S. bovis*, *S. dysgalactiae*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, y *S. sanguinis*. El uno o más analitos asociados con patógenos pueden ser derivados de cepas resistentes al tratamiento de bacterias, tales como cepas bacterianas resistentes a penicilina, resistentes a metilicina, resistentes a quinolonas, resistentes a macrólidos, y/o resistentes a vancomicina (por ejemplo, *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina o enterococos resistentes a vancomicina). En ciertas realizaciones, el uno o más analitos de la segunda muestra de ensayos son seleccionados de GRO-alfa, proteína 1 de grupo de caja de alta movilidad (HMBG-1), receptor de IL-1, receptor de antagonista de IL-1, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, proteína inflamatoria de macrófago (MIP-1), factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), osteopontina, RANTES (regulado por activación, expresado por células T normales y secretado; o CCL5), TNF- α , Proteína C reactiva (CRP), CD64, y proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1). En una realización particular, el método incluye adicionalmente preparar una tercera muestra de ensayo para monitorizar la concentración de un agente antiviral, agente antibiótico, o agente antifúngico que circula en la corriente sanguínea del sujeto. En ciertas realizaciones, el sujeto puede ser un sujeto inmunocomprometido, o un sujeto en riesgo de llegar a ser inmunocomprometido. En cualquiera de los métodos anteriores de monitorización, la monitorización puede ser intermitente (por ejemplo, periódica), o continua. En ciertas realizaciones, las partículas magnéticas están sustancialmente monodispersas; exhiben reversibilidad no específica en la ausencia del analito y del agente de enlazamiento multivalente; y/o las partículas magnéticas incluyen adicionalmente una superficie cubierta con un agente de bloqueo seleccionado de albúmina, gelatina de piel de pez, gamma globulina, lisozima, caseína, peptidasa y una unidad estructural portadora de amina (e.g., amino polipolietilenglicol, glicina, polietilenediamina, o amino dextrano). En realizaciones particulares, la muestra líquida incluye adicionalmente un regulador, desde 0.1% a 3% (p/p) albúmina (e.g., desde 0.1% a 0.5%, 0.3% a 0.7%, 0.5% a 1%, 0.8% a 2%, o desde 1.5% a 3% (p/p) albúmina), desde 0.01% a 0.5% de surfactante no iónico (e.g., desde 0.01% a 0.05%, 0.05% a 0.1%, 0.05% a 0.2%, 0.1% a 0.3%, 0.2% a 0.4%, o desde 0.3% a 0.5% de surfactante no iónico), o una combinación de los mismos. En todavía otras realizaciones, las partículas magnéticas incluyen una

superficie cubierta con 40 mg a 100 mg (e.g., 40 mg a 60 mg, 50 mg a 70 mg, 60 mg a 80 mg, o 80 mg a 100 mg,) de una o más proteínas por miligramo de las partículas magnéticas. La muestra líquida puede incluir un agente de enlazamiento multivalente que porta una pluralidad de analitos conjugados a un armazón polimérico. El método para monitorización puede incluir cualquiera de los métodos de aglomeración magnética asistidos descritos aquí.

5 Se divulga adicionalmente un método para monitorizar uno o más analitos en una muestra líquida derivada de un paciente para el diagnóstico, manejo o tratamiento de sepsis o SIRS en un paciente, incluyendo el método: (a) combinar con la muestra líquida desde 1×10^6 a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro de la muestra líquida (e.g., desde 1×10^6 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o 1×10^{10} a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro), en donde las partículas magnéticas tienen un diámetro medio desde 150 nm a 1200 nm (e.g., desde 150 a 250, 200 a 350, 250 a 450, 300 a 500, 450 a 650, 500 a 700 nm, 700 a 850, 800 a 950, 900 a 1050, o desde 1000 a 1200 nm), y una capacidad de relajación T2 por partícula desde 1×10^8 a $1 \times 10^{12} \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (e.g., desde 1×10^8 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o desde 1×10^{10} a $1 \times 10^{12} \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$), y en donde las partículas magnéticas tienen unidades estructurales de enlazamiento sobre sus superficies, siendo operativas las unidades estructurales de enlazamiento para alterar la agregación específica de las partículas magnéticas en la presencia de uno o más analitos o un agente de enlazamiento multivalente; (b) colocar la muestra líquida en un dispositivo, incluyendo el dispositivo un soporte que define un pozo para contener la muestra líquida que incluye las partículas magnéticas y el uno o más analitos, y que tiene una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina de RF para detectar una señal producida exponiendo la muestra líquida a un campo magnético polarizado creado usando uno o más imanes y una secuencia de pulsos de RF; (c) exponer la muestra al campo magnético polarizado y a la secuencia de pulsos de RF; (d) después de la etapa (c), medir la señal; (e) sobre la base del resultado de la etapa (d), monitorizar el uno o más analitos; y (f) usar el resultado de la etapa (e) para diagnosticar, manejar o tratar la sepsis o SIRS. El método puede incluir (i) monitorizar un analito asociado con un patógeno, y (ii) monitorizar un segundo analito característico de sepsis seleccionado de GRO-alfa, Proteína 1 de grupo caja de alta movilidad (HMBG-1), Receptor de IL-1, Antagonista del receptor de IL-1, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, proteína inflamatoria de macrófago (MIP-1), factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), osteopontina, RANTES (regulado por activación, expresado por células T normales y secretado; o CCL5), TNF- α , Proteína C reactiva (CRP), CD64, proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1), proteína de enlazamiento de la adenosina desaminasa (ABP-26), óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), proteína de enlazamiento a lipopolisacáridos, y procalcitonina. En ciertas realizaciones, el analito asociado con patógenos es derivado de un patógeno asociado con sepsis seleccionado de *Acinetobacter baumannii*, *Aspergillus fumigatis*, *Bacteroides fragilis*, *B. fragilis*, *blaSHV*, *Burkholderia cepacia*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Candida guilliermondii*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. Lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Clostridium pefringens*, *Estreptococo* negativo a coagulasa, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Kingella Kingae*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Listeria monocitogenes*, *Mec A gene (MRSA)*, *Morganella morganana*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria spp. non-meningitidis*, *Prevotella buccae*, *P. intermedia*, *P. melaninogenica*, *Propionibacterium acnes*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *S. haemolyticus*, *S. maltophilia*, *S. saprophyticus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *S. maltophilia*, *Streptococcus agalactiae*, *S. bovis*, *S. dysgalactiae*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, y *S. sanguinis*. El analito asociado con patógeno puede ser derivado de una cepa de bacterias resistente a tratamiento, tal como cepas bacterianas resistentes a penicilina, resistentes a metilicina, resistentes a quinolona, resistentes a macrólidos, y/o resistentes a vancomicina. (e.g., *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina o enterococos resistentes a vancomicina). En realizaciones particulares, el segundo analito se selecciona de GRO-alfa, Proteína 1 de grupo caja de alta movilidad (HMBG-1), Receptor de IL-1, Antagonista del receptor de IL-1, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, proteína inflamatoria de macrófago (MIP-1), factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), osteopontina, RANTES (regulado por activación, expresado por células T normales y secretado; o CCL5), TNF- α , Proteína C reactiva (CRP), CD64, y proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1). En una realización particular, el método comprende adicionalmente preparar una muestra para un tercer ensayo para monitorizar la concentración de un agente antiviral, agente antibiótico o agente antifúngico que circulan en la corriente sanguínea del sujeto. En ciertas realizaciones, el sujeto puede ser un sujeto inmunocomprometido, o un sujeto en riesgo de estar inmunocomprometido. En cualquiera de los métodos anteriores de monitorización, la monitorización puede ser intermitente (e.g., periódica), o continua. En ciertas realizaciones, las partículas magnéticas son sustancialmente monodispersas; exhiben reversibilidad no específica en la ausencia del analito y el agente de enlazamiento multivalente; y/o las partículas magnéticas incluyen adicionalmente una superficie cubierta con un agente bloqueador seleccionado de albúmina, gelatina de piel de pez, gamma globulina, lisozima, caseína, peptidasa y una unidad estructural portadora de amina (e.g., amino polipolietilenglicol, glicina, polietilenediamina, o amino dextrano). En realizaciones particulares, la muestra líquida incluye adicionalmente un regulador, desde 0.1% a 3% (p/p) albúmina (e.g., desde 0.1 % a 0.5%, 0.3% a 0.7%, 0.5% a 1%, 0.8% a 2%, o desde 1.5% a 3% (p/p) albúmina), desde 0.01% a 0.5% de surfactante no iónico (e.g., desde 0.01% a 0.05%, 0.05% a 0.1%, 0.05% a 0.2%, 0.1% a 0.3%, 0.2% a 0.4%, o desde 0.3% a 0.5% de surfactante no iónico), o una combinación de los mismos. En todavía otras realizaciones, las partículas magnéticas incluyen una superficie cubierta con 40 mg a 100 mg (e.g., 40 mg a 60 mg, 50 mg a 70 mg, 60 mg a 80 mg, o 80 mg a 100 mg,) de una o más proteínas por miligramo de las partículas magnéticas. La muestra líquida puede incluir un agente de enlazamiento multivalente que porta una pluralidad de analitos conjugados a un armazón polimérico. El método para monitorización puede incluir cualquiera de los métodos de aglomeración magnética asistidos descritos aquí.

En un aspecto relacionado, se divulga un método para asistir en la aglomeración específica de partículas magnéticas en una muestra líquida, incluyendo el método: (i) proveer una muestra líquida que incluye uno o más analitos y las partículas magnéticas, en donde las partículas magnéticas tienen unidades estructurales de enlazamiento sobre sus superficies, siendo operativa las unidades estructurales de enlazamiento para alterar la agregación específica de las partículas magnéticas en la presencia de uno o más analitos o un agente de enlazamiento multivalente; (ii) exponer la muestra líquida a un campo magnético; (iii) retirar la muestra líquida del campo magnético; y (iv) repetir la etapa (ii).

Se divulga adicionalmente un método para asistir en la aglomeración específica de partículas magnéticas en una muestra líquida (i) proveyendo una muestra líquida que incluye uno o más analitos y las partículas magnéticas, en donde las partículas magnéticas tienen unidades estructurales de enlazamiento sobre sus superficies, siendo operativas las unidades estructurales de enlazamiento para alterar la agregación específica de las partículas magnéticas en la presencia del uno o más analitos o un agente de enlazamiento multivalente; (ii) aplicar un gradiente de campo magnético a la muestra líquida durante un tiempo suficiente para producir la concentración de las partículas magnéticas en una primera porción de la muestra líquida, estando alineado el gradiente de campo magnético en una primera dirección con respecto a la muestra líquida; (iii) después de la etapa (ii), aplicar un campo magnético a la muestra líquida durante un tiempo suficiente para producir concentración de las partículas magnéticas en una segunda porción de la muestra líquida, estando alineado el campo magnético en una segunda dirección con respecto a la muestra líquida; y (iv) repetir opcionalmente las etapas (ii) y (iii). En ciertas realizaciones, el ángulo entre la primera dirección y la segunda dirección con respecto a la muestra líquida está entre 0° y 180° (por ejemplo, de 0° a 10° , 5° a 120° , 20° a 60° , 30° a 80° , 45° a 90° , 60° a 120° , 80° a 135° , o de 120° a 180°).

Se divulga un método para asistir en la aglomeración específica de partículas magnéticas en una muestra líquida de (i) proveer una muestra líquida que incluye uno o más analitos y las partículas magnéticas, en donde las partículas magnéticas tienen unidades estructurales de enlazamiento sobre sus superficies, siendo operativas las unidades estructurales de enlazamiento para alterar la agregación específica de las partículas magnéticas en la presencia de uno o más analitos o un agente de enlazamiento multivalente; (ii) aplicar un gradiente de campo magnético a la muestra líquida durante un tiempo suficiente para producir la concentración de las partículas magnéticas en una primera porción de la muestra líquida; (iii) después de la etapa (ii), agitar la muestra líquida; y (iv) repetir la etapa (ii). En ciertas realizaciones, la etapa (iii) incluye someter a vórtex la muestra líquida, o mezclar la muestra utilizando cualquier método descrito aquí.

Se divulga también un método para asistir en la aglomeración específica de partículas magnéticas en una muestra líquida (i) proveer una muestra líquida que incluye uno o más analitos y las partículas magnéticas, en donde las partículas magnéticas tienen unidades estructurales de enlazamiento sobre sus superficies, siendo operativas las unidades estructurales de enlazamiento para alterar la agregación específica de las partículas magnéticas en la presencia de uno o más analitos o un agente de enlazamiento multivalente; y (ii) exponer la muestra líquida a un campo magnético gradiente y hacer rotar el campo magnético gradiente alrededor de la muestra, o hacer rotar la muestra dentro del campo magnético gradiente. La muestra puede hacerse rotar lentamente. En ciertas realizaciones, la muestra se hace rotar una rata de 0.0333 Hz, o menos (e.g., desde 0.000833 Hz a 0.0333 Hz, desde 0.00166 Hz a 0.0333 Hz, o desde 0.00333 Hz a 0.0333 Hz). En otras realizaciones, el método incluye adicionalmente (iii) después de la etapa (ii), agitar la muestra líquida; y (iv) repetir la etapa (ii).

En cualquiera de los métodos anteriores para asistir en la aglomeración específica la etapa (ii) puede ser repetida de 1 a 100 veces (por ejemplo, repetida 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 veces, desde 10 a 20 veces, o desde 80 a 100 veces). En realizaciones particulares, los uno o más magnetos que proveen el gradiente de campo magnético dentro de la muestra líquida tiene una fuerza de campo máxima de 0.01T a 10T (e.g., desde 0.01T a 0.05T, 0.05T a 0.1T, 0.1T a 0.5T, 0.5T a 1T, 1T a 3T, o desde 3T a 10T) y en donde el campo magnético gradiente varía de 0.1mT/mm a 10T/mm a través de la muestra líquida (e.g., desde 0.1mT/mm a 0.5mT/mm, 0.3mT/mm a 1mT/mm, 0.5mT/mm a 5mT/mm, 5mT/mm a 20mT/mm, 10mT/mm a 100mT/mm, 100mT/mm a 500mT/mm, 500mT/mm a 1T/mm, o desde 1T/mm a 10T/mm). En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos anteriores para asistir en la aglomeración específica, la etapa (ii) incluye aplicar el gradiente de campo magnético a la muestra líquida durante un período de 1 segundo hasta 5 minutos (por ejemplo, 1 a 20 segundos, desde 20 a 60 segundos, desde 30 segundos a 2 minutos, desde 1 minutos a 3 minutos, o desde 2 minutos a 5 minutos). En realizaciones particulares, (i) la muestra líquida incluye de 1×10^5 a 1×10^{15} del uno o más analitos por mililitro de la muestra líquida (e.g., desde 1×10^5 a 1×10^6 , 1×10^6 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{12} , o 1×10^{11} a 1×10^{15} analitos por mililitro); (ii) la mezcla líquida incluye desde 1×10^6 a 1×10^{13} de las partículas magnéticas por mililitro de la muestra líquida (e.g., desde 1×10^6 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^9 , 1×10^7 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o 1×10^{10} a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro); (iii) las partículas magnéticas tienen una capacidad de relajación T2 por partícula desde 1×10^4 a 1×10^{12} mM⁻¹s⁻¹ (e.g., desde 1×10^4 a 1×10^7 , 1×10^6 a 1×10^{10} , 1×10^7 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o desde 1×10^{10} a 1×10^7 mM⁻¹s⁻¹); (iv) las partículas magnéticas tienen un diámetro promedio que va desde 150 nm a 1200 nm (e.g., desde 150 a 250, 200 a 350, 250 a 450, 300 a 500, 450 a 650, 500 a 700 nm, 700 a 850, 800 a 950, 900 a 1050, o desde 1000 a 1200 nm); (v) las partículas magnéticas son sustancialmente monodispersas; (vi) las partículas en la muestra líquida exhiben reversibilidad no específica en la presencia del uno o más analitos y agentes de enlazamiento multivalentes; (vii) las partículas magnéticas incluyen adicionalmente una

superficie cubierta con un agente bloqueador seleccionado de albúmina, gelatina de piel de pez, gamma globulina, lisozima, caseína, peptidasa y una unidad estructural portadora de amina (e.g., amino polipolietilenglicol, glicina, polietilenediamina, o amino dextrano); (viii) la muestra líquida incluye adicionalmente un regulador, desde 0.1 % a 3% (p/p) albúmina (e.g., desde 0.1 % a 0.5%, 0.3% a 0.7%, 0.5% a 1%, 0.8% a 2%, o desde 1.5% a 3% (p/p) albúmina), desde 0.01% a 0.5% de surfactante no iónico (e.g., desde 0.01 % a 0.05%, 0.05% a 0.1%, 0.05% a 0.2%, 0.1% a 0.3%, 0.2% a 0.4%, o desde 0.3% a 0.5% de surfactante no iónico), o una combinación de los mismos; y/o (ix) las partículas magnéticas incluyen una superficie cubierta con 40 mg a 100 mg (e.g., 40 mg a 60 mg, 50 mg a 70 mg, 60 mg a 80 mg, o 80 mg a 100 mg,) de una o más proteínas por miligramo de las partículas magnéticas.

Se divulga un sistema para la detección de uno o más analitos, incluyendo el sistema: (a) una primera unidad que incluye (a1) un magneto permanente que define un campo magnético; (a2) un soporte que define un pozo para contener una muestra líquida que incluye partículas magnéticas y el uno o más analitos que tiene una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina RF para detectar una señal exponiendo la muestra líquida a un campo magnético homogéneo desviado creado utilizando el magneto permanente y una secuencia de pulsos RF; y (a3) uno o más elementos eléctricos en comunicación con la bobina de RF, configurados los elementos eléctricos para amplificar, rectificar, transmitir y/o digitalizar la señal; y (b) una o más segundas unidades que incluyen (b1) un magneto permanente adyacente una primera posición de muestra para contener una muestra líquida y configurado para aplicar un primer campo magnético gradiente a la muestra líquida. La una o más segundas unidades pueden incluir adicionalmente un segundo magneto permanente adyacente una segunda posición de muestra para contener una muestra líquida y configurado para aplicar un segundo campo magnético gradiente a la primera muestra, alineado el segundo campo magnético para aplicar un campo magnético gradiente a la muestra desde una dirección diferente de la dirección del primer gradiente de campo, y un medio para mover una muestra líquida desde la primera posición de muestra a la segunda posición de muestra. En ciertas realizaciones, la una o más segundas unidades son incapaces de medir una señal (por ejemplo, incapaces de medir una rata de relajación de RMN), y/o carece de una bobina RF, o un medio para producir un pulso de RF. En ciertas realizaciones, el ángulo entre la primera dirección y la segunda dirección con respecto a la muestra líquida está entre 0° y 180° (e.g., desde 0° a 10°, 5° a 120°, 20° a 60°, 30° a 80°, 45° a 90°, 60° a 120°, 80° a 135°, o desde 120° a 180°). El sistema puede incluir adicionalmente un portador de muestras para contener la muestra líquida y configurada para mover la muestra líquida desde la primera posición a la segunda posición. En realizaciones particulares, el sistema incluye un arreglo de las unas o más segundas unidades para asistir en la aglomeración de un arreglo de muestras simultáneamente. Por ejemplo, el arreglo puede ser configurado para hacer rotar uno o más líquidos de una primera porción en la cual el campo magnético es aplicado al lado de una muestra hasta una segunda posición en la cual el campo magnético es aplicado al fondo de una muestra. El sistema puede incluir una unidad de cartucho, una unidad de agitación, una centrífuga o cualquier otro componente de sistema descrito aquí. Por ejemplo, el sistema puede incluir adicionalmente (c) una tercera unidad que incluye un cartucho retirable, dimensionado para facilitar la inserción en y retiro del sistema y que tiene un compartimiento que incluye una o más poblaciones de partículas magnéticas que tienen unidades estructurales de enlazamiento sobre sus superficies, en donde las unidades estructurales de enlazamiento son operativas para alterar una agregación de las partículas magnéticas en la presencia de uno o más analitos. En realizaciones particulares, el cartucho retirable es un cartucho modular que incluye (i) un módulo de reactivo para contener uno o más reactivos de ensayo; y (ii) un módulo de detección que incluye una cámara de detección para contener una muestra líquida que incluye partículas magnéticas y uno o más analitos, en donde el módulo de reactivo y el módulo de detección pueden ser ensamblados en el cartucho modular antes de su uso, y en donde la cámara de detección es retirable del cartucho modular. El cartucho modular puede incluir adicionalmente un módulo de entrada, en donde el módulo de reactivo y el módulo de detección pueden ser ensamblados dentro del cartucho modular antes de su uso, y en donde el módulo de entrada es esterilizable. En otra realización, el sistema puede incluir adicionalmente un ordenador de sistema con procesador para implementar un protocolo de ensayo y almacenar datos del ensayo, y en donde el cartucho retirable incluye adicionalmente (i) una etiqueta legible que indica el analito que va ser detectado, (ii) una etiqueta legible que indica el protocolo de ensayo que va a ser implementado, (iii) una etiqueta legible que indica un número de identificación del paciente, (iv) un marcador legible que indica la posición de los reactivos de ensayo contenidos en el cartucho, o (v) una etiqueta legible que incluye instrucciones para el procesador programable.

Se divulga un sistema para la detección de uno o más analitos, incluyendo el sistema: (a) una primera unidad que incluye (a1) un magneto permanente que define un campo magnético; (a2) un soporte que define un pozo para contener una muestra líquida que incluye partículas magnéticas y el uno o más analitos y que tiene una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina de RF para detectar una señal producida al exponer la muestra líquida a un campo magnético polarizado creado usando el magneto permanente y una secuencia de pulsos de RF; y (a3) uno o más elementos eléctricos en comunicación con la bobina de RF, configurados los elementos eléctricos para amplificar, rectificar, transmitir y/o digitalizar la señal; y (b) una segunda unidad que incluye un cartucho retirable dimensionado para facilitar la inserción en y extracción desde el sistema, en donde el cartucho retirable es un cartucho modular que incluye (i) un módulo para reactivos para contener uno o más reactivos de ensayo; y (ii) un módulo de detección que incluye una cámara de detección para contener una muestra líquida que incluye las partículas magnéticas y el uno o más analitos, en donde el módulo de reactivos y el módulo de detección pueden ser ensamblados en el cartucho modular antes de un uso, y en donde la cámara de detección es retirable del cartucho modular. El cartucho modular puede incluir adicionalmente un módulo de entrada, en donde el módulo

- de entrada, el módulo de reactivos, y el módulo de detección pueden ser ensamblados en el cartucho modular antes de un uso, y en donde el módulo de entrada es esterilizable. En ciertas realizaciones, el sistema incluye adicionalmente un sistema de ordenados con procesador para implementar un protocolo de ensayo y almacenamiento de los datos de ensayo, y en donde el cartucho retirable incluye adicionalmente (i) una etiqueta legible que indica el analito que va a ser detectado, (ii) una etiqueta legible que indica el protocolo de ensayo que va a ser implementado, (iii) una etiqueta legible que indica un número de indicación del paciente, (iv) una etiqueta legible que indica la posición de los reactivos de ensayo contenidos en el cartucho, o (v) una etiqueta legible que incluye instrucciones para el procesador programable. El sistema puede incluir una unidad de cartucho, una unidad de agitación, una centrífuga, o cualquier otro componente del sistema descrito aquí.
- 5
- 10 Se divulga una unidad de agitación para la mezcla automatizada de una muestra líquida en una cámara de muestra, incluyendo un motor para proveer una fuerza de impulso rotacional a un eje de motor acoplado a un eje de impulso, teniendo el eje de impulso un primer extremo acoplado al eje del motor y un segundo extremo acoplado a una placa que soporta un portamuestras para contener la cámara de muestras, incluyendo el eje de extracción un primer eje coaxial al eje de motor, y un segundo eje que está desplazado y paralelo al eje de motor, de tal manera que el
- 15
- segundo eje del árbol de empuje, la placa y el portador de muestras son impulsados en una ruta orbital, en donde el motor incluye una marca de índice y/u otro medio de detección de posición tal como un codificador de posición óptico, magnético o por resistencia para posicionar la cámara de muestras en una posición predeterminada después de la mezcla o un sensor que registra la posición de la muestra a lo largo de su ruta.
- 20 Se divulga un sistema para la detección de uno o más analitos, incluyendo: (a) una primera unidad que incluye (a1) un magneto permanente que define un campo magnético; (a2) un soporte que define un pozo para contener una muestra líquida que incluye partículas magnéticas y el uno o más analitos y que tiene una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina de RF para detectar una señal producida al exponer la muestra líquida a un campo magnético polarizado creado usando el magneto permanente y una secuencia de pulsos de RF; y (a3) uno o más elementos eléctricos en comunicación con la bobina de RF, configurados los elementos eléctricos para
- 25
- amplificar, rectificar, transmitir y/o digitalizar la señal; y (b) una segunda unidad para la muestra automatizada de una muestra líquida en una cámara de muestra, que incluye un motor para proveer fuerza de impulso rotacional a un árbol de motor acoplado a un árbol de impulso, teniendo el árbol de impulso un primer extremo acoplado al árbol del motor y un segundo extremo acoplado a una placa que soporta un portamuestras para sostener una cámara de muestras, incluyendo el árbol un primer eje coaxial al árbol del motor, y un segundo eje que está desplazado y es
- 30
- paralelo al árbol de motor, de tal forma que el segundo eje del árbol de impulso, la placa y el portamuestras sean impulsados en una trayectoria orbital, en donde el motor incluye una marca de índice y/o otro medio de detección de posición tal como un codificador de posición óptico, magnético o resistivo para posicionar la cámara de muestra en una posición predeterminada siguiendo la mezcla o un sensor que rastree la posición de la muestra a lo largo de su trayectoria.
- 35 En ciertas realizaciones, el sistema incluye adicionalmente un brazo robótico para colocar la cámara de muestras en y, retirar la cámara de muestras de, la unidad de agitación.
- 40 Se divulga un sistema para la detección de uno o más analitos, incluyendo el sistema: (a) una primera unidad que incluye (a1) un magneto permanente que define un campo magnético; (a2) un soporte que define un pozo para contener una muestra líquida que incluye partículas magnéticas y el uno o más analitos y que tiene una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina de RF para detectar una señal producida al exponer la muestra líquida a un campo magnético polarizado creado usando el magneto permanente y una secuencia de pulsos de RF; y (a3) uno o más elementos eléctricos en comunicación con la bobina de RF, configurados los elementos eléctricos para amplificar, rectificar, transmitir y/o digitalizar la señal; y (b) una centrífuga que incluye un motor para centrífuga que incluye un motor para proveer fuerza de impulso rotacional a un árbol de motor, teniendo el árbol de
- 45
- impulso un primer extremo acoplado al motor y un segundo extremo acoplado al rotor de una centrífuga que soporta un portamuestras para sostener una cámara de muestras, en donde el motor incluye una marca de índice y/o otro medio de detección de posición tal como un codificador de posición óptico, magnético o resistivo para posicionar la cámara de muestra en una posición predeterminada siguiendo la centrifugación de la muestra o un sensor que rastree la posición de la muestra a lo largo de su trayectoria.
- 50 Se divulga un sistema para la detección de uno o más analitos, incluyendo el sistema: (a) un portamuestras desechable que define un pozo para contener una muestra líquida y que tiene una bobina de RF contenida dentro del portamuestras desechable y dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina de RF para detectar una señal producida al exponer la muestra líquida a un campo magnético polarizado creado usando el magneto permanente y una secuencia de pulsos de RF, en donde el portamuestras desechable incluye una o más conexiones fusionables; y
- 55
- (b) un lector MR que incluye (b1) un magneto permanente que define un campo magnético; (b2) una bobina de secuencia de pulsos y detección de RF; (b3) uno o más elementos eléctricos en comunicación con la bobina de RF, configurados los elementos eléctricos para amplificar, rectificar, transmitir y/o digitalizar la señal; y (b4) uno o más elementos eléctricos en comunicación con el enlace fusible y configurado para aplicar corriente en exceso al enlace fusible, siendo que el enlace se corte y haga la bobina inoperable después de un tiempo de vida de trabajo
- 60
- predeterminado. En ciertas realizaciones, el elemento eléctrico en comunicación con la bobina de RF está acoplado

inductivamente con la bobina de RF.

Se divulga un sistema para la detección de creatinina, tacrolimus y Candida, incluyendo el sistema: (a) una primera unidad que incluye (a1) un magneto permanente que define un campo magnético; (a2) un soporte que define un pozo para contener una muestra líquida que incluye partículas magnéticas y la creatinina, tacrolimus y Candida y que tiene una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina de RF para detectar una señal producida al exponer la muestra líquida a un campo magnético polarizado creado usando el magneto permanente y una secuencia de pulsos de RF; y (a3) un elemento eléctrico en comunicación con la bobina de RF, configurado el elemento eléctrico para amplificar, rectificar, transmitir y/o digitalizar la señal; y (b) una segunda unidad que incluye un cartucho retirable dimensionado para facilitar la inserción en y extracción desde el sistema, en donde el cartucho retirable es un cartucho modular que incluye (i) una pluralidad de módulos para reactivos para contener uno o más reactivos para el ensayo; y (ii) una pluralidad de módulos de detección que incluyen una cámara de detección para contener una muestra líquida incluyendo las partículas magnéticas y la creatinina, tacrolimus y Candida, en donde la pluralidad de módulos de reactivo incluye (i) una primera población de partículas magnéticas que tienen un diámetro medio desde 150 nm a 699 nm (e.g., desde 150 a 250, 200 a 350, 250 a 450, 300 a 500, 450 a 650, o desde 500 a 699 nm), una capacidad de relajación T2 por partícula desde 1×10^8 a 1×10^{12} $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (e.g., desde 1×10^8 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o desde 1×10^{10} a 1×10^{12} $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), y anticuerpos de creatinina conjugados su superficie; (ii) un agente de enlazamiento multivalente que porta una pluralidad de conjugados de creatinina diseñados para formar agregados con la primera población de partículas magnéticas en la ausencia de creatinina; (iii) una segunda población de partículas magnéticas que tienen un diámetro que va desde 150 nm a 699 nm (e.g., desde 150 a 250, 200 a 350, 250 a 450, 300 a 500, 450 a 650, o desde 500 a 699 nm), una capacidad de relajación T2 por partícula desde 1×10^8 a 1×10^{12} $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (e.g., desde 1×10^8 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o desde 1×10^{10} a 1×10^{12} $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), y anticuerpos de tacrolimus conjugados sobre su superficie; (iv) un agente de enlazamiento multivalente que porta una pluralidad de conjugados de tacrolimus diseñados para formar agregados con la segunda población de partículas magnéticas en la ausencia de tacrolimus; (v) una tercera población de partículas magnéticas tiene un diámetro medio de desde 700 nm a 1200 nm (e.g., desde 700 a 850, 800 a 950, 900 a 1050, o desde 1000 a 1200 nm), una capacidad de relajación T2 por partícula desde 1×10^9 a 1×10^{12} $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (e.g., desde 1×10^8 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o desde 1×10^{10} a 1×10^{12} $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), y que tiene una primera sonda y una segunda sonda conjugadas a su superficie seleccionadas para formar agregados en la presencia de ácido nucleico de Candida, siendo operativa la primera sonda para enlazarse a un primer segmento del ácido nucleico de Candida y siendo operativa la segunda sonda para enlazarse a un segundo segmento del ácido nucleico de Candida. En ciertas realizaciones, las partículas magnéticas son sustancialmente monodispersas; exhiben reversibilidad no específica en la ausencia del analito y el agente de enlazamiento multivalente; y/o las partículas magnéticas incluyen adicionalmente una superficie cubierta con un agente bloqueador seleccionado de albúmina, gelatina de piel de pez, gamma globulina, lisozima, caseína, peptidasa y una unidad estructural portadora de amina (e.g., amino polipolietilenglicol, glicina, polietilenediamina, o amino dextrano). En realizaciones particulares, la muestra líquida incluye adicionalmente un regulador, desde 0.1 % a 3% (p/p) albúmina (e.g., desde 0.1 % a 0.5%, 0.3% a 0.7%, 0.5% a 1%, 0.8% a 2%, o desde 1.5% a 3% (p/p) albúmina), desde 0.01 % a 0.5% de surfactante no iónico (e.g., desde 0.01 % a 0.05%, 0.05% a 0.1%, 0.05% a 0.2%, 0.1% a 0.3%, 0.2% a 0.4%, o desde 0.3% a 0.5% de surfactante no iónico), o una combinación de los mismos. En todavía otras realizaciones, las partículas magnéticas incluyen una superficie cubierta con 40 mg a 100 mg (e.g., 40 mg a 60 mg, 50 mg a 70 mg, 60 mg a 80 mg, o 80 mg a 100 mg,) de una o más proteínas por miligramo de las partículas magnéticas. La muestra líquida puede incluir un agente de enlazamiento multivalente que porta una pluralidad de analitos conjugados a un armazón polimérico. En otra realización, la mezcla líquida incluye desde 1×10^6 a 1×10^{13} de las partículas magnéticas por mililitro de la muestra líquida (e.g., desde 1×10^6 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o 1×10^{10} a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro).

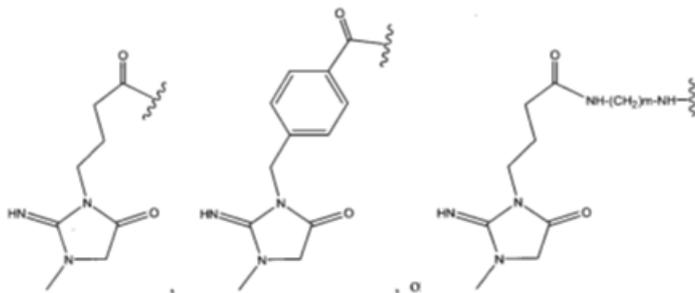
Se divulga un método para medir la concentración de creatinina en una muestra líquida, incluyendo el método: (a) poner en contacto una solución con (i) partículas magnéticas para producir una muestra líquida que incluye desde 1×10^6 a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro de la muestra líquida (e.g., desde 1×10^6 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o 1×10^{10} a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro), en donde las partículas magnéticas tienen un diámetro medio desde 150 nm a 1200 nm (e.g., desde 150 a 250, 200 a 350, 250 a 450, 300 a 500, 450 a 650, 500 a 700 nm, 700 a 850, 800 a 950, 900 a 1050, o desde 1000 a 1200 nm), una capacidad de relajación T2 por partícula desde 1×10^8 a 1×10^{12} $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (e.g., desde 1×10^8 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o desde 1×10^{10} a 1×10^{12} $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), y anticuerpos de creatinina, conjugados a su superficie, y (ii) un agente de enlazamiento multivalente que porta una pluralidad de conjugados de creatinina diseñados para formar agregados con las partículas magnéticas en la ausencia de creatinina; (b) colocar la muestra líquida en un dispositivo, incluyendo el dispositivo un soporte que define un pozo para contener la muestra líquida que incluye las partículas magnéticas, el agente de enlazamiento multivalente y la creatinina, y que tiene una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina de RF para detectar una señal producida exponiendo la muestra líquida a un campo magnético polarizado creado usando uno o más magnetos y una secuencia de pulsos de RF; (c) exponer la muestra a un campo magnético polarizado y una secuencia de pulsos de RF; (d) después de la etapa (c), medir la señal; y (e) sobre la base del resultado de la etapa (d), determinando la concentración de creatinina en la muestra líquida. En ciertas realizaciones, las partículas magnéticas son sustancialmente monodispersas; exhiben reversibilidad no específica en la ausencia del analito y el agente de enlazamiento

multivalente; y/o las partículas magnéticas incluyen adicionalmente una superficie cubierta con un agente bloqueador seleccionado de albúmina, gelatina de piel de pez, gamma globulina, lisozima, caseína, peptidasa y una unidad estructural portadora de amina (e.g., amino polipolietilenglicol, glicina, polietilenediamina, o amino dextrano). En realizaciones particulares, la muestra líquida incluye adicionalmente un regulador, desde 0.1% a 3% (p/p) albúmina (e.g., desde 0.1 % a 0.5%, 0.3% a 0.7%, 0.5% a 1%, 0.8% a 2%, o desde 1.5% a 3% (p/p) albúmina), desde 0.01% a 0.5% de surfactante no iónico (e.g., desde 0.01% a 0.05%, 0.05% a 0.1%, 0.05% a 0.2%, 0.1% a 0.3%, 0.2% a 0.4%, o desde 0.3% a 0.5% de surfactante no iónico), o una combinación de los mismos. En todavía otras realizaciones, las partículas magnéticas incluyen una superficie cubierta con 40 mg a 100 mg (e.g., 40 mg a 60 mg, 50 mg a 70 mg, 60 mg a 80 mg, o 80 mg a 100 mg,) de una o más proteínas por miligramo de las partículas magnéticas. La muestra líquida puede incluir un agente de enlazamiento multivalente que porta una pluralidad de analitos conjugados a un armazón polimérico.

Se divulga un agente de enlazamiento multivalente que incluye dos o más unidades estructurales creatinina enlazadas covalentemente a un armazón. En ciertas realizaciones, el agente de enlazamiento multivalente es un compuesto de fórmula (I):

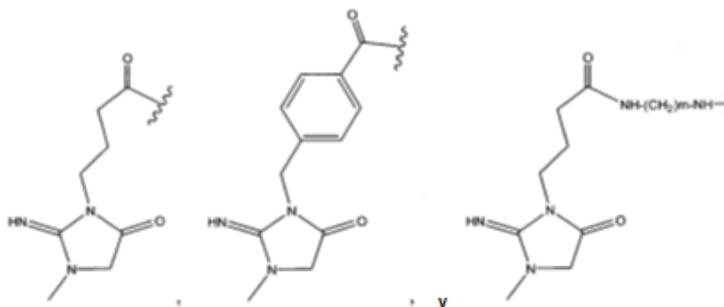


en donde (A) es



(B) es un armazón polimérico enlazado covalentemente a cada (A), m es un entero de 2 a 10, y n es un entero de 2 a 50.

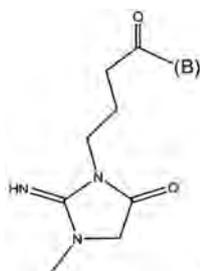
20 Se divulga una solución que incluye desde 1×10^6 a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro de la solución (e.g., desde 1×10^6 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o 1×10^{10} a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro), en donde las partículas magnéticas tienen un diámetro medio desde 150 nm a 600 nm (e.g., desde 150 a 250, 200 a 350, 250 a 450, 300 a 500, 450 a 650, o desde 500 a 600 nm), una capacidad de relajación T2 por partícula desde 1×10^8 a 1×10^{12} mM⁻¹s⁻¹ (e.g., desde 1×10^8 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o desde 1×10^{10} a 1×10^{12} mM⁻¹s⁻¹), y una superficie que porta conjugado (A) de creatinina, en donde (A) es seleccionado de:



y m es un entero que va de 2 a 10.

Se divulga una solución que incluye desde 1×10^6 a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro de la solución (e.g.,

5 desde 1×10^6 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o 1×10^{10} a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro), en donde las partículas magnéticas tienen un diámetro medio desde 150 nm a 600 nm (e.g., desde 150 a 250, 200 a 350, 250 a 450, 300 a 500, 450 a 650, o desde 500 a 600 nm), una capacidad de relajación T2 por partícula desde 1×10^8 a $1 \times 10^{12} \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (e.g., desde 1×10^8 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o desde 1×10^{10} a $1 \times 10^{12} \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), y una superficie que porta anticuerpos que tienen afinidad por el conjugado de creatinina:



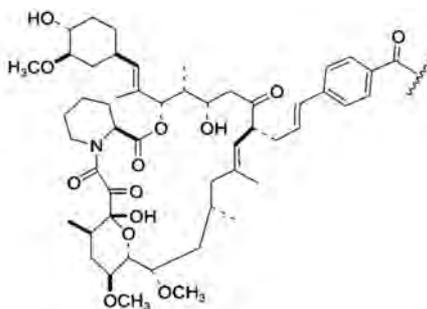
donde (B) es un armazón polimérico.

10 Se divulga un método para medir la concentración de tacrolimus en una muestra líquida, incluyendo el método: (a) poner en contacto una solución con (i) partículas magnéticas para producir una solución que incluye desde 1×10^6 a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro de la muestra líquida (e.g., desde 1×10^6 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o 1×10^{10} a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro), en donde las partículas magnéticas tienen un diámetro medio desde 150 nm a 1200 nm (e.g., desde 150 a 250, 200 a 350, 250 a 450, 300 a 500, 450 a 650, 500 a 700 nm, 700 a 850, 800 a 950, 900 a 1050, o desde 1000 a 1200 nm), una capacidad de relajación T2 por partícula desde 1×10^8 a $1 \times 10^{12} \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (e.g., desde 1×10^8 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o desde 1×10^{10} a $1 \times 10^{12} \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), y anticuerpos de tacrolimus conjugados a su superficie, y (ii) un agente de enlazamiento multivalente que porta una pluralidad de conjugados de tacrolimus diseñada para formar agregados con las partículas magnéticas en la ausencia de tacrolimus; (b) colocar la muestra líquida en un dispositivo, incluyendo el dispositivo un soporte que define un pozo para contener la muestra líquida que incluye las partículas magnéticas, el agente de enlazamiento multivalente, y el tacrolimus, y que tiene una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina de RF para detectar una señal producida exponiendo la muestra líquida a un campo magnético polarizado creado usando uno o más imanes y una secuencia de pulsos de RF; (c) exponer la muestra a un campo magnético polarizado y una secuencia de pulsos de RF; (d) después de la etapa (c), medir la señal; y (e) sobre la base del resultado de la etapa (d), determinar la concentración de tacrolimus en la muestra líquida. En ciertas realizaciones, las partículas magnéticas son sustancialmente monodispersas; exhiben reversibilidad no específica en la ausencia del analito y el agente de enlazamiento multivalente; y/o las partículas magnéticas incluyen adicionalmente una superficie cubierta con un agente bloqueador seleccionado de albúmina, gelatina de piel de pez, gamma globulina, lisozima, caseína, peptidasa y una unidad estructural portadora de amina (e.g., amino polipolietilenglicol, glicina, polietilenediamina, o amino dextrano). En realizaciones particulares, la muestra líquida incluye adicionalmente un regulador, desde 0.1% a 3% (p/p) albúmina (e.g., desde 0.1% a 0.5%, 0.3% a 0.7%, 0.5% a 1%, 0.8% a 2%, o desde 1.5% a 3% (p/p) albúmina), desde 0.01 % a 0.5% de surfactante no iónico (e.g., desde 0.01 % a 0.05%, 0.05% a 0.1%, 0.05% a 0.2%, 0.1 % a 0.3%, 0.2% a 0.4%, o desde 0.3% a 0.5% de surfactante no iónico), o una combinación de los mismos. En todavía otras realizaciones, las partículas magnéticas incluyen una superficie cubierta con 40 mg a 100 mg (e.g., 40 mg a 60 mg, 50 mg a 70 mg, 60 mg a 80 mg, o 80 mg a 100 mg,) de una o más proteínas por miligramo de las partículas magnéticas. La muestra líquida puede incluir un agente de enlazamiento multivalente que porta una pluralidad de analitos conjugados a un armazón polimérico.

40 Se divulga un agente de enlazamiento multivalente que incluye dos o más unidades estructurales de tacrolimus, que incluyen metabolitos de tacrolimus descritos aquí o compuestos estructuralmente similares para los cuales el anticuerpo tiene afinidad enlazados covalentemente a un armazón. En ciertas realizaciones, el agente de enlazamiento multivalente es un compuesto de fórmula (II):

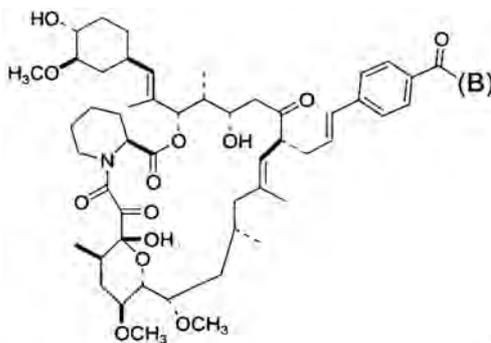


en donde (A) es



(B) es un armazón polimérico enlazado covalentemente a cada (A), y n es un entero de 2 a 50.

5 Se divulga una solución que incluye desde 1×10^6 a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro de la solución (e.g., desde 1×10^6 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o 1×10^{10} a 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro), en donde las partículas magnéticas tienen un diámetro medio desde 150 nm a 600 nm (e.g., desde 150 a 250, 200 a 350, 250 a 450, 300 a 500, 450 a 650, o desde 500 a 600 nm), una capacidad de relajación T2 por partícula desde 1×10^8 a $1 \times 10^{12} \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (e.g., desde 1×10^8 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o desde 1×10^{10} a $1 \times 10^{12} \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$), y una superficie que porta anticuerpos que tienen afinidad por el conjugado de tacrolimus:



10

en donde (B) es armazón polimérico.

15 En una realización de cualquiera de las soluciones anteriores, (i) las partículas magnéticas están sustancialmente monodispersas; (ii) las partículas magnéticas exhiben reversibilidad no específica en plasma; (iii) las partículas magnéticas incluyen adicionalmente una superficie cubierta con un agente de bloqueo seleccionado de albúmina, gelatina de piel de pez, gamma globulina, lisozima, caseína, peptidasa y una unidad estructural portadora de amina (e.g., amino polipolietilenglicol, glicina, polietilenediamina, o amino dextrano); (iv) la muestra líquida incluye adicionalmente un regulador, desde 0.1% a 3% (p/p) albúmina (e.g., desde 0.1% a 0.5%, 0.3% a 0.7%, 0.5% a 1%, 0.8% a 2%, o desde 1.5% a 3% (p/p) albúmina), desde 0.01% a 0.5% de surfactante no iónico (e.g., desde 0.01% a 0.05%, 0.05% a 0.1%, 0.05% a 0.2%, 0.1% a 0.3%, 0.2% a 0.4%, o desde 0.3% a 0.5% de surfactante no iónico), o una combinación de los mismos; y/o (iv) las partículas magnéticas incluyen una superficie cubierta con 40 mg a 100 mg (e.g., 40 mg a 60 mg, 50 mg a 70 mg, 60 mg a 80 mg, o 80 mg a 100 mg,) de una o más proteínas por miligramo de las partículas magnéticas. Las soluciones pueden ser usadas en cualquiera de los sistemas o métodos descritos aquí.

25 Se divulga un cartucho retirable dimensionado para facilitar la inserción en y retiro desde un sistema divulgado aquí, en donde el cartucho retirable incluye una o más cámaras para contener una pluralidad de módulos de reactivo para contener uno o más reactivos de ensayo, en donde los módulos de reactivo incluyen (i) una cámara para contener desde 1×10^6 a 1×10^{13} partículas magnéticas (e.g., desde 1×10^6 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o 1×10^{10} a 1×10^{13} partículas magnéticas) con un diámetro medio de desde 100 nm a 699 nm (e.g., desde 150 a 250, 200 a 350, 250 a 450, 300 a 500, 450 a 650, o desde 500 a 699 nm), una capacidad de relajación T2 por partícula desde 1×10^8 a $1 \times 10^{12} \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (e.g., desde 1×10^8 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o desde 1×10^{10} a $1 \times 10^{12} \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$), y unidades estructurales de enlazamiento sobre su superficies, siendo operativas las unidades estructurales de enlazamiento para alterar la agregación específica de las partículas magnéticas en la presencia de uno o más analitos o un agente de enlazamiento multivalente; y (ii) una cámara para contener un regulador. En un aspecto relacionado, se divulga un cartucho retirable dimensionado para facilitar la inserción en y la extracción desde un sistema, en donde el cartucho retirable comprende una o más cámaras para contener una pluralidad de módulos para reactivos para contener uno o más reactivos para el ensayo, en donde el módulo de reactivos incluye (i) una cámara para contener desde 1×10^6 a 1×10^{13} partículas magnéticas

35

(e.g., desde 1×10^6 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o 1×10^{10} a 1×10^{13} partículas magnéticas) con un diámetro medio de desde 700 nm a 1200 nm (e.g., desde 700 a 850, 800 a 950, 900 a 1050, o desde 1000 a 1200 nm), una capacidad de relajación T2 por partícula desde 1×10^9 a $1 \times 10^{12} \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (e.g., desde 1×10^9 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , o desde 1×10^{10} a $1 \times 10^{12} \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), y unidades estructurales de enlazamiento de oligonucleótidos sobre sus superficies, siendo operativas las unidades estructurales de enlazamiento de oligonucleótidos para alterar la agregación específica de las partículas magnéticas en la presencia de uno o más analitos; y (ii) una cámara para contener un regulador. Las partículas magnéticas pueden ser cualquiera de las descritas aquí, cubiertas con cualquier unidad estructural de enlazamiento descrita aquí, para detectar un analito descrito aquí. En realizaciones particulares de los cartuchos retirables, las partículas magnéticas y el regulador están juntos en una cámara sencilla dentro del cartucho. En todavía otras realizaciones, el regulador incluye desde 0.1% a 3% (p/p) de albúmina, de 0.01% a 0.5% de surfactante no iónico, un agente de lisis, o una combinación de los mismos. El cartucho retirable puede incluir adicionalmente una cámara que incluye perlas para la lisis celular; una cámara que incluye una polimerasa; y/o una cámara que incluye un cebador.

Se divulga un cartucho retirable dimensionado para facilitar la inserción en y retiro desde un sistema, en donde el cartucho retirable incluye una o más cámaras para contener una pluralidad de módulos de reactivo para contener uno o más reactivos de ensayo, en donde el módulo para reactivos incluye (i) una cámara para contener desde 1×10^8 a 1×10^{10} partículas magnéticas con un diámetro medio de desde 100 nm a 350 nm, una capacidad de relajación T2 por partícula desde 5×10^8 a $1 \times 10^{10} \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, y unidades estructurales de enlazamiento sobre su superficies (por ejemplo, anticuerpos, analito conjugado), siendo operativas las unidades estructurales de enlazamiento para alterar la agregación específica de las partículas magnéticas en la presencia de uno o más analitos o un agente de enlazamiento multivalente; y (ii) una cámara para contener un regulador que incluye desde 0.1 % a 3% (p/p) albúmina (e.g., desde 0.1 % a 0.5%, 0.3% a 0.7%, 0.5% a 1%, 0.8% a 2%, o desde 1.5% a 3% (p/p) albúmina), desde 0.01 % a 0.5% de surfactante no iónico (e.g., desde 0.01 % a 0.05%, 0.05% a 0.1%, 0.05% a 0.2%, 0.1% a 0.3%, 0.2% a 0.4%, o desde 0.3% a 0.5% de surfactante no iónico), o una combinación de los mismos. En una realización, las partículas magnéticas y el regulador están juntos en una cámara única dentro del cartucho.

En cualquiera de los sistemas, kits, cartuchos y métodos divulgados aquí, la muestra líquida puede incluir desde 1×10^8 hasta 1×10^{10} partículas magnéticas que tienen un diámetro medio que va desde 100 nm hasta 350 nm, una capacidad de relajamiento T₂ por partícula que va desde 5×10^8 hasta $1 \times 10^{10} \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, y gallinas sobre sus superficies (e.g., anticuerpos, analito conjugado), siendo operativas las unidades estructurales de enlazamiento para alterar la agregación específica de las partículas magnéticas en la presencia de uno o más analitos o un agente de enlazamiento multivalente.

En cualquiera de los métodos de la invención para la detección de un analito en una muestra de sangre entera, la destrucción de las células de glóbulos rojos puede llevarse a cabo utilizando un agente de lisis de eritrocitos (esto es, un regulador de lisis, o un detergente no iónico). Los reguladores para lisis de eritrocitos que pueden ser utilizados en los métodos de la invención incluyen soluciones isotónicas de cloruro de amonio (incluyendo opcionalmente regulador de carbonato y/o EDTA) y soluciones hipotónicas. Alternativamente, el agente de lisis de eritrocitos puede ser una solución acuosa de detergentes no iónicos (por ejemplo, nonil fenoxipolietoxiletanol (NP-40), 4-octilfenol polietoxilado (Triton-X100), Brij-58 o surfactantes no iónicos relacionados y mezclas de los mismos). El agente para lisis de eritrocitos destruye al menos algunas de las células de glóbulos rojos, permitiendo que una gran fracción de ciertos componentes de la sangre entera (por ejemplo, ciertas proteínas de los glóbulos rojos) sean separados (por ejemplo, como sobrenadante después de la centrifugación), de los glóbulos blancos sanguíneos, células de levaduras y/o células bacterianas presentes en la muestra de sangre entera. Después de la lisis de los eritrocitos y la centrifugación, la pella resultante es reconstituida para formar un extracto.

Los métodos de la invención pueden ser configurados para detectar un panel predeterminado de analitos asociados con patógenos. Por ejemplo, el panel puede ser un panel fúngico de *Candida* configurado para detectar individualmente tres o más de *Candida guilliermondii*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. Lusitaniae*, *C. parapsilosis*, y *C. tropicalis*. En otra realización, el panel puede ser un panel bacteriano configurado para detectar individualmente tres o más de los *Staphylococcus*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, y *Escherichia coli* negativos a coagulasa. En una realización particular, el panel puede ser un panel viral configurado para detectar individualmente tres o más de Citomegalovirus (CMV), Virus de Epstein Barr, Virus BK, Virus de la Hepatitis B, virus de la Hepatitis C, virus de Herpes simplex (HSV), HSV1, HSV2, virus Respiratorio Sincicial (RSV), Influenza; Influenza A, Influenza A subtipo H1, Influenza A subtipo H3, Influenza B, Virus 6 de Herpes Humano, Virus 8 de Herpes Humano, Metapneumovirus humano (hMPV), Rinovirus, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2, Parainfluenza 3, y Adenovirus. El panel puede ser un panel bacteriano configurado para detectar individualmente tres o más de *E. coli*, CoNS (estafilococcus negativo a coagulasa), *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecium*, *E. faecalis*, y *Klebsiella pneumoniae*. El panel puede ser un panel bacteriano configurado para detectar individualmente tres o más de *A. fumigatus*, y *A. flavum*. El panel puede ser un panel bacteriano configurado para detectar individualmente tres o más de *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pneumoniae*, y *Streptococcus pyogenes*. El panel puede ser un panel de meningitis configurado para detectar

individualmente tres o más de Streptococcus pneumonia, H. influenza, Neisseria Meningitis, HSV1, HSV2, Enterovirus, Listeria, E. coli, Streptococcus del Grupo B. El panel puede ser configurado para detectar individualmente tres o más de N. gonnorrhoeae, S. aureus, S. pyogenes, CoNS, y Borrelia burgdorferi. El panel puede ser configurado para detectar individualmente tres o más de C. Difficile, Toxina A, y Toxina B. El panel puede ser un panel de neumonía configurado para detectar individualmente tres o más de Streptococcus pneumonia, MRSA, Legionella, C. pneumonia, y Mycoplasma Pneumonia. El panel puede ser configurado para detectar individualmente tres o más de mutaciones resistentes al tratamiento seleccionadas de mecA, vanA, vanB, NDM-1, KPC, y VIM. El panel puede ser configurado para detectar individualmente tres o más de H. influenza, N. gonnorrhoeae, H. pylori, Campylobacter, Brucella, Legionella, y Stenotrophomonas maltophilia. El panel puede ser configurado para detectar la carga viral total causada por CMV, EBV, BK Virus, HIV, HBV, y HCV. El panel puede ser configurado para detectar la carga fúngica y/o carga bacteriana. La determinación de la carga viral puede ser utilizando una curva estándar y midiendo la muestra contra está curva estándar o algún otro método de cuantificación del patógeno en una muestra. El método de medición cuantitativo puede incluir PCR en tiempo real, PCR competitivo (relación de dos señales competidoras) u otros métodos mencionados aquí. El panel puede ser configurado para detectar la respuesta inmune en un sujeto para monitorizar PCT, MCP-1, CRP, GRO-alfa, proteína de grupo caja 1 de alta movilidad (HMBG-1), receptor de IL-1, receptor del antagonista de IL-1, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, proteína inflamatoria de macrófago (MIP-1), factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), osteopontina, RANTES (regulado por activación, expresado por células T normales y secretado; o CCL5), Th1, Th17, y/o TNF- α . El panel puede ser configurado para detectar individualmente tres o más de Ehrlichea, Mycobacterium, Syphilis, Borrelia burgdorferi, Cryptococcus, Histoplasma, y Blastomyces. El panel puede ser un panel de influenza configurado para detectar individualmente tres o más de Influenza A, Influenza B, RSV, Parainfluenza, Meta-pneumovirus, Rhinovirus, y Adenovirus.

Los métodos de la invención pueden ser configurados para reducir la variabilidad de muestra a muestra determinando una señal de resonancia magnética antes y después de la hibridación. La adición de nanopartículas derivadas a la muestra antes de los métodos para potenciar la aglomeración pueden proveer una línea base, una señal interna de T_2 que puede ser bien sea sustraída o utilizada para modificar la señal de T_2 después del enlazamiento de partículas derivadas con el analito y aglomeración. Este método puede ser utilizado para determinar o manejar la variabilidad de cartucho a cartucho.

Los términos “agregación”, “aglomeración” y “aglomerado” se utilizan de manera intercambiable en el contexto de las partículas magnéticas descritas aquí y significan el enlazamiento de dos o más partículas magnéticas una a otra, por ejemplo, a través de un analito multivalente, una forma multimérica de analito, anticuerpo, molécula de ácido nucleico u otra molécula o entidad de enlazamiento. En algunos casos, la aglomeración de partículas magnéticas es reversible.

Por “analito” se entiende una sustancia o un constituyente de una muestra que va a ser analizado. Los análisis de ejemplo incluyen una o más especies de uno o mas de los siguientes: una proteína, un péptido, un polipéptido, un aminoácido, un ácido nucleico, un oligonucleótido, ARN, ADN, un anticuerpo, un carbohidrato, un polisacárido, glucosa, un lípido, un gas (por ejemplo oxígeno o dióxido de carbono), un electrolito (por ejemplo, sodio, potasio, cloruro, bicarbonato, BUN, magnesio, fosfato, calcio, amoníaco, lactato), una lipoproteína, colesterol, un ácido graso, una glicoproteína, un proteoglicano, un lipopolisacárido, un marcador de superficie celular (por ejemplo CD3, CD4, CD8, IL2R O CD35) un marcador citoplasmático (por ejemplo, CD4/CD8 o CD4/carga viral), un agente terapéutico, un metabolito de un agente terapéutico, un marcador para la detección de un arma (por ejemplo, un arma química o biológica), un organismo, un patógeno, un subproducto de un patógeno, un parásito (por ejemplo, un protozoario o un helminto), un protisto, un hongo (por ejemplo levadura o moho), una bacteria, un actinomiceto, una célula (por ejemplo, una célula completa, una célula tumoral, una célula madre, una célula de glóbulos blancos, una célula T (por ejemplo, que despliegan CD3, CD4, CD8, IL2R, CD35, u otros marcadores de superficie), u otra célula identificada con uno o más marcadores específicos), un virus, un prión, un componente vegetal, un subproducto vegetal, algas, un subproducto de algas, una hormona de crecimiento vegetal, un insecticida, una toxina hecha por el hombre, una toxina ambiental, un componente oleoso y componentes derivados de los mismos. Tal como se utiliza aquí, el término “molécula pequeña” se refiere a un fármaco, medicación, medicamento u otro compuesto sintetizado químicamente que es contemplado para uso terapéutico humano. Tal como se usa aquí, el término “biológico” se refiere a una sustancia derivada de una fuente biológica, no sintetizada y que está contemplada para uso terapéutico humano. Un “biomarcador” es una sustancia biológica que puede ser utilizada como indicador de un estado de enfermedad particular o de un estado fisiológico particular de un organismo, en general un biomarcador es una proteína u otro compuesto natural medido en fluidos corporales cuya concentración refleja la presencia o severidad o etapa de un estado de enfermedad o disfunción, puede ser utilizado para monitorizar el avance terapéutico del tratamiento de una enfermedad o trastorno o disfunción, o puede ser utilizado como una medida subrogada de una aparición o progresión clínica. Tal como se utiliza aquí, el término “biomarcador metabólico” se refiere a una sustancia, molécula, o compuesto que es sintetizado o derivado biológicamente que es usado para determinar el estado de un paciente o la función hepática o renal de un sujeto. Tal como se utiliza aquí, el término “genotipificación” se refiere a la capacidad para determinar diferencias genéticas en genes específicos que pueden o pueden no afectar el fenotipo de un gen específico. Tal como se utiliza aquí, el término “fenotipo” se refiere a la expresión biológica resultante (metabólica o fisiológica) de la proteína definida por el genotipo. Tal como se utiliza

aquí, el término “perfil de expresión genética” se refiere a la capacidad de determinar la rata o cantidad de producción de un producto genético o la actividad de la transcripción genética en un tejido específico, de una forma temporal o espacial. Tal como se utiliza aquí, el término “análisis proteómico” se refiere a un patrón o disposición de proteínas para identificar diferencias claves en proteína o péptidos en tejidos normales y enfermos. Se describen aquí analitos de ejemplo adicionales. El término analito incluye adicionalmente componentes de una muestra que son el producto directo de un medio bioquímico de amplificación del analito diana inicial, tal como el producto de una reacción de amplificación de ácidos nucleicos.

Por una molécula de ácido nucleico “aislada” se entiende una molécula de ácido nucleico que es retirada del ambiente en el cual se presenta naturalmente. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico de origen natural presente en el genoma de una célula o como parte de un banco genético no está aislada, pero la misma molécula, separada de la parte remanente del genoma, como resultado, por ejemplo, de un evento de clonación, amplificación o enriquecimiento, está “aislada”. Típicamente, una molécula de ácido nucleico aislada está libre de regiones de ácido nucleico (por ejemplo regiones de codificación) con las cuales es inmediatamente contigua, en los extremos 5’ o 3’, en el genoma de origen natural. Tales moléculas de ácido nucleico aisladas pueden ser parte de un vector o una composición y todavía estarán aisladas puesto que tal vector o composición no son parte de su ambiente natural.

Tal como se utiliza aquí, “enlazado” significa unido o conectado por enlaces covalentes, enlaces no covalentes y/o enlazado a través de fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno y/o otras fuerzas intermoleculares.

El término “partícula magnética” se refiere a partículas que incluyen materiales de susceptibilidad magnética positiva alta tales como compuestos paramagnéticos, compuestos superparamagnéticos y magnetita, óxido férrico gamma, o hierro metálico.

Tal como se utiliza aquí, “reversibilidad no específica” se refiere a la estabilidad y robustez coloidal de partículas magnéticas contra agregación no específica en una muestra líquida y puede ser determinada sometiendo las partículas a las condiciones de ensayo previstas en la ausencia de una unidad estructural aglomerante específica (esto es, un analito o un aglomerante). Por ejemplo, la reversibilidad no específica puede determinarse midiendo los valores T_2 de una solución de partículas magnéticas antes y después de la incubación en un campo magnético uniforme (definida como <5000 ppm) a 0.45T durante 3 minutos a 37°C. Se considera que las partículas magnéticas tienen reversibilidad no específica si la diferencia de los valores T_2 antes y después de someter las partículas magnéticas a las condiciones de ensayo previstas varía en menos de 10% (por ejemplo, varía menos de 9%, 8%, 6%, 4%, 3%, 2% o 1%). Si la diferencia es mayor de 10%, entonces las partículas exhiben irreversibilidad en el regulador, diluyentes y matriz probados, y puede requerirse manipulación de la partícula y propiedades de la matriz (por ejemplo, formulación del recubrimiento y regulador) para producir un sistema en el cual las partículas tengan reversibilidad no específica. En otro ejemplo, la prueba puede aplicarse midiendo los valores T_2 de una solución de partículas magnéticas antes y después de la incubación en un campo magnético gradiente de 1 Gauss(mm-10000 Gauss/mm).

Tal como se utiliza aquí, el término “rata de relajación por RMN” se refiere una medición cualquiera de los siguiente en una muestra T_1 , T_2 , híbrido T_1/T_2 , $T_{1\rho}$, $T_{2\rho}$ y T_2^* . Los métodos de la invención están diseñados para producir una rata de relajación por RMN característica de si un analito está presente en la muestra líquida. En algunos casos la rata de relajación por RMN es característica de la cantidad de analito presente en la muestra líquida.

Tal como se utiliza aquí, el término “híbrido T_1/T_2 ” se refiere a cualquier método de detección que combine una medición de T_1 y T_2 . Por ejemplo, el valor de un híbrido T_1/T_2 puede ser una señal compuesta obtenida a través de la combinación de la relación, o la diferencia entre dos o más mediciones de T_1 y T_2 diferentes. El híbrido T_1/T_2 puede obtenerse, por ejemplo, utilizando una secuencia de pulsos en la cual T_1 y T_2 se miden alternativamente o se adquieren a manera de intervalos. Adicionalmente, la señal híbrida T_1/T_2 puede adquirirse con una secuencia de pulsos que mide una rata de relajación que está compuesta de ambas ratas o mecanismos de relajación T_1 y T_2 .

Un “patógeno” significa un agente que produce una enfermedad o malestar a su huésped, tal como un organismo o partícula infecciosa, capaz de producir una enfermedad en otro organismo, e incluye pero no se limita a bacterias, virus, protozoos, priones, levaduras y hongos o subproductos de patógenos. “Subproductos de patógenos” son aquellas sustancias biológicas que surgen del patógeno que pueden ser nocivas para el huésped o estimular una respuesta inmune del huésped excesiva, por ejemplo, antígenos patógenos, sustancias metabólicas, enzimas, sustancias biológicas o toxinas.

Por “analito asociado al patógeno” se entiende un analito característico de la presencia de un patógeno (por ejemplo, una bacteria, hongo o virus) en una muestra. El analito asociado con un patógeno puede ser una sustancia particular derivada de un patógeno (por ejemplo, una proteína, ácido nucleico, lípido, polisacárido o cualquier otro material producido por un patógeno) o una mezcla derivada de un patógeno (por ejemplo, células enteras, o virus enteros). En ciertos casos, el analito asociado con patógeno es seleccionado por ser característico del género, especie o cepa específica de patógeno que está siendo detectada. Alternativamente, el analito asociado con el patógeno es

seleccionado para establecer una propiedad del patógeno, tal como resistencia a una terapia particular. Por ejemplo, el analito asociado con el patógeno puede ser un gen, tal como un gen Van A o un gen Van B, característico de la resistencia a la vancomicina en un cierto número de especies bacterianas diferentes.

5 Por "secuencia de pulsos" o "secuencia de pulsos de RF" se entienden uno o más pulsos de radiofrecuencia que se aplican a una muestra y están diseñadas para medir, por ejemplo ciertas tasas de relajación por RMN, tales como ecosecuencias de rotación. Una secuencia de pulsos también puede incluir la adquisición de una señal después de uno o más pulsos para minimizar el ruido y mejorar la exactitud en el valor de la señal resultante.

Tal como se utiliza aquí, el término "señal" se refiere a una tasa de relajación por RMN, desplazamiento de la frecuencia, medición de susceptibilidad, medición de la difusión o mediciones de correlación.

10 Tal como se utiliza aquí, una referencia al "tamaño" de una partícula magnética se refiere al diámetro promedio para una mezcla de las partículas magnéticas según se determina por microscopía, dispersión de luz, u otros métodos.

15 Tal como se utiliza aquí, el término "sustancialmente monodispersa" se refiere a una mezcla de partículas magnéticas que tienen una polidispersión en distribución de tamaño según se determina por la forma de la curva de distribución de tamaño de partícula en mediciones por dispersión de luz. La FWHM (media máxima de anchura total) de la curva de distribución de partícula menor de 25% de la posición del pico se considera sustancialmente monodispersa. Además, solamente un pico debería ser observado en los experimentos de dispersión de luz y la posición del pico debería estar dentro de la desviación estándar de una población de partículas monodispersas conocida.

Por "capacidad de relajamiento T_2 por partícula" se entiende la capacidad de relajamiento T_2 promedio por partícula en una población de partículas magnéticas.

20 Tal como se utiliza aquí, "no fraccionado" se refiere a un ensayo en el cual ninguno de los componentes de la muestra que está siendo probada son retirados después de la adición de partículas magnéticas a la muestra y antes de la medición de la relajación por RMN.

25 A lo largo de la descripción, cuando se describen unidades y sistemas por tener, incluir, o incluir componentes específicos, o donde se describen procesos y métodos que tienen, incluyen o incluyen etapas específicas, se contempla que, adicionalmente, hay unidades y sistemas que consisten esencialmente de, o consisten de, los componentes citados, y que hay procesos y métodos que consisten esencialmente de, o consisten de, las etapas de procesamiento citadas. Debe entenderse que el orden de las etapas u orden de la ejecución de ciertas acciones carece de importancia, a menos que se especifique otra cosa, en tanto el método siga siendo operable. Además, en muchos casos pueden llevarse a cabo simultáneamente dos o más etapas o acciones.

30 Breve descripción de los dibujos

La figura 1A es un diagrama específico de una unidad de RMN para detección de una respuesta de señal de una muestra a una secuencia de pulso de RF.

La figura 1B representa una configuración de bobina típica que rodea un tubo de muestra para una medición de una señal de relajación en una muestra de 20 μ L.

35 Las figuras 2A-2E ilustran geometrías de microbobinas que pueden ser utilizadas en RMN (para excitación y/o detección); los diseños incluyen, pero no se limitan a una bobina solenoide enrollada (figura 2A), una bobina plana (figura 2B), una bobina solenoide MEMS (figura 2C), una bobina Helmholtz MEMS (figura 2D), y una bobina en montura (figura 2E). La fabricación de bobinas litográficas tridimensionales de bobinas bien caracterizadas usadas en la detección de RMN también está establecida y puede ser utilizada para estas aplicaciones, Demas et al.,
40 "Electronic characterization of lithographically patterned microcoils for high sensitivity NMR detection" J Magn Reson 200:56 (2009).

45 La figura 3 es un dibujo que representa un ensayo de agregación. Las partículas magnéticas (puntos) son recubiertas con un agente de enlazamiento (esto es, anticuerpo, oligo, etc.) de tal manera que en la presencia del analito, o del agente de enlazamiento multivalente, se forman agregados. Los círculos punteados representan la esfera o porción de difusión del volumen total de fluido que una molécula en solución puede experimentar a través de su difusión durante una medición de T_2 (el camino exacto recorrido por una molécula de agua es aleatorio, y este dibujo no está a escala). La agregación (a mano derecha) elimina porciones de la muestra de las no uniformidades magnéticas microscópicas que destruyen la señal T_2 del agua, llevando a un incremento de relajación T_2 .

50 Las figuras 4A-4E son una serie de gráficas que representan la dependencia de la capacidad de relajación transversa (R_2) (figura 4A) o T_2 (figuras 4B-4E) sobre el diámetro de una partícula y la agregación de las partículas. La figura 4A es una gráfica que representa el régimen promedio de movimiento (línea derecha, lado izquierdo); la R_2 ($1/T_2$)

medida por la secuencia CPMG se incrementa a medida que el tamaño de partícula se incrementa puesto que los pulsos de reenfoque son inefectivos para contrarrestar los efectos de desfase de las partículas. Puesto que las transiciones del sistema al régimen limitado de visita (línea oscura, lado derecho), los pulsos de reenfoque comienzan a hacerse efectivos y R_2 disminuye a medida que se incrementa el tamaño de partícula. Para campos magnéticos homogéneos, la R_2^* en el régimen de promedio de movimiento coincide con R_2 y el R_2^* alcanza un valor constante en el régimen limitado de visita. En un campo homogéneo, cuando el R_2^* es menor que R_2 de cualquiera de los regímenes de promedio de movimiento y régimen limitado de visita el sistema está en el régimen de desfase estático. El círculo vacío representa el R_2 de una solución de partículas dispersadas al 100% (diámetro = 15 nm) y el círculo sólido representa una solución de partículas aglomeradas al 100% (diámetro = 200 nm). Este es un ejemplo de cómo interpretar estas curvas para reacciones de aglomeración. Las condiciones para esta curva son 0.1 mM Fe, $\Delta\omega=8.85\times 10^6$, $D=2.5\times 10^{-5}$ m²/s y $T_{CP}=0.25$ ms. La figura 4B es una gráfica que representa las mismas curvas de luz y oscuridad representadas en términos de T_2 y diámetro, sobre una escala lineal. En esta figura la línea interrumpida negra representa la T_2^* medida en un campo magnético no uniforme donde T_2^* siempre es inferior a T_2 y no refleja el tamaño de la partícula. Los puntos de datos son los mismos también. La figura 4C es una gráfica que representa el modelo de aglomeración monodispersa y muestra que T_2 seguirá la curva a medida que el analito es agregado puesto que el diámetro promedio de las partículas de población cubrirá todos los diámetros intermedios entre los estados inicial y final. La figura 4D es una gráfica que representa el modelo polidisperso y que muestra que T_2 hará transición entre dos puntos sobre esta curva cuando forma aglomerados de tamaños específicos. La curva de respuesta será lineal con respecto a la adición de analito, pero no lineal con respecto a la fracción de volumen de los aglomerados, debido a la transición de partículas entre el estado 1 y el estado 2. La pendiente de la curva de respuesta es directamente proporcional a la sensibilidad del ensayo. La figura 4E es una gráfica que muestra los dos regímenes para la agregación de partículas y efectos de T_2 con base en el tamaño de partícula y cómo los ensayos de aglomeración en los diferentes regímenes se representan sobre las curvas de T_2 versus diámetro (i) para el régimen de promedio de movimiento T_2 que disminuye cuando las partículas se aglomeran; y (ii) para el régimen de movimiento de T_2 lento se incrementa cuando las partículas se aglomeran. Bajo las condiciones mostradas en esos modelos, la frontera entre los dos regímenes es cerca de partículas de diámetro de 100 nm. Cuando las partículas magnéticas pequeñas forman agregados por debajo de 100 nm de diámetro, el resultado es un descenso en T_2 al formarse el agregado. Cuando las partículas magnéticas en o por encima de 100 nm de diámetro forman agregados más grandes, el resultado es un incremento en T_2 con la formación del agregado.

Las figuras 5A-5C son dibujos que representan diferentes formatos de ensayo para los ensayos de la invención. La figura 5A representa un inmunensayo sándwich de aglomeración en el cual dos poblaciones de partículas magnéticas están diseñadas para enlazarse a dos epítomos diferentes de un analito. La figura 5E representa un inmunoensayo competitivo en el cual el analito en una muestra líquida se enlaza a un agente de enlazamiento multivalente (un anticuerpo multivalente), inhibiendo por lo tanto la agregación. La figura 5C representa un ensayo de aglomeración mediado por hibridación en el cual dos poblaciones de partículas están diseñadas para enlazarse a la primera y segunda porciones de una diana de ácido nucleico, respectivamente.

La figura 6 ilustra un concepto de cartucho modular en secciones que pueden ser empacadas y almacenadas separadamente. Esto se hace, por ejemplo, de tal manera que el módulo de entrada (mostrado elevado con un tubo Vacutainer invertido unido) puede ser esterilizada mientras que el módulo de sostenimiento de reactivo en la mitad no lo es. Esto permite que el componente que contiene reactivos sea el único componente refrigerado.

Las figuras 7A-7F representan un módulo de entrada Vacutainer. La figura 7A lo muestra en la posición invertida después de que el usuario ha retirado el cierre del tubo Vacutainer y colocado el cartucho sobre él. La figura 7B muestra la ruta moldeada que la sangre seguirá fuera del Vacutainer y hacia la región de carga de muestra una vez que el cartucho es enderezado hacia arriba. El sello de lámina puede ser el lado inferior de los canales, formando una parte moldeada no costosa con canales cerrados. La figura 7C es una vista en corte que muestra el tubo de ventilación que permite que el aire entre al vial a medida que la sangre sale y llena la región de muestra. Las figuras 7D-7F representan un módulo de entrada para la toma de alícuotas de muestras diseñado para hacer interfaz con tubos Vacutainer no tapados, y para generar dos alícuotas de un volumen de muestra que puedan ser utilizadas para llevar a cabo, por ejemplo, un ensayo de Candida. El módulo de entrada tiene dos partes plásticas duras, que se sueldan entre sí por vía ultrasónica y sellan la lámina para formar una red de canales que permiten formar un camino de flujo hacia el primer pozo con sobreflujo hacia el segundo pozo de muestra. Se utiliza una parte de sello Vacutainer blanda para sellar con el Vacutainer. Tiene un puerto para el flujo de muestra, y un puerto de ventilación, para permitir que suceda el flujo. La figura 8 representa el módulo de entrada de muestra con el sello de lámina retirado. En la parte superior, puede verse el pequeño puerto de entrada de aire a la izquierda, el pozo de muestra más grande en el centro y un puerto que los conecta entre sí. Este puerto provee un canal a través del cual el aire puede fluir una vez que se perfora el sello de lámina. También provee un sobreflujo hacia el cuerpo del módulo para permitir que el exceso de sangre drene y no se derrame. Esto mide efectivamente la muestra de sangre hasta el volumen contenido en el pozo de muestra.

Las figuras 9A-9C representan un módulo de reactivo. La figura 9A representa el módulo del cartucho que está previsto para contener los reactivos y consumibles para uso durante el ensayo. Al lado izquierdo están las alícuotas selladas predispensadas de los reactivos. A la derecha hay un tubo de centrifuga de fondo cónico de 2.8 ml que se

utiliza para la centrifugación inicial de la sangre. Los otros orificios pueden ser llenados según se necesite con viales, tubos de microcentrífuga y puntas de pipeta. La figura 9B es una vista en corte del módulo de reactivos que muestra los soportes para las puntas de reactivos con alícuotas previamente definidas, incluyendo la característica en el fondo en la cual se presionan las puntas para proveer un sellamiento. La figura 9C representa tres puntas de pipeta representativas en las cuales pueden ser predispensados los reactivos; y luego se pueden sellar las partes posteriores. Estas puntas son presionadas hacia el soporte de la muestra para proveer un sellamiento.

Las figuras 10A y 10B representan un diseño alternativo del cartucho modular, que muestra un módulo de detección con un pozo deprimido para uso en ensayos que requieren PCR. La contaminación cruzada de productos de PCR es controlada de dos maneras. Primero, los sellos que están sobre los tubos de detección están diseñados para sellar una punta de pipeta a medida que está penetra. Segundo, el instrumento provee flujo de aire a través del pozo deprimido por medio de orificios en el pozo para asegurar que ningún aerosol es arrastrado hacia abajo y no se desplaza a través de la máquina.

La figura 11 representa un módulo de detección de cartucho que muestra tubos de detección y uno de los orificios utilizados para asegurar que el aire fluya hacia abajo y sobre los tubos durante la utilización de la pipeta para ayudar a evitar el escape de aerosol.

La figura 12 representa una vista inferior del módulo de detección, que muestra el fondo de los tubos de detección y los dos orificios utilizados para asegurar el flujo de aire. Puede insertarse un filtro opcional aquí para capturar cualquier aerosol líquido y evitar que entre a la máquina. Este filtro podría también ser una lámina de material hidrófobo como Gore-tex que permitirá que escape el aire pero no los líquidos.

Las figuras 13A-13C representan un tubo de detección. La figura 13A es una vista del tubo de detección. El tubo mismo podría ser un tubo de PCR de 200 microlitros comercial, mientras que la tapa es una parte elastomérica moldeada a la medida que provee un sello tipo ornitorrinco resistente a la presión en el interior y un primer sello para la punta de la pipeta desde la parte superior. El sello es así un tipo de sello para romper, donde un sello se hace antes de que el otro se rompa. La figura 13B representa el componente de sellamiento moldeado personalizado. Nótese el orificio circular en el cual se inserta la punta de la pipeta y el sello tipo ornitorrinco por debajo, lo cual provee un segundo sello que resiste la presión desarrollada en el tubo. La figura 13C representa el sello que muestra el tipo ornitorrinco en la parte inferior y el orificio en la parte superior.

Las figuras 14A-14C representan un cartucho para llevar a cabo un ensayo multiplexión. La figura 14A muestra una tira de reactivo para el cartucho. Los orificios ovales son los soportes para los módulos de detección y son contruidos separadamente y luego colocados en los orificios. Los pozos de detección podrían ser diseñados individualmente o estar disponibles comercialmente. La figura 14B muestra el módulo de detección para el cartucho representado en la figura 14A. En este ejemplo, el módulo de detección contiene dos cámaras de detección, pero podrían contener cualquier número de cámaras según se requiera por el ensayo y según el sistema de detección (el lector MR) este diseñado para aceptar. La figura 14C representa un molde alterno para el cartucho multiplex modular. Este cartucho incluye tres módulos de detección que son moldeados como parte de la banda de reactivos, y estas porciones son sobresalientes del marco y son procesadas individualmente en otras unidades (esto es, la unidad RMN y/o la unidad de aglomeración asistida magnética (MAA)) con el sistema de ensayo.

La figura 15 es un esquema que representa una realización del método de aglomeración asistida magnética gradiente en ciclo (gMAA). Se colocan dos magnetos en dos posiciones tales que si el tubo de muestra se coloca cerca a la región de fuerte gradiente de campo magnético producida por el primer magneto, las partículas magnéticas serán arrastradas hacia la dirección del gradiente de campo producido por el primer magneto, el tubo de muestra es colocado entonces cerca del segundo magneto produciendo un gradiente de campo, y las partículas magnéticas son arrastradas a la dirección del gradiente de campo producido por el segundo magneto. El ciclo puede ser repetido hasta que la reacción de agregación alcance un estado de equilibrio (según se observa por el cambio de rata de relajación por RMN de la muestra); puede utilizarse un pequeño número de ciclos también. También puede utilizarse una magneto individual usada para producir un gradiente de campo, mientras que para hacer el ciclo del tubo de muestra puede moverse con respecto al gradiente de campo magnético.

La figura 16 es un esquema que representa una configuración de aglomeración asistida magnética homogénea (hMAA). A la izquierda, se muestran las partículas magnéticas como puntos en un estado parcialmente aglomerado. Cuando se exponen a un campo magnético homogéneo, como se representa al lado derecho, la aglomeración de las partículas magnéticas se promueve a medida que las partículas magnéticas forman cadenas a lo largo de la dirección del campo producido por la configuración hMAA. Al lado derecho, los dos magnetos están representados por barras, para mostrar la formación de un campo de dipolo estándar. El hMMA también puede ser utilizado para evaluar la reversibilidad no específica de una partícula magnética para establecer su utilidad en un ensayo.

La figura 17 representa una unidad MAA del gradiente configurada para aplicar un campo magnético gradiente al lado y al fondo de una muestra. La configuración específica tiene magnetos con un campo de superficie de aproximadamente 0.7 T, mientras que el gradiente producido es del orden de 0.25 T/mm. Pueden utilizarse unidades

gMAA similares, cubriendo un rango mucho más grande de campos y gradientes.

5 Las figuras 18A-18C representan una unidad MAA de gradiente configurada para aplicar un campo magnético de gradiente al lado y al fondo de una disposición de muestras. La figura 18A representa el arreglo de unidad gMAA de 32 magnetos de fondo y 40 magnetos laterales (32 funcionales, usados para balancear los campos magnéticos alejados vistos por toda la muestra), cada uno con una fuerza de campo de aproximadamente 0.5 T, usados para asistir en la aglomeración en un arreglo de muestras simultáneamente. Las figuras 18B-18C representan una vista superior (figura 18B) y una vista lateral (figura 18C) de una configuración para la automatización de una unidad gMAA automatizada en donde una placa de gMAA junto con una configuración para contener un arreglo de muestras realiza un ciclo entre las posiciones de magneto inferior y lateral mediante un sistema robótico, dentro de un arreglo controlado por temperatura. Los magnetos son estacionarios, mientras que la placa que soporta los tubos de muestra se mueve a través de una trayectoria predefinida. Una fuerza de campo de ejemplo sobre la superficie de los magnetos individuales es 0.4-0.5 T, con un gradiente del orden de 0.1 T/mm.

15 Las figura 19A-19B representan una vista superior (figura 19A) y una vista lateral (19B) de una unidad MAA homogénea configurada para aplicar un campo magnético homogéneo una disposición de muestras. Pueden utilizarse fuerzas de campo desde 0.2-0.7 T con homogeneidad desde 500 a 5000 ppm a lo largo de la región del tubo de muestra.

La figura 20 es un dibujo de un sistema de vórtex que incluye los siguientes componentes: (i) un soporte de muestra, (ii) una placa principal, (iii) cuatro uniones, (iv) riel lineal y sistema de transporte (x2), (v) un soporte para árboles de impulso y rieles, (vi) árbol de acoplamiento e impulso, (vii) una placa de montaje y (viii) un motor de impulso.

20 La figura 21 es un dibujo de un sistema de vórtex compacto que incluye los siguientes componentes: (i) un soporte de muestra, (ii) una placa principal, (iii) dos uniones, (iv) riel lineal y sistema de transporte, (v) un soporte para riel lineal, (vi) soporte para árbol de impulso, (vii) árbol de acoplamiento e impulso, (viii) y una placa de montaje, y (ix) un motor de impulso.

25 Las figuras 22A y 22B representan porciones de un sistema de vórtex. La figura 22A es un dibujo que representa la porción inferior (esto es, el motor de impulso, el acoplamiento y el árbol de impulso) de un sistema de vórtex. El motor incluye una marca de índice y/u otro medio para detección de la posición tal como un codificador de posición óptico, magnético o por resistencia que permite que el motor encuentre el punto específico en su rotación. Estas marcas de índice se utilizan para retornar el sistema y asegurar de que la muestra pueda ser regresada a posición conocida después de mezclar y permitir fácil acceso al sistema de vórtex mediante accionadores robóticos, y así estar integrado en un sistema automatizado. En lugar de marcas de índice, podrían emplearse conmutadores de regreso externos o sensores de seguimiento de posición. La figura 22B es un dibujo que representa los mecanismos de guía de un sistema de vórtex. La placa principal está conectada al eje de desplazamiento del árbol de impulso y es libre para rotar. La placa sigue el camino orbital alrededor y dictado por el árbol del motor.

35 Las figuras 23A-23C son series de dibujos que representan un sistema de vórtex que utiliza un impulso por cinta planetaria. La figura 23A es una vista global que muestra el sistema de vórtex configurado para un tubo grande. La figura 23B es una vista en sección que muestra dos soportes para tubos para tubos pequeños. La figura 23C es una vista general de un sistema de vórtex que muestra cuatro tubos y un acercamiento del mecanismo de impulso por cinta planetaria.

40 La figura 24 es un dibujo que representa los componentes del ensayo competitivo de creatinina del Ejemplo 6. Una partícula magnética cubierta con creatinina se utiliza en combinación con un anticuerpo de creatinina para formar un sistema de agregación.

45 La creatinina presente en una muestra líquida compite con las partículas magnéticas por el anticuerpo, llevando una reducción en la agregación con el incremento en la concentración de creatinina. El cambio en la agregación se observa como un cambio en la rata de relajación T_2 de los núcleos de hidrógeno en las moléculas de agua de la muestra líquida. Comparando la rata de relajación T_2 observada de la muestra líquida con una curva estándar, se determina la concentración de creatinina.

50 Las figuras 25A-25C son una serie de gráficas que muestran la curva de respuesta para ensayos competitivos de creatinina. La figura 25A es una gráfica que muestra una curva estándar para el ensayo competitivo de creatinina del Ejemplo 6 que correlaciona la rata de relajación T_2 observada con la concentración de creatinina en la muestra líquida. La figura 25B muestra la respuesta T_2 de una partícula cubierta con creatinina con dos preparaciones diferentes de anticuerpo. La preparación 1 es preproducción (con anticuerpo agregado) y la preparación 2 es producción purificada (sin anticuerpo agregado presente). La figura 25C muestra la respuesta T_2 de una partícula cubierta con creatinina con anticuerpo no agregado, anticuerpo biotinilado y anticuerpo deliberadamente multimerizado, y confirma la capacidad de aglomeración incrementada de agentes de aglomeración multivalentes.

- La figura 26 es una gráfica que muestra la aglomeración específica alcanzada, según se determina mediante las ratas de relajación T_2 , con diversos métodos de gMAA como se describe en el Ejemplo 10. En la figura 26 (i) "control" es gMAA (exposición a magneto + vórtex, repetición) en el cual la posición relativa de la muestra y la dirección del campo magnético no cambian con cada ciclo; (ii) "torsión" es gMAA (exposición magnética + rotación sin magneto, repetición) con un tubo que rota alrededor de 90° con respecto al magneto de gradiente con cada ciclo; (iii) "giro de 180° " es gMAA (exposición a magneto + retirar tubo de magneto, rotar, colocar de regreso el magneto, repetir) con un tubo que rota cerca de 180° con respecto al magneto de gradiente con cada ciclo; y "retirar 5 veces" es retirar el tubo de magneto 5, descansar 5 segundos (sin rotación), repetir. Los resultados muestran que la rata a la cual se alcanzan un grado de estado de equilibrio de aglomeración, y una lectura estable de T_2 , que es acelerado por la generación de ciclos entre las dos o más posiciones a lo largo de un número de tratamientos de gMAA. Adicionalmente, las combinaciones de gradiente de campo, el campo de ciclo (lateral o inferior) para anular o de campo lateral a inferior, campo (lateral o inferior) al vórtex también son interacciones que pueden ser utilizadas para gMAA. Los tiempos de exposición o residencia (bien sea sobre el campo o fuera de él) y el número de ciclos pueden variarse para optimizar la agregación asistida para un ensayo específico (no mostrado).
- La figura 27 es una gráfica que muestra la curva de respuesta para el ensayo competitivo de creatinina para muestras procesadas con magneto gMAA alternante lateral-inferior como se describe en el Ejemplo 11.
- La figura 28 es un dibujo que representa la arquitectura del ensayo competitivo de tacrolimus del Ejemplo 9.
- La figura 29 es una gráfica que muestra una curva estándar para el ensayo competitivo de tacrolimus del Ejemplo 9 que correlaciona la rata de relajación T_2 observada para una muestra líquida con la concentración de tacrolimus en la muestra líquida.
- Las figuras 30A-30B son gráficas que representan el grado hasta el cual la agregación asistida por gMAA es dependiente de la temperatura y el tiempo de residencia en el ensayo del Ejemplo 11. La figura 30 A es una gráfica que muestra que el grado de agregación tal como es determinado midiendo la respuesta T_2 de la muestra se incrementa con el incremento del tiempo de residencia a temperatura ambiente. La figura 30B es una gráfica que muestra que el grado de agregación tal como se determina midiendo la respuesta T_2 de la muestra se incrementa con el incremento del tiempo de residencia de gMAA a 37°C . Como se muestra en las figuras 30A y 30B, el incremento de temperatura y el incremento del tiempo de residencia potencian el grado de agregación asistida por gMAA según se observa por los cambios en la T_2 observada.
- La figura 31 es una gráfica que muestra que el grado de agregación tal como se determina midiendo la respuesta T_2 de la muestra se incrementa con el incremento del número de ciclos de gMAA en el ensayo del Ejemplo 13.
- La figura 32 es un dibujo que representa la arquitectura del ensayo sándwich de aglomeración de Candida del Ejemplo 14.
- La figura 33 es una gráfica que representa una curva de inhibición de creatinina (véase Ejemplo 7) para utilizar una partícula recubierta con anticuerpo y un agente de enlazamiento multivalente amino-dextrano-creatinina para inducir la aglomeración compitiendo con cualquier analito diana (creatinina) presente en la muestra para causar la aglomeración de partículas. El agente de enlazamiento usado es dextrano de 40 kDa con ~ 10 creatininas por moléculas de dextranos.
- La figura 34 es una gráfica que representa la evaluación de los conjugados de Tac-dextrano en cuanto a su capacidad de aglomeración (véase Ejemplo 8) llevando a cabo una titulación. Tal como se observa, el peso molecular incrementado de Tac-dextrano da como resultado la señal T_2 mejorada.
- La figura 35 es una gráfica que representa la evaluación de los conjugados de Tac-dextrano en cuanto a su capacidad de aglomeración (véase Ejemplo 8) llevando a cabo una titulación. Tal como se observa, una sustitución más alta mejora la señal T_2 .
- La figura 36 es una gráfica que representa la evaluación de conjugados de Tac-BSA en cuanto a su capacidad de aglomeración (véase Ejemplo 8) llevando a cabo una titulación similar a la usada para los conjugados de Tac-dextrano. Como se observa, el rendimiento de la aglomeración varía con la relación de sustitución de tacrolimus.
- La figura 37 es una gráfica que representa los resultados de los ensayos de T_2 para detectar el anticuerpo anti-biotina utilizando partículas magnéticas preparadas en sangre y en matrices de PBS tal como se describe en el Ejemplo 1.
- La figura 38 es una gráfica que representa los resultados de los ensayos de T_2 para detectar anticuerpo anti-biotina utilizando partículas magnéticas preparadas con (círculo abierto) y sin (círculo relleno) un bloque de proteína como se describió en los Ejemplos 8 y 9.

La figura 39 es una gráfica que representa los resultados de los ensayos de T₂ para detectar anticuerpo anti-biotina utilizando partículas magnéticas preparadas que tienen un bloqueo BSA (diamante, cuadrado, triangulo rellenos de negro), o un bloque FSG (X y círculo de gris claro) como se describe en el Ejemplo 2.

La figura 40A-40B son esquemas de recubrimiento de partículas provistos.

- 5 Las figuras 41A-41B representan resultados de los ensayos de T₂ para detectar biotina en un formato de ensayo competitivo descrito en el Ejemplo 4. La figura 41A representa resultados experimentales en regulador; mientras que la figura 41B representa resultados experimentales en sangre lisada.

La figura 42 es un esquema de un sistema que incluye una unidad RMN, un brazo robótico, una unidad hMAA, una unidad gMAA, dos unidades de agitación como una centrífuga y una pluralidad de bloques de calentamiento.

- 10 Las figuras 43A-43D son imágenes que representan diversas unidades de transferencia de fluidos que pueden ser utilizadas en los sistemas.

Las figuras 44A y 44B son esquemas que muestran como un sistema puede ser diseñado para regular la temperatura del espacio de trabajo.

- 15 Las figuras 45A y 45B son esquemas que representan una unidad de RMN que tiene un alojamiento separado para la regulación de la temperatura en el sitio de la medición por RMN, y útil cuando se requiere un control de temperatura ajustado para la precisión de la medición. La configuración de control de temperatura representada en esta figura es una de muchas maneras diferentes de controlar la temperatura.

- 20 La figura 46A es una tabla y la 46B es una gráfica que representa la repetibilidad de las mediciones de Candida por los métodos de la invención a lo largo de un período de ocho días. Para determinar la repetibilidad de la medición de T₂ sobre sangre humana entera infectada con *C. albicans*, llevamos a cabo un estudio de ocho días en el cual la misma muestra de donante tomada y amplificada fue hibridada a las partículas superparamagnéticas (n=3) cada día y se registraron los valores de T₂ resultantes (véase Ejemplo 17). La precisión en la medición se muestra en la figura 46A y en general es estrecha con los CV de todas las mediciones menores de 12%. La repetibilidad observada en el transcurso de los ocho días se muestra en la figura 46B (valores T₂ medios +/- el 95% de intervalos de confianza medios a partir de las mismas muestras de donante sembradas y amplificadas en el transcurso de los ocho días) con CV menor de 10% a través del rango de concentraciones de Candida y 6% para el control negativo.
- 25

La figura 47 es un esquema que describe el flujo de trabajo para la detección de un patógeno bacteriano o fúngico en una muestra de sangre entera (véanse Ejemplos 14 y 17).

- 30 Las figuras 48A y 48B son gráficas que representan resultados de muestras de donantes. La figura 48A es una gráfica que representa los resultados obtenidos a partir de 16 experimentos diseñados para establecer el rendimiento del ensayo en 6 diferentes muestras de sangre de donantes sembradas con un rango de células de *C. albicans* (véase Ejemplo 17). Cada punto de dato es la media +/- el 95% del intervalo de confianza (n=48). A la concentración de prueba más baja (10 células/mL) se falló en la detección de *Candida albicans* en 37% de las veces (6 de cada 16 experimentos); sin embargo a 100 células/mL se detectó *Candida albicans* el 100% del tiempo. Esto sugiere que el ensayo puede detectar de manera robusta a concentraciones de *C. albicans* superiores o iguales a 100 células/mL sin inhibición mayor del comportamiento introducido a través de las muestras de sangre del donante. La figura 48B es una gráfica que representa los resultados obtenidos a partir de 7 experimentos diseñados para establecer el rendimiento de ensayo en 6 diferentes muestras de sangre del donante sembradas con un rango de células de *C. crusei* (véase Ejemplo 17). Cada punto de dato es la media +/- el 95% de intervalo de confianza (n=21). No hubo detección a 10 células/mL en ninguno de los experimentos pero hubo detección a 100 células/mL para todos los experimentos. Esto sugiere la LOD entre 10 y 100 células/mL.
- 35
- 40

- 45 La figura 49 es un diagrama de puntos que muestra los valores T₂ medidos para cinco aislados clínicos de *C. albicans* sembrados en 400 µL de sangre entera a concentraciones que varían de 0 a 1 E⁴ células/mL. Los resultados en la gráfica son la media +/- 1SD. Los datos indican que a pesar de la dispersión de los valores T₂ absolutos obtenidos entre los diferentes aislados, a 50 células/mL todos los valores están por encima del control que no tiene *Candida* (3 mediciones replicadas a partir de 20 ensayos independientes, total de 60 reacciones de aglomeración diferentes).

- 50 Las figuras 50A y 50B son gráficas ROC de resultados de T₂ generados a 10 células/mL (figura 50A) y 50 células/mL (figura 50B). El área bajo la curva a 10 células/mL es 0.72 (95CI=0.56 a 0.88) mientras que a 50 células/mL el área bajo la curva es 0.98 (95CI=0.95 a 1.001). El área bajo la curva se usa frecuentemente para cuantificar la exactitud del diagnóstico; en este caso nuestra capacidad para discriminar entre un paciente candidémico con una infección de 10 células/mL o 50 células/mL versus un paciente sin candidemia. A 10 células/mL el área bajo la curva es 0.72 lo que significa que si el ensayo de T₂ fue llevado a cabo en una persona

escogida aleatoriamente con candidemia a un nivel de infección de 10 células/mL, hay un 72% de posibilidades de que sus valores T2 sean más altos que los de una persona sin candidemia. La exactitud clínica de la prueba es mucho más alta a 50 células/mL con un área bajo la curva a 0.98. De nuevo se indica que una persona con candidemia a este nivel de infección, el ensayo de T2 daría un valor más alto que en una muestra de un paciente sin candidemia el 98% de las veces. Véase el Ejemplo 17.

La figura 51 es una gráfica que representa la sensibilidad del ensayo utilizando el termociclo estándar (~3 horas de tiempo total) y un proceso que combina las etapas de fusión/elongación (~2 horas, 13 minutos de tiempo global). La combinación de la etapa de fusión y elongación en el termociclo reduce el TAT del ensayo total a 2.25 horas sin comprometer la sensibilidad del ensayo.

La figura 52 es una gráfica que representa el cambio en la señal T₂ con ciclización por PCR (véase Ejemplo 18). Los resultados demuestran que los métodos de la invención pueden ser utilizados para llevar a cabo PCR en tiempo real y proveer información cuantitativa acerca de la cantidad de ácido nucleico diana presente en una muestra.

La figura 53 es una serie de fotografías que muestran un separador magnético simple/inserto de bloque de PCR.

La figura 54 es una imagen que muestra la cantidad de ADN generada por la amplificación de (1) 100 copias de *C. albicans* genómico amplificado en la presencia de nanopartículas de sonda sencilla de *C. albicans* 3' y 5'; las partículas fueron mantenidas en la pared lateral durante el PCR mediante campo magnético (2) 100 copias de *C. albicans* genómico amplificado sin nanopartículas, y (3) 100 copias de *C. albicans* genómico amplificado en la presencia de nanopartículas de sonda sencilla de *C. albicans* 3' y 5'; sin campo magnético.

Las figuras 55A-55E son vistas esquemáticas de un tubo de muestra que contiene una porción inmovilizada de una espuma metálica magnetizable (sombreada), partículas magnéticas (círculos), y analito (triángulos), una espuma metálica magnetizable, por ejemplo, hecha de níquel, puede ser insertada en un conducto e inmovilizada por exposición al calor, con encogimiento del conducto alrededor de la espuma de metal, dando como resultado un sello completado. Una muestra que contiene partículas magnéticas y analitos se introduce entonces en un extremo del conducto (figura 55A). A continuación el conducto es expuesto a un magneto (figura 55B), y las partículas magnéticas son atraídas a la espuma metálica y se atrapan magnéticamente dentro de sus poros, o grietas. El diámetro promedio de los poros en la espuma metálica está, por ejemplo, entre 100-1000 micrones. Las moléculas de analito pueden ser llevadas a la espuma metálica a través del enlace a una partícula magnética, o el fluido puede ser forzado a través de la espuma metálica para alcanzar partículas magnéticas atrapadas. Mientras están atrapadas en la espuma metálica, las partículas magnéticas tienen interacciones potenciadas, puesto que ahora están confinadas y están más cercas a otras partículas magnéticas, y se potencian las formaciones de aglomerado. La espuma magnética es entonces desmagnetizada (figura 55C), esto es, el campo magnético de la espuma metálica se hace despreciable. Las partículas magnéticas y los complejos aglomerados de analito permanecen largamente en la espuma metálica, y la difusión de los aglomerados de partículas magnéticas es relativamente baja, aunque ocurre alguna difusión natural del analito hacia dentro y afuera de la espuma metálica (figura 55D). Alternativamente, la espuma metálica magnetizable (cilindro hueco) está libre flotando en el tubo de muestra con las partículas magnéticas (círculos) y analito (estrellas). La magnetización y desmagnetización de la espuma metálica en flotación libre se utiliza para incrementar la rata de formación de agregados.

La figura 56 A representa una configuración gMAA rotatoria. La gMAA rotatoria puede incluir tres configuraciones para variar las exposiciones al campo magnético –lateral-inferior; lateral-nulo e inferior-nulo (véase Ejemplo 21).

La figura 56B es una gráfica que compara la señal T₂ como una función de diversas configuraciones de gMAA rotatorias para variar las exposiciones del campo magnético una muestra una concentración del aglomerante dada. La configuración rotatoria lateral-inferior proveyó la señal T₂ más alta una concentración de aglomerante dada, seguida por la comparación de configuración de placa lateral-inferior. La lateral-nula rotatoria provee señal equivalente a la placa lateral-inferior; y la inferior-nula produce la señal más baja (véase Ejemplo 21).

La figura 57 es una tabla que representa los resultados de T₂MR para 32 especímenes clínicos que indica que catorce especímenes son positivos a *Candida*. La prueba identifica cuatro especímenes que contienen *C. krusei* o *C. glabrata*, siete especímenes que contienen *C. albicans* o *C. tropicalis*, y tres que contienen *C. parapsilosis*. Una línea blanca sólida indica el umbral de decisión (T₂=128 mseg) (véase Ejemplo 22).

Descripción detallada

La invención presenta métodos para la detección rápida de patógenos o ácidos nucleicos diana en una muestra de sangre entera. Los métodos de la invención emplean partículas magnéticas, una unidad de RMN, opcionalmente una o más unidades MAA, opcionalmente una o más estaciones de incubación a diferentes temperaturas, opcionalmente uno o más sistemas de vórtex, opcionalmente una o más centrifugas, opcionalmente una estación de manipulación de fluidos, opcionalmente un sistema robótico y opcionalmente uno o más cartucho modulares. Se

divulga que los sistemas, dispositivos y métodos de la invención pueden ser utilizados para probar una muestra biológica (por ejemplo, sangre, sudor, lágrimas, orina, saliva, semen, suero, plasma, fluido cerebroespinal (CSF), heces, fluidos o tejidos vaginales, esputo, aspirado o frotis nasofaríngeo, fluido lacrimal, frotis mucoso o epitelial (frotis bucal), tejidos, órganos, huesos, dientes o tumores entre otros). Alternativamente, se divulga que los sistemas, dispositivos y métodos se utilizan para monitorizar una condición ambiental (por ejemplo, hormona del crecimiento vegetal, insecticidas, toxinas hechas por el hombre o ambientales, secuencias de ácidos nucleicos que son importantes para la resistencia/susceptibilidad a insectos, algas y subproductos de algas), como parte de un programa de biorremediación, para uso en crianza de plantas o animales, o para identificar riesgos ambientales. De manera similar, se describen los sistemas, dispositivos y métodos para ser usados con el fin de detectar y monitorizar guerra biológica o agentes biológicos de combate, tales como ricino, Salmonella typhimurium, toxina de botulinum, aflatoxinas, micotoxinas, Francisella tularensis, viruela, ántrax, u otros.

Las partículas magnéticas pueden ser recubiertas con una unidad estructural de enlace (esto es, anticuerpo, oligo, etc.) de tal manera que en la presencia de analito, o de un agente de enlace multivalente, se forman agregados. Los agregados hacen disminuir las porciones de la muestra de no uniformidades magnéticas microscópicas que perturban la señal T₂ del solvente, llevando un incremento en la relajación de T₂ (véase figura 3).

La medición de T₂ es una medida sencilla de todas las rotaciones en el conjunto, mediciones que duran típicamente 1-10 segundos, lo que permite que el solvente se desplace cientos de micrones, una distancia larga con respecto a las no uniformidades microscópicas en la muestra líquida. Cada molécula de solvente muestrea un volumen en la muestra líquida y en la señal T₂ es un promedio (señal total neta) de todas las moléculas (rotaciones nucleares) en el solvente en la muestra; en otras palabras, la medición de T₂ es una medición neta del ambiente completo experimentado por una molécula de solvente, y es una medición promedio de todas las no uniformidades microscópicas en la muestra.

La tasa de relajación T₂ observada para las moléculas de solvente en la muestra líquida está dominada por las partículas magnéticas, las cuales en la presencia de un campo magnético forman momentos dipolares magnéticos altos. En la ausencia de partículas magnéticas, las tasas de relajación T₂ observadas para una muestra líquida son típicamente largas (esto es, T₂ (agua) = ~2000 ms, T₂ (sangre) = ~1500 ms). A medida que la concentración de partículas se incrementa, las no uniformidades microscópicas en la muestra se incrementan y la difusión de solvente a través de estas no uniformidades microscópicas lleva a un incremento en la incoherencia de la rotación y a un descenso en el valor T₂. El valor T₂ observado depende de la concentración de partículas en una forma no lineal, y de la capacidad de relajación por parámetro de partícula.

En los ensayos de agregación, el número de partículas magnéticas, y si están presentes el número de las partículas de aglomerante, permanece constante durante el ensayo. La distribución espacial de las partículas cambia cuando las partículas se aglomeran. La agregación cambia la "experiencia" promedio de una molécula de solvente puesto que la localización de la partícula en los aglomerados es promovida más que incluso las distribuciones de partículas. A un alto grado de agregación, muchas moléculas de solvente no experimentan no uniformidades microscópicas creadas por partículas magnéticas y la T₂ se aproxima a la del solvente. A medida que la fracción de partículas magnéticas agregadas se incrementa en una muestra líquida, la T₂ observada es el promedio de la suspensión no uniforme de partículas magnéticas agregadas e individuales (no agregadas). Los ensayos de la invención están diseñados para maximizar el cambio en T₂ sin agregación para incrementar la sensibilidad del ensayo a la presencia de analitos y a diferencias en la concentración de analito.

El diseño de biosensores de conmutación de relajación magnética (MRSw), es importante considerar los mecanismos de relajación de las partículas magnéticas. Primero, en el caso de las partículas superparamagnéticas las capacidades de relajación longitudinales y transversas del solvente (definidas como R₁ = 1/T₁ y R₂ = 1/T₂, respectivamente) son una función del tamaño de partícula. Adicionalmente, R₂ y R₂^{*} (donde R₂^{*} = 1/T₂^{*}, R₂^{*} = R₂ + Δω_F, donde Δω_F es el desfase debido a la deshomogeneidades de campo) se incrementan con el diámetro de partícula hasta aproximadamente 100 nm, y luego R₂ disminuye con el incremento del tamaño de partícula y la R₂^{*} alcanza una meseta para campos uniformes (véase figura 4A). Las partículas superparamagnéticas se dividen típicamente en categorías de partículas magnetizadas fuertemente y partículas magnetizadas débilmente, con base en la magnitud relativa de la diferencia en frecuencia de precesión entre los núcleos y la superficie de la partícula y los núcleos distantes de la partícula, Δω, y el retardo del inter-eco de la secuencia de detección de CPMG, τ_{CP}. Δω es esencialmente una medida relativa del efecto del campo magnético dipolar generado por una partícula superparamagnética sobre la frecuencia resonante de los núcleos de hidrógeno en moléculas de agua adyacentes. Cuando el producto Δωτ_{CP} > 1 entonces las partículas son clasificadas como fuertemente magnetizadas y cuando Δωτ_{CP} < 1 entonces las partículas son clasificadas como débilmente magnetizadas. Para relaxómetros típicos, τ_{CP} no es más corta que decimas de microsegundos, de tal manera que Δω debe ser menor de 10⁵ para las partículas que están dentro del régimen magnetizado débilmente. La mayoría de las partículas superparamagnéticas utilizadas para los ensayos MRSw tienen una superficie de desfase Δω de aproximadamente 1x10⁷, por lo tanto son clasificadas como fuertemente magnetizadas. Esto significa que el retardo inter-eco siempre es más largo que la cantidad de desfase que ocurre en la superficie de una partícula.

Otra característica de las soluciones de partículas superparamagnéticas que se utiliza para diferenciar el comportamiento físico es el tiempo de difusión, o tiempo de viaje, de agua (τ_D) con respecto al tiempo inter-eco de la secuencia de pulsos, τ_{CP} . Las soluciones de partículas están en el límite de eco largo cuando la τ_D es significativamente menor que τ_{CP} . La τ_D puede ser determinada por la relación:

$$\tau_D = \frac{R^2}{D} \quad (1),$$

5 en donde τ_D es el tiempo que toma para una molécula de agua difundirse a través de la distancia del radio partícula, R, y D la constante difusión de agua, 10^{-9} m²/s. τ_D puede ser considerada como el tiempo que toma para que una molécula de agua pase a un hemisferio de una partícula, o un tiempo de vuelo. Cuando τ_D es mucho más grande que τ_{CP} , entonces el sistema de partículas esta dentro del "límite de eco corto". La secuencia CPMG típicas tienen límites de eco del orden de cientos de microsegundos a varios miles segundos. Por lo tanto, el "límite de eco corto" no puede ser aproximado a menos que el diámetro de partícula se aproxime a 1000 nm. Los biosensores de MRSw más comunes están dentro del "límite de eco largo" puesto que la longitud de los retardos inter-eco ($\tau_{CP} > 0.25$ ms) es más larga que el tiempo que toma para una molécula de agua difundirse pasando la hemiesfera de una partícula (0.2 – 100 microsegundos).

15 A medida que el tamaño de partícula de una solución de partículas superparamagnéticas una concentración fija de hierro se incrementa hay un incremento inicial en R_2 , luego una meseta y luego un descenso (figura 4A). El descenso al lado izquierdo de la curva se denomina el régimen de promedio de movimiento, denominándose el régimen en el medio como régimen de desfase estático, y el régimen a la derecha se denomina la visita limitada o régimen de movimiento lento. Las fronteras entre los regímenes de promedio de movimiento y visita limitada pueden ser determinadas generando gráficas tales como la mostrada en la figura 4A, o pueden ser determinadas por la relación entre $\Delta\omega$ y τ_D . Si $\Delta\omega\tau_D < 1$, entonces el sistema está en régimen de promedio de movimiento; si $\Delta\omega\tau_D > 1$, entonces el sistema está en el régimen de visita limitada (también denominado el régimen de movimiento lento). A medida que el diámetro de las partículas se incrementa en el régimen de promedio de movimiento los ecos de reenfoque en la secuencia de pulsos CPMG no pueden reenfoque eficientemente la magnetización que ha sido desfasada por las partículas, por lo tanto el incremento en el R_2 (o descenso en T_2). En otras palabras, los pulsos de reenfoque no pueden compensar el desfase incrementado por las partículas más grandes. La región plana de un régimen de desfase estático es debida al R_2 que está siendo limitado por R_2^* . El R_2 en descenso con diámetro creciente en el régimen de visita limitada da como resultado que los pulsos de reenfoque son capaces de reenfoque el desfase causado por las partículas. También es evidente en la figura 4A que la R_2 en el régimen de movimiento lento exhibe una dependencia del retardo inter-eco de la secuencia de eco de rotación.

En un campo magnético homogéneo, se puede determinar cuál régimen se aplica una muestra comparando R_2 con R_2^* ; los dos valores son idénticos en el régimen de promedio de movimiento o de desfase estático y son diferentes en el régimen de visita limitada. Sin embargo, en casos de campos no homogéneos, tales como los presentes en dispositivos de MR de mesa y portátiles, el T_2^* es dominado por el gradiente de campo. En efecto, el valor de T_2^* medido no es indicativo de la partícula o estado de tamaño de aglomeración de partícula (figura 4B).

La forma de la respuesta a R_2 como partículas aglomeradas coincide en general con la tendencia esperada para el incremento del tamaño de partícula promedio. La similitud entre R_2 de aglomerados de partícula y de partículas esféricas sugiere que se pueden igualar los agregados de partículas y las formas esféricas. Aunque esta suposición puede parecer estar en contradicción con la naturaleza fractal de los aglomerados de partículas, las formas de los aglomerados de partículas observadas por la medición de resonancia magnética están determinada por el conjunto de moléculas de agua en difusión que están en solución, las cuales pueden ser aproximadas por el radio de hidratación medido por dispersión lumínica.

Los modelos analíticos para R_2 pueden ser aplicados a biosensores de relajación magnética para ayudar en el diseño de ensayos de biosensor. De manera conveniente, estos modelos predicen de manera exacta la dependencia de R_2 en parámetros que un diseñador de biosensores puede controlar -concentración de hierro, temperatura, susceptibilidad magnética y tamaño de partícula. Adicionalmente, estos modelos adicionales permiten la modelación predictiva de la dependencia de la relajación de T_2 en estos parámetros. Los resultados no son completamente cuantitativos, pero las tendencias generales y las curvas de respuesta predichas por estos modelos pueden ser instructivas. Un modelo útil es el modelo de intercambio químico para esferas fuertemente magnetizadas:

$$1/T_2 = \frac{(4/9)V\tau_D(\Delta\omega_r)^2}{1 + (4/9)^2(\tau_D/\tau_{CP})^2\alpha^5} \quad (2)$$

$$\alpha = \left[\frac{\Delta\omega\tau_{CP}}{a + b\Delta\omega\tau_{CP}V} \right]^{1/3} \quad (3)$$

en donde $1/T_2$ es la capacidad de relajación transversa, V la fracción de volumen de hierro en solución, τ_D la difusión o tiempo de vuelo, $\Delta\omega_r$ el desplazamiento de frecuencia en la superficie de una partícula con respecto a un volumen de solución, τ_{CP} es la mitad del retardo inter-eco en una secuencia CPMG, y a y b son constantes derivadas ($a=1.34$ y $b=0.99$). Las ecuaciones 2 y 3 pueden ser utilizadas para generar una curva que describe la dependencia de R_2 en los tamaños de partícula, como lo muestran las líneas clara y oscura en las figuras 4A y 4B (línea oscura al lado derecho de la curva; línea clara al lado izquierdo de la curva).

Puede utilizarse una modificación en la ecuación 2 para generar una gráfica que es más intuitiva para un desarrollador de ensayos. Esta gráfica está en términos de T_2 y de diámetro de partícula con unidades lineales en vez de unidades logarítmicas (figura 2). Como se discutió más arriba, los ensayos con biosensor de relajación magnética funcionan debido una transición entre los estados disperso y aglomerado. Para un ensayo de aglomeración dado, la T_2 medida puede seguir uno de los dos caminos en el transcurso de una titulación de un analito. La población de partículas dispersa puede aglomerarse de una manera uniforme llevando un incremento en el tamaño por medio de partícula que es proporcional a la cantidad de analito que ha sido agregada. Este tipo de aglomeración se denomina el modelo monodisperso puesto que llevaría una población intermedia monodispersa de partículas. En este caso, se esperaría que T_2 disminuya a medida que se incrementa el tamaño de partícula en tanto el sistema esté dentro del régimen de promedio de movimiento. A medida que el sistema se aproxima y entra al régimen de visita limitada el T_2 se incrementaría con el tamaño de partícula (véase figura 4C).

Un tipo diferente de aglomeración que puede ocurrir es aquel en el cual la adición de un analito inicia el autoensamblaje de aglomerados, un proceso con energías similares a la formación de cristal o a la agregación fractal. Para este modelo se esperaría un tamaño preferido de aglomerados de partículas que depende de las condiciones de la solución. Los sistemas que siguen este modelo exhibirían poblaciones intermedias polidispersas. Se encontraría una mezcla de partículas con tamaños discretos. Dadas dos poblaciones discretas, partículas dispersadas y partículas aglomeradas, el sistema haría transición entre el valor T_2 de la población monodispersa de inicio de partículas no aglomeradas y el valor T_2 final de las partículas completamente aglomeradas. Para ambos modelos, la titulación puede llevar una solución monodispersa de partículas aglomeradas. Aunque la energética, cinética y termodinámica exactas de la aglomeración de partículas dependerán de las características del sistema de ensayo tales como valencia y afinidad de enlazamiento, estos dos modelos son instructivos en el entendimiento de las dependencias y posibles escenarios que se pueden encontrar durante el diseño de un biosensor por MRSw.

Hay dos regímenes para la aglomeración de partículas y T_2 los afecta con base en el tamaño de partícula (véase figura 4D, la frontera es típicamente cerca de 100 nm de diámetro de partículas). Para cualquier ensayo dado de una muestra líquida el recuento de partículas para partículas magnéticas de tamaño de 250 nm puede ser cercano a 1×10^7 partículas, mientras que para partículas magnéticas con tamaños de 30 nm puede ser cercano a 1×10^{13} . Esto se debe a que las partículas más pequeñas tienen una capacidad de relajación inferior por partícula (para el mismo tipo de material), dando como resultado una desventaja en sensibilidad inherente. En un ensayo típico de la invención, las partículas magnéticas se seleccionan de tal manera que T_2 se incrementa con un incremento en la fracción de partículas agregadas.

El ensayo puede ser diseñado para cambiar la dirección de T_2 en la presencia de analito (véanse figuras 5A-5C). Por ejemplo, el ensayo puede ser un inmunoensayo en sándwich aglomerante en el cual dos poblaciones de partículas magnética se enlazan a diferentes epítomos de un analito (véase figura 5A); un ensayo comparativo en el cual el analito compite con agentes de enlazamiento multivalentes para inhibir la agregación de partículas magnéticas (véase figura 5B); o una aglomeración mediada por hibridación en la cual dos poblaciones de partículas magnéticas se enlazan una primera y segunda porción de un oligonucleótido (véase figura 5C). Un formato competitivo adicional puede incluir cuando dos unidades estructurales de enlazamiento de partículas se enlazan sin aglomerante (por ejemplo, los oligonucleótidos de ADN están diseñados de tal manera que dos nanopartículas tienen dos oligos diferentes y pueden fusionarse entre sí y cuando se calientan el analito o el amplicón o el ADN diana compiten o interrumpen la fusión np).

Pueden utilizarse otros formatos para llevar a cabo los ensayos, tales como: (i) una muestra diana puede ser incubada en la presencia de una partícula magnética que ha sido cubierta con unidades estructurales de enlazamiento específicas para un analito diana y un agente de enlazamiento multivalente, en un ensayo de inhibición el enlazamiento del analito a las partículas magnéticas bloquea la aglomeración de las partículas magnéticas con el agente de enlazamiento multivalente; (ii) una muestra diana puede ser incubada en la presencia de una partícula magnética que ha sido cubierta con unidades estructurales de enlazamiento específicas para un analito diana y un agente de enlazamiento multivalente, en un ensayo de desagregación el analito está expuesto a

- un agregado preformado del agente de enlazamiento multivalente y la partícula magnética y el analito desplaza el agente de enlazamiento multivalente para reducir la agregación en la muestra líquida; o (iii) una muestra diana puede ser incubada en la presencia de una partícula magnética que ha sido cubierta con unidades estructurales de enlazamiento específicas para un analito diana y el analito diana en sí mismo para formar una población sencilla de autoensamblaje de partículas magnéticas, en un ensayo de inhibición o un ensayo de desagregación la presencia del enlazamiento del analito a las partículas magnéticas bloquea la autoaglomeración de las partículas magnéticas; o (iv) una muestra diana puede ser incubada en la presencia de un agente aglomerante soluble y una partícula magnética cubierta con el analito o un análogo del analito, en un ensayo de inhibición la presencia del analito se enlaza al agente de aglomeración soluble que bloquea la aglomeración de las partículas.
- 5
- 10 Cuando se emplea un agente de enlazamiento multivalente (aglomerante), múltiples analitos son enlazados a un portador (por ejemplo, un armazón sintético simple, o una proteína portadora más grande o polisacárido, tal como BSA, transferrina o dextrano).

Partículas magnéticas

- Las partículas magnéticas descritas aquí incluyen las descritas en la Patente de los Estados Unidos No. 7,564,245 y la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2003-0092029. Las partículas magnéticas están generalmente en la forma de conjugados, esto es, una partícula magnética con una o más unidades estructurales de enlazamiento (por ejemplo, un oligonucleótido, ácido nucleico, polipéptido o polisacárido) unidas a la misma. La unidad estructural de enlazamiento produce una interacción específica con un analito diana. La unidad estructural de enlazamiento se enlaza específicamente a un analito diana seleccionado, por ejemplo, un ácido nucleico, polipéptido o polisacárido. En algunos casos, el enlazamiento produce la agregación de los conjugados, dando resultado un cambio, por ejemplo, un descenso (por ejemplo, en el caso de partículas magnéticas más pequeñas) o un incremento (por ejemplo, en el caso de partículas magnéticas más grandes), en el tiempo de relajación giro-giro (T2) de protones de agua adyacentes en una solución acuosa (o protones en un solvente no acuoso). Alternativamente, el analito se enlaza a un agregado preformado en un ensayo de desagregación competitiva (por ejemplo, un agregado formado a partir de un agente de enlazamiento multivalente y partículas magnéticas), o compete con un agente de enlazamiento multivalente para unidades estructurales de enlazamiento sobre las partículas multivalentes en un ensayo de inhibición (esto es, la formación de agregados es inhibida en la presencia del analito).
- 15
- 20
- 25

- Los conjugados tienen alta capacidad de relajamiento obedeciendo al superparamagnetismo de sus materiales de hierro, óxido metálico u otros ferro o ferrimagnéticos. Los compuestos de hierro, cobalto y níquel y sus aleaciones, elementos de tierras raras tales como gadolinio y ciertos intermetálicos tales como oro y vanadio son ferromagnetos que pueden ser utilizados para producir partículas superparamagnéticas. Las partículas magnéticas pueden ser monodispersas (un cristal individual de un material magnético, por ejemplo óxido metálico, tal como óxido de hierro superparamagnético, por partícula magnética) o polidispersos (por ejemplo, una pluralidad de cristales por partícula magnética). El óxido de metal magnético también puede incluir cobalto, magnesio, zinc, o mezclas de estos metales con hierro. Características y elementos importantes de las partículas magnéticas que son útiles para producir conjugados incluyen: (i) una alta capacidad de relajación, esto es, fuerte efecto sobre la relajación del agua (u otro solvente), (ii) un grupo funcional al cual la unidad estructural de enlazamiento puede unirse covalentemente, (iii) un bajo enlazamiento inespecífico de unidades estructurales interactivas a la partícula magnética, y/o (iv) estabilidad en solución, esto es, las partículas magnéticas permanecen suspendidas en solución, no se precipitan y/o las nps retienen su capacidad de ser empleadas en el método descrito (esto es, las nps tienen una vida útil).
- 30
- 35
- 40

- Las partículas magnéticas pueden estar enlazadas a las unidades estructurales de enlazamiento a través de grupos funcionales. En algunas realizaciones, las partículas magnéticas pueden estar asociadas con polímeros que incluyen grupos funcionales seleccionados, en parte, para potenciar la reversibilidad no específica de las partículas magnéticas. El polímero puede ser un polímero sintético, tal como, pero no limitado a, polietilenglicol o silano, polímeros naturales, o derivados de polímeros sintéticos o naturales o una combinación de estos. El polímero puede ser hidrofílico. En algunas realizaciones, el "recubrimiento" polimérico no es una película continua alrededor del óxido metálico magnético sino una "malla" o "nube" de cadenas de polímeros extendidas unidas y circundando el óxido metálico. El polímero puede incluir polisacáridos y derivados, incluyendo dextrano, pulanano, carboxidextrano, carboximetildextrano, y/o carboximetil dextrano reducido. El óxido metálico puede ser una colección de uno o más cristales que entran en contacto uno con otro, o que están atrapados individualmente o rodeados por el polímero.
- 45
- 50

Alternativamente, las partículas magnéticas pueden estar asociadas con composiciones de grupos funcionales no poliméricos. Se describen métodos para sintetizar partículas magnéticas estabilizadas, funcionalizadas sin polímeros asociados, por ejemplo, en Halbreich et al., *Biochimie*, 80:379 (1998).

- Las partículas magnéticas incluyen típicamente mono y policristales de óxidos metálicos de aproximadamente 1-25 nm, por ejemplo, aproximadamente 3-10 nm, o aproximadamente 5 nm de diámetro por cristal. Las partículas magnéticas pueden incluir también un componente polimérico en la forma de un núcleo y/o recubrimiento, por ejemplo, aproximadamente de 5 a 20 nm de espesor o más. Las partículas magnéticas pueden ser preparadas de una variedad de maneras. Se prefiere que la partícula magnética tenga grupos funcionales que enlacen la partícula
- 55

- magnética a la unidad estructural de enlazamiento. Pueden hacerse partículas magnéticas con función carboxi, por ejemplo, de acuerdo con el método de Gorman (véase Publicación PCT No. WO00/61191). En este método, se sintetiza carboximetildextrano (CM) reducido a partir de dextrano comercial. El CM-dextrano y las sales de hierro se mezclan entre sí y luego son neutralizadas con hidróxido de amonio. Las partículas magnéticas con función carboxi
- 5 resultantes pueden ser utilizadas para el acoplamiento de oligonucleótidos con función amino. Las partículas magnéticas con función carboxi también pueden hacerse a partir de partículas magnéticas recubiertas con polisacáridos por reacción con bromo o ácido cloroacético en base fuerte para unir grupos carboxilo. Además, las partículas con función carboxi pueden hacerse a partir de partículas magnéticas con función amino convirtiendo los grupos amino a carboxi mediante el uso de reactivos tales como anhídrido succínico o anhídrido maleico.
- 10 El tamaño de la partícula magnética puede ser controlado ajustando las condiciones de reacción, por ejemplo, utilizando baja temperatura durante la neutralización de sales de hierro con una base tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5,262,176. También pueden hacerse materiales con tamaño de partícula uniforme fraccionando las partículas utilizando centrifugación, ultrafiltración, o filtración por gel, según se describe, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 5,492,814.
- 15 También pueden sintetizarse partículas magnéticas de acuerdo con el método de Molday (Molday, R.S. and D. MacKenzie, "Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells", J. Immunol. Methods, 52:353 (1982)), y tratadas con peryodato para formar grupos aldehído. Las partículas magnéticas que contienen aldehído pueden hacerse reaccionar entonces con una diamina (por ejemplo etilendiamina o hexanodiamina), la cual formará una base de Schiff, seguida por reducción con borohidruro de sodio
- 20 o cianoborohidruro de sodio.
- Las partículas magnéticas recubiertas con dextrano pueden hacerse y entrecruzarse con epiclohidrina. La adición de amoníaco reacciona con grupos epoxi para generar grupos amina, véase Hogemann, D., et al., Improvement of MRI probes to allow efficient detection of gene expression Bioconjug. Chem., 11:941 (2000), y Josephson et al., "High-efficiency intracellular magnetic labeling with novel superparamagnetic-Tat peptide conjugates", Bioconjug. Chem., 10:186 (1999). Este material también es conocido como un óxido de hierro entrecruzado o "CLIO" y cuando se funcionaliza con la amina se denomina como amina-CLIO o NH₂-CLIO. Las partículas magnéticas con función
- 25 carboxi pueden ser convertidas en partículas magnéticas con función amino mediante el uso de carbodiimidas y diaminas solubles en agua tales como etilendiamina o hexanodiamina.
- Las partículas magnéticas pueden formarse a partir de un ferrofluido (esto es, una suspensión coloidal estable de partículas magnéticas). Por ejemplo, la partícula magnética puede ser una composición que incluye múltiples cristales de óxidos metálicos del orden de unos pocos decimos de nanómetros en tamaño y se dispersa en un fluido que contiene un surfactante, el cual se adsorbe sobre las partículas y las estabiliza, o por precipitación, en un medio básico, de una solución de iones metálicos. Ferrofluidos adecuados son vendidos por la compañía Liquids Research Ltd. bajo las referencias WHKS1S9 (A, B o C), la cual es un ferrofluido basado en agua que incluye magnetita (Fe₃O₄), con partículas de 10 nm de diámetro; WHJS1 (A, B o C), la cual es un ferrofluido basado en isoparafina que incluye partículas de magnetita (Fe₃O₄) de 10 nm de diámetro; y dextrano BKS25, el cual es un ferrofluido basado en agua estabilizado con dextrano, que incluye partículas de magnetita (Fe₃O₄) de 9 nm de diámetro. Otros ferrofluidos adecuados para uso en los métodos de la invención son ferrofluidos estabilizados con ácido oleico disponibles de Ademtech, los cuales incluyen cerca de 70% en peso de partículas de α-Fe₂O₃ (cerca de 10 nm de diámetro), 15% en peso de octano y 15% en peso de ácido oleico.
- 30 Las partículas magnéticas son típicamente una composición que incluye múltiples cristales de óxido metálico y una matriz orgánica, y que tienen una superficie cubierta con grupos funcionales (esto es, grupos amino o grupos carboxi) para el enlazamiento de las unidades estructurales de unión a la superficie de la partícula magnética. Por ejemplo, las partículas magnéticas útiles en los métodos de la invención incluyen las que son comercialmente disponibles en Dynal Seradyn, Kisker, Miltenyi Biotec, Chemicell, Anvil, Biopal, Estapor, Genovis, Thermo Fisher Scientific, JSR micro, Invitrogen, y Ademtech, así como las descritas en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,101,435; 4,452,773; 5,204,457; 5,262,176; 5,424,419; 6,165,378; 6,866,838; 7,001,589; y 7,217,457.
- 35 Las partículas magnéticas son típicamente una composición que incluye múltiples cristales de óxido metálico y una matriz orgánica, y que tienen una superficie cubierta con grupos funcionales (esto es, grupos amino o grupos carboxi) para el enlazamiento de las unidades estructurales de unión a la superficie de la partícula magnética. Por ejemplo, las partículas magnéticas útiles en los métodos de la invención incluyen las que son comercialmente disponibles en Dynal Seradyn, Kisker, Miltenyi Biotec, Chemicell, Anvil, Biopal, Estapor, Genovis, Thermo Fisher Scientific, JSR micro, Invitrogen, y Ademtech, así como las descritas en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,101,435; 4,452,773; 5,204,457; 5,262,176; 5,424,419; 6,165,378; 6,866,838; 7,001,589; y 7,217,457.
- 40 La avidina o la estreptavidina pueden ser unidas a partículas magnéticas para uso con una unidad estructural de enlazamiento biotínica, tal como un oligonucleótido o polipéptido (véase, por ejemplo, Shen et al., "Magnetically labeled secretin retains receptor affinity to pancreas acinar cells," Bioconjug. Chem., 7:311 (1996)). De la misma manera, la biotina puede ser unida a una partícula magnética para uso con una unidad estructural de enlazamiento marcada con avidina. Alternativamente, la unidad estructural de enlazamiento está unida covalentemente a la superficie de la partícula magnética; las partículas pueden ser cubiertas con moléculas de IgG; las partículas pueden ser cubiertas con anticuerpos anti his; o las partículas pueden ser cubiertas con FAbs etiquetados con his.
- 45 Los materiales de bajo peso molecular pueden ser separados de las partículas magnéticas por ultrafiltración, diálisis, separación magnética u otros medios antes de su uso. Por ejemplo, las unidades estructurales de enlazamiento sin reaccionar y los agentes de enlazamiento pueden ser separados de las partículas magnéticas conjugadas por separación magnética o cromatografía por exclusión por tamaño. En ciertos casos las partículas magnéticas pueden
- 50 Los materiales de bajo peso molecular pueden ser separados de las partículas magnéticas por ultrafiltración, diálisis, separación magnética u otros medios antes de su uso. Por ejemplo, las unidades estructurales de enlazamiento sin reaccionar y los agentes de enlazamiento pueden ser separados de las partículas magnéticas conjugadas por separación magnética o cromatografía por exclusión por tamaño. En ciertos casos las partículas magnéticas pueden
- 55 Los materiales de bajo peso molecular pueden ser separados de las partículas magnéticas por ultrafiltración, diálisis, separación magnética u otros medios antes de su uso. Por ejemplo, las unidades estructurales de enlazamiento sin reaccionar y los agentes de enlazamiento pueden ser separados de las partículas magnéticas conjugadas por separación magnética o cromatografía por exclusión por tamaño. En ciertos casos las partículas magnéticas pueden

ser fraccionadas por tamaño para producir mezcla de partículas de un rango de tamaño y diámetro promedio particulares.

- 5 Para ciertas disposiciones divulgadas que requieren alta sensibilidad, la detección de un analito utilizando ensayos de relajación de T_2 pueden requerir la selección de una partícula apropiada para permitir una aglomeración inducida por analito suficientemente sensible. Pueden obtenerse sensibilidades más altas utilizando partículas que contienen múltiples núcleos de óxido de hierro superparamagnéticos (5-15 nm de diámetro) dentro de una matriz polimérica más grande individual o un ensamblaje ferrofluido (100 nm-1200 nm de diámetro total, tal como las partículas que tienen un diámetro promedio de 100 nm, 200 nm, 250 nm, 300 nm, 500 nm, 800 nm, o 1000 nm), o utilizando
- 10 materiales o partículas con un momento magnético más alto con densidad más alta, y/o partículas con un contenido de hierro más alto. Sin limitarse por la teoría, se postula que estos tipos de partículas proveen una ganancia de sensibilidad de más de 100x debido a un número mucho más alto de átomos de hierro por partícula, lo que se considera que lleva a un incremento en la sensibilidad debido al número disminuido de partículas presentes en la solución de ensayo y posiblemente una cantidad más alta de hierro superparamagnético afectado por cada evento de aglomeración.
- 15 La capacidad de relajación por partícula y tamaño de partícula es un término útil para seleccionar una partícula óptima para ensayos de alta sensibilidad. Idealmente, este término será tan grande como sea posible. La relajación por partícula es una medida del efecto de cada partícula sobre el valor T_2 medido. Cuanto mayor sea este número, menor es el número de partículas necesarias para provocar una respuesta T_2 . Adicionalmente, la disminución de la concentración de partículas en la solución reactiva puede mejorar la sensibilidad analítica del ensayo. La capacidad de relajación por partícula puede ser un parámetro más útil en cuanto a la densidad del hierro y la capacidad de relajación pueden variar de partícula magnética a partícula magnética, dependiendo de los componentes utilizados para hacer las partículas (véase Tabla 1). La capacidad de relajación por partícula es proporcional a la magnetización por saturación de un material superparamagnético.
- 20

Tabla 1.

Diámetro hidrodinámico (nm)	# de átomos metálicos por partícula	Capacidad de relajación por partícula ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)
10-30	1.0E+03 - 1.0E+06	1.0E+6 - 1.0E+11
10-50	8.0E+02 - 4.0E+04	1.0E+04 - 4.0E+06
10-50	1.0E+04 - 5.0E+05	1.0E+06 - 1.0E+08
50-100	1.0E+04 - 1.0E+07	1.0E+06 - 1.0E+09
100-200	5.0E+06 - 5.0E+07	5.0E+08 - 8.0E+09
200-300	1.0E+07 - 1.0E+08	3.0E+09 - 1.0E+10
300-500	5.0E+07 - 1.0E+09	7.0E+09 - 5.0E+10
500-800	1.0E+08 - 4.1E+09	1.0E+10 - 5.0E+11
800-1000	5.0E+08 - 5.0E+09	5.0E+10 - 5.0E+11
1000-1200	1.0E+09 - 7.0E+09	1.0E+11 - 1.0E+12

25 La partícula base divulgada para uso en los sistemas y métodos puede ser cualquiera de las partículas comercialmente disponibles identificadas en la Tabla 2.

ES 2 576 927 T3

Tabla 2.

Catálogo No.	Fuente/Descripción	Diámetro (µm)
	Kisker	
MAv-1	Poliestireno, Partículas magnéticas recubiertas con Avidina	1.0-1.9
PMSSt-0.6	Poliestireno, Partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina	0.5-0.69
PMSSt-0.7	Poliestireno, Partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina	0.7-0.9
PMSSt-1.0	Poliestireno, Partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina	1.0-1.4
PMB-1	Poliestireno, Partículas biotina covalentemente acoplada a BSA	1.0-1.9
PMP-200	Basado en dextrano, Sin recubrimiento, plano	0.2
PMP-1000	Basado en dextrano, Sin recubrimiento, plano	0.10
PMP-1300	Basado en dextrano, Sin recubrimiento, plano	0.13
PMP-2500	Basado en dextrano, Sin recubrimiento, plano	0.25
PMP-1300	Basado en dextrano, Recubierto con NH ₂ -	0.13
PMN-2500	Basado en dextrano, Recubierto con HN ₂ -	0.25
PMC-1000	Basado en dextrano, Recubierto con COOH-	0.10
PMC-1300	Basado en dextrano, Recubierto con COOH-	0.13
PMC-2500	Basado en dextrano, Recubierto con COOH-	0.25
PMAV-1300	Basado en dextrano, Recubierto con avidina	0.13
PMAV-2500	Basado en dextrano, Recubierto con avidina	0.25
PMSA-1000	Basado en dextrano, Estreptococo cubierto con avidina	0.1
PMSA-1300	Basado en dextrano, Estreptococo cubierto con avidina	0.13
PMSA-2500	Basado en dextrano, Estreptococo cubierto con avidina	0.25
PMB-1000	Basado en dextrano, Recubierto con biotina	0.1
PMB-1300	Basado en dextrano, Recubierto con biotina	0.13
PMB-2500	Basado en dextrano, Recubierto con biotina	0.25
PMPA-1000	Basado en dextrano, Recubierto con Proteína	0.1

ES 2 576 927 T3

	A	
PMPA-1300	Basado en dextrano, Recubierto con Proteína A	0.13
PMPA-2500	Basado en dextrano, Recubierto con Proteína A	0.25
	Kisker	
PMC-0.1	Basado en dextrano, Funcionalizado con COOH	0.1-0.4
PMC-0.4	Basado en dextrano, Funcionalizado con COOH	0.4-0.7
PMC-0.7	Basado en dextrano, Funcionalizado con COOH	0.7-0.9
PMC-1.0	Basado en dextrano, Funcionalizado con COOH	1.0-1.4
PMN-1.0	Basado en dextrano, Funcionalizado con NH ₂	1.0-1.4
PMC-0.1	Basado en dextrano, Funcionalizado con COOH	0.1-0.4
	Exactitud química	
ADM01020	Funcionalidad carboxilo	0.2
ADM01030	Funcionalidad carboxilo	0.3
ADM02020	Funcionalidad carboxilo	0.2
ADM02133	funcionalidad carboxilo alta	0.3
ADM02150	Funcionalidad carboxilo	0.5
ADM02220	funcionalidad amino muy alta	0.2
ADM02230	funcionalidad amino muy alta	0.3
ADM02250	Funcionalidad carboxilo	0.5
ADM02030	funcionalidad carboxilo alta	0.3
ADM02110	funcionalidad carboxilo alta	0.1
ADM02120	funcionalidad carboxilo muy alta	0.2
ADM02130	funcionalidad carboxilo muy alta	0.3
ADM02252	Funcionalidad carboxilo	0.5
ADM03120	Funcionalidad estreptavidina	0.2
ADM03121	Funcionalidad estreptavidina	0.2

ES 2 576 927 T3

	quimiocelda	
1201-5 1	Si-(CH ₂) ₃ -COOH	0.5
1201-5 1	Si-(CH ₂) ₃ -COOH	0.75
1201-5 1	Si-(CH ₂) ₃ -COOH	1.0
1202-5 1	Si-(CH ₂) ₃ -SO ₃ H	0.5
	Kisker	
1202-5 1	Si-(CH ₂) ₃ -SO ₃ H	0.75
1202-5 1	Si-(CH ₂) ₃ -SO ₃ H	1.0
1205-1	Si-(CH ₂) ₃ -PO ₃ H ₂	0.5
1205-1	Si-(CH ₂) ₃ -PO ₃ H ₂	0.75
1205-1	Si-(CH ₂) ₃ -PO ₃ H ₂	1.0
	Estapor	
M1-130/12	Poliestireno carboxilado	0.7-1.3
M1-180/12	Poliestireno carboxilado	0.9-1.3
M-180/20	Carboxilado Divinilbenceno	0.8-1.2
M-050/20	Poliestireno carboxilado	0.5-0.7
M-070/40	Poliestireno carboxilado	0.7-1.3
M-070/60	Poliestireno carboxilado	0.7-1.3
M-020/50	Poliestireno carboxilado	0.16-0.24
M-030/40	Poliestireno carboxilado	0.3-0.5
	Genovis	
AMI-25	Dextrano	80-150
	Thermo Fisher	
4515-2105	Modificado con carboxilato (MG-CM)	1.0
7815-2104	NeutrAvidina (MG-NA)	1.0
5915-2104	Etreptavidina (MG-SA)	1.0
2415-2105	Modificado con carboxilato (MG-CM)	1.0
4415-2105	Modificado con carboxilato (MG-CM)	1.0
	JSR micro	

MB 100	Carboxilado	1.1
	Invitrogen	
354-01	Carboxilado	1
355-00	Activado con tosilo	1
Catálogo No.	Fuente/Descripción	Diámetro (µm)
	Kisker	
650-11	Carboxilado	1
655-11	Activado con tosilo	1
	Biopal	
M02Q05	Activado con amino	1.5
M02Q05	Activado con biotina	1.5
M02Q05	Activado con estreptavidina	1.5

5 Se divulga que las partículas magnéticas para uso en los sistemas y métodos de la invención pueden tener un diámetro hidrodinámico de 10 nm a 1200 nm, y contener un promedio de $8 \times 10^2 - 1 \times 10^{10}$ átomos metálicos por partícula, y tener una capacidad de relajación por partícula de $1 \times 10^4 - 1 \times 10^{13} \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Las partículas magnéticas usadas en los sistemas y métodos divulgados pueden ser cualquiera de los diseños, composiciones o fuentes descritas más arriba, y pueden ser modificadas tal como se ha descrito aquí para uso como un conmutador de resonancia magnética.

Además de la capacidad de relajación por partícula, deben abordarse otros varios problemas prácticos en la selección y diseño de partículas magnéticas para ensayos de alta sensibilidad analítica.

10 Por ejemplo, el uso de partículas grandes (esto es, 1000 nm o mayores) puede ser deseado para maximizar el contenido de hierro y la capacidad de relajación por partícula. Sin embargo, hemos observado que las partículas de este tamaño tienden a depositarse rápidamente desde la solución. Hemos observado que el asentamiento de las partículas no interfiere típicamente con el ensayo si se mantienen los tamaños de partícula magnética por debajo de 500 nm. Cuando el uso de una partícula por encima de 500 nm en los ensayos descritos o se emplean partículas más pequeñas con alta densidad, el asentamiento se monitoriza y se determina el efecto sobre la medición de T_2 .
 15 Hemos encontrado que un tamaño de partícula magnética de aproximadamente 100-300 nm es ideal para la estabilidad en términos de asentamiento, incluso después de la funcionalización (incrementando el diámetro hidrodinámico a 300 nm en aproximadamente 50 nm), y para permitir la alta sensibilidad potenciada por una alta capacidad de relajación por partícula. La densidad de la partícula juega ciertamente un papel en la resistencia. Como tal, la densidad relativa de la solución y las partículas juega un papel importante en el asentamiento de la partícula. De acuerdo con lo anterior, una posible solución a este problema es el uso de partículas magnéticas resistente (esto es, una partícula hueca o una partícula que contiene tanto una matriz de baja densidad como un óxido metálico de alta densidad). El asentamiento puede afectar la detección de T_2 , así, pueden emplearse aditivos en solución para cambiar la relación de la partícula a la densidad de la solución. La detección de T_2 puede ser
 20 impactada por el asentamiento si hay un porcionamiento significativo del material superparamagnético a partir del volumen medido de líquido. El asentamiento puede ser establecido diluyendo las partículas una concentración tal que la absorbancia UV-Vis a 410 nm está entre 0.6-0.8 unidades de absorbancia y luego monitorizando la absorbancia durante 90 minutos. Si ocurre el asentamiento, la diferencia entre las absorbancias inicial y final dividida por la absorbancia inicial será mayor de 5%. Si el % de asentamiento está por encima de 5% entonces la partícula típicamente no es adecuada para uso en ensayos que requieran alta sensibilidad analítica. Las partículas magnéticas usadas en los ensayos de la invención pueden ser, pero no se limitan a, partículas magnéticas que no se asientan. Un alto asentamiento representa dificultades de manipulación y puede llevar a problemas de reproducibilidad.

35 Para partículas magnéticas del orden de 100 nm o mayores, los múltiples cristales de óxido de hierro superparamagnético que incluyen típicamente el núcleo de la partícula dan como resultado un momento dipolar neto

cuando están en la presencia de campos magnéticos externos, esto es, el momento dipolar es una fuerza suficiente para superar el movimiento Browniano. La reversibilidad no específica es una medida de la estabilidad coloidal y de la robustez contra agregación no específica. La reversibilidad no específica es establecida midiendo los valores T_2 de una solución de partículas antes y después de la incubación en un campo magnético uniforme (definido como <5000 ppm). Los valores T_2 de inicio son típicamente 200 ms para una partícula con una concentración de Fe de 0.01 mM. Si la diferencia en los valores de T_2 después y antes de la incubación en el campo magnético uniforme es menor de 20 ms, las muestras se consideran reversibles. Adicionalmente, 10% es un umbral que permite que las mediciones de partida de T_2 reflejen la concentración de las partículas del ensayo. Si la diferencia es mayor de 10%, entonces las partículas exhiben irreversibilidad en el regulador, diluyentes y matriz probados. La reversibilidad de MMA de las partículas magnéticas puede ser alterada como se describe aquí. Por ejemplo, la estabilidad coloidal y la robustez contra la agregación no específica pueden ser influenciadas por las características de superficie de las partículas, las unidades estructurales de enlazamiento, el regulador de ensayo, la matriz y las condiciones de procesamiento del ensayo. El mantenimiento de la estabilidad coloidal y la resistencia al enlazamiento no específico pueden ser alterados por química de conjugación, métodos de bloqueo, modificaciones de regulador y/o cambios en las condiciones de procesamiento del ensayo.

Hemos observado que un atributo muy importante para ensayos robustos y reproducibles es la monodispersidad en la distribución de tamaño de las partículas magnéticas usadas, una distinción observada en partículas polidispersas después del recubrimiento contra partículas monodispersas antes del recubrimiento. Los lotes polidispersos de partículas magnéticas pueden carecer de reproducibilidad y comprometer la sensibilidad. Las muestras polidispersas también pueden presentar problemas en términos de alcanzar recubrimientos uniformes. Para ciertos ensayos altamente sensibles es deseable que las partículas magnéticas sean sustancialmente monodispersas en distribución de tamaño (esto es, que tengan un índice de polidispersidad de menos de aproximadamente 0.8-0.9). Alternativamente, los ensayos pueden ser diseñados para acomodar el uso de partículas magnéticas polidispersas.

Dado que los ensayos requieren una monitorización de un desplazamiento en los estados de aglomeración de los ensayos de aglomeración y que la medición de un cambio en la aglomeración requiere probablemente una fracción significativa de partículas aglomeradas (por ejemplo, considerado como >1-10%), el número total de partículas en un ensayo debe minimizarse para permitir la más alta sensibilidad. Sin embargo, debe estar presente un número suficiente de partículas para permitir la utilización del rango dinámico de detección de T_2 . Hemos encontrado que la mayor sensibilidad se observa cuando el número de partículas magnéticas (o su equivalente molar) es aproximadamente del mismo orden de magnitud que el número (o equivalente molar) del analito que está siendo detectado, y la magnitud del número (o su equivalente molar) de agentes de enlazamiento multivalentes empleados (esto, en un ensayo de inhibición).

Para muestras proteínicas también puede requerirse modificar la superficie de la partícula magnética para reducir el enlazamiento no específico de proteínas de fondo a las partículas magnéticas. El enlazamiento no específico de partículas de fondo a las partículas puede inducir o impedir la aglomeración de las partículas, dando como resultado señales falsas y/o carencia falsa de señales. Por ejemplo, en algunos casos la superficie de la partícula magnética puede incluir agentes de bloqueo enlazados covalentemente a la superficie de la partícula magnética lo cual reduce el enlazamiento no específico de las proteínas de fondo. Hay una variedad de agentes que se podían utilizar para alcanzar el efecto deseado, y en algunos casos, es una combinación de agentes que es óptima (véase Tabla 3; partículas, recubrimiento y unidades estructurales de enlazamiento apropiados).

Tabla 3.

Partícula base	Recubrimiento	Unidad estructural de enlazamiento
NP-COOH:	Aminodextrano	Molécula pequeña
	Transferrina	
	Lisozima	
	BSA	
	FSG	
	BGG	
	Ovalbúmina	

	Amino PEG	
	Albúmina humana	
	Ninguno	Anticuerpo
	Amino PEG	
	BSA	
	Aminodextrano	
NP-amino:	Ninguno	Molécula pequeña
	PEG	
NP-SA:	Ninguno	Ab biotinilado
	Amino PEG biotinilado	Anticuerpo
NP-SA:	Amino PEG biotinilado	Molécula pequeña
NP-antiespecie:	Ninguno	Anticuerpo
NP-Ni:	Ninguno	Anticuerpo etiquetado con his

5 Así como hemos encontrado que un bloque de proteína puede ser requerido para alcanzar actividad y sensibilidad en el ensayo, particularmente en muestras proteínicas (por ejemplo, muestras de plasma o muestras de sangre entera), que es compatible con los resultados en muestras de regulador no proteínicas. Algunos bloqueadores de proteína usados comúnmente que pueden ser utilizados en las preparaciones provistas incluyen, por ejemplo, albúmina de suero bovino (BSA), gelatina de piel de pez (FSG), gammaglobulina bovina (BGG), lisozima, caseína, peptidasa y leche en polvo no grasa. En ciertas realizaciones un recubrimiento de partícula magnética incluye BSA o FSG. En otras realizaciones, una combinación de recubrimiento son combinaciones de aquellos recubrimientos de ejemplo que aparecen en la lista de la Tabla 3.

10 Adicionalmente, el enlazamiento no específico puede deberse a lípidos u otras moléculas no proteínicas en la muestra biológica. Para enlazamiento no específico mediado por elementos no proteínicos, pueden seleccionarse cambios en pH y en la fuerza iónica del regulador para potenciar las fuerzas repulsivas de las partículas, pero no suficiente para limitar los resultados de las interacciones buscadas.

Reactivos de ensayo

15 Los ensayos de la invención pueden incluir reactivos para reducir el enlazamiento no específico a las partículas magnéticas. Por ejemplo, el ensayo puede incluir una o mas proteínas (por ejemplo, albúmina, gelatina de piel de pez, lisozima o transferrina); aminos de bajo peso molecular (<500 daltons) (por ejemplo, aminoácidos, glicina, etilamina o mercaptoetanol amina); y/o agentes con superficie activa no iónicos solubles en agua (por ejemplo, polietilenglicol, Tween® 20, Tween® 80, Pluronic® o Igepal®) (véase Tabla 4).

20 Tabla 4.

Agentes bloqueadores
PEG
BSA- Albúmina de suero bovino

Agentes bloqueadores
HSA-Albúmina de suero humano
FSG- Gelatina de piel de pez
Lisozima
Transferrina
Glicina u otras moléculas que contienen aminas pequeñas
Etilamina
Mercaptoetanol amina
Tween 20
Tween 80
Pluronic
Igepal
Triton X-100
Otros surfactantes/detergentes

- El surfactante puede ser seleccionado de una amplia variedad de agentes con actividad superficial no iónicos solubles incluyendo surfactantes que están disponibles comercialmente en general bajo el nombre comercial IGEPAL de GAF Company. Los surfactantes no iónicos líquidos IGEPAL son compuestos de polietilenglicol p-
 5 isooctilfenil éter que están disponibles en diversas designaciones de peso molecular por ejemplo IGEPAL CA720, IGEPAL CA630, e IGEPAL CA890. Otros surfactantes no iónicos adecuados incluyen los disponibles bajo el nombre comercial TETRONIC 909 de BASF Wyandotte Corporation. Este material es un copolímero de bloque tetrafuncional surfactante que termina en grupos hidroxilo primarios. Surfactantes no iónicos adecuados también están disponibles
 10 bajo el nombre comercial VISTA ALPHONIC de Vista Chemical Company y tales materiales son etoxilados que son biodegradables no iónicos derivados de mezclas de alcoholes primarios lineales de diversos pesos moleculares. El surfactante también puede ser seleccionado de poloxámeros, tales como copolímeros de bloque de polioxietileno-polioxipropileno, tales como los disponibles bajo los nombres comerciales Synperonic PE series (ICI), Pluronic® series (BASF), Supronic, Monolan, Pluracare y Plurodac, surfactantes de polisorbato, tales como Tween® 20 (sorbitan monolaurato PEG-20), y glicoles tales como etilenglicol y polietilenglicol.
- 15 Tales surfactantes no iónicos pueden ser seleccionados para proveer una cantidad apropiada de detergencia para un ensayo sin tener un efecto nocivo sobre las reacciones del ensayo. En particular, los surfactantes pueden ser incluidos en una mezcla de reacción con el propósito de suprimir interacciones no específicas entre diversos ingredientes de los ensayos de agregación. Los surfactantes no iónicos se agregan típicamente a la muestra líquida antes en una cantidad que va de 0.01% (p/p) a 5% (p/p).
- 20 Los surfactantes no iónicos pueden ser usados en combinación con una o más proteínas (por ejemplo, albúmina, gelatina de piel de pez, lisozima o transferrina) agregados también a la muestra líquida antes en una cantidad que va de 0.01% (p/p) a 5% (p/p).
- Adicionalmente, los ensayos, métodos y unidades de cartucho pueden incluir componentes reguladores adecuados adicionales (por ejemplo, base Tris, seleccionada para proveer un pH de aproximadamente 7.8 a 8.2 en el medio de
 25 reacción); y agentes quelantes para consumir cationes (por ejemplo, EDTA disodio, ácido etilen diamino tetraacético (EDTA), ácido cítrico, ácido tartárico, ácido glucurónico, ácido sacárico o sales adecuadas de los mismos.

Unidades estructurales de enlazamiento

En general, una unidad estructural de enlazamiento es una molécula, sintética o natural, que se enlaza

específicamente o se une de alguna otra manera, por ejemplo, una molécula diana, covalente o no covalentemente, o se hibridiza con ella, o con otra unidad estructural (o, en ciertas realizaciones, con una molécula que induce la agregación). Por ejemplo, la unidad estructural de enlazamiento puede ser un anticuerpo dirigido hacia un antígeno o una interacción proteína-proteína. Alternativamente, la unidad estructural de enlazamiento puede ser un polisacárido que se enlaza a una diana correspondiente o a un oligonucleótido sintético que hibrida a un ácido nucleico diana complementario específico. En ciertas realizaciones, las unidades estructurales de enlazamiento pueden ser diseñadas o seleccionadas para servir, cuando se unen a otra unidad estructural de enlazamiento, como sustratos para una molécula diana tal como una enzima en solución.

Las unidades estructurales de enlazamiento incluyen, por ejemplo, unidades estructurales de enlazamiento de oligonucleótidos (ADN, ARN, o sustitutos de nucleótidos sustituidos o derivados), unidades estructurales de enlazamiento a polipéptidos, unidades estructurales de enlazamiento a anticuerpos, aptámeros, y unidades estructurales de enlazamiento a polisacáridos.

Unidades estructurales oligonucleótido de enlazamiento

En ciertas realizaciones, las unidades estructurales oligonucleótidos, unidos/enlazados a las partículas magnéticas utilizando cualquiera de una variedad de químicas, mediante un enlace sencillo, por ejemplo, covalente, por ejemplo en el extremo 3' o 5' de un grupo funcional sobre la partícula magnética. Tales unidades estructurales de enlazamiento pueden ser utilizadas en los sistemas, dispositivos y métodos para detectar mutaciones (por ejemplo, SNPs, translocaciones, eliminaciones grandes, eliminaciones pequeñas, inserciones, sustituciones) o para monitorizar la expresión genética (por ejemplo, la presencia de expresión, o cambios en el nivel de la expresión genética, monitorización de transcripción de ARN), o análisis CHP característico de la presencia de un patógeno, estado de enfermedad, o la progresión de una enfermedad.

Una unidad estructural de enlazamiento oligonucleótidos puede ser construida utilizando síntesis química. Una unidad estructural de enlazamiento ADN de doble cadena puede ser construida mediante reacciones de ligazón enzimática utilizando procedimientos conocidos en el arte. Por ejemplo, un ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido) puede ser sintetizado químicamente utilizando nucleótidos de origen natural o nucleótidos modificados de manera diversa diseñados para incrementar la estabilidad biológica de las moléculas o para incrementar la estabilidad física del dúplex formado entre las cadenas complementarias, por ejemplo, se pueden usar derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. El ácido nucleico también puede ser producido biológicamente utilizando un vector de expresión en el cual ha sido subclonado un ácido nucleico.

Un método utiliza al menos dos poblaciones de partículas magnéticas de oligonucleótidos, cada una con fuertes efectos sobre la relajación del agua (u otros solventes). A medida que los conjugados de oligonucleótido-partícula magnética reaccionan con un oligonucleótido diana, forman agregados (por ejemplo, agregados de partículas magnéticas). Por reposo prolongado, por ejemplo, durante la noche a temperatura ambiente, los agregados forman aglomeraciones grandes (aglomeraciones de tamaño de micrones). Usando los métodos, la formación de aglomeraciones grandes puede lograrse más rápidamente empleando ciclos múltiples de aglomeración asistida magnética. La resonancia magnética se utiliza para determinar las propiedades de relajación del solvente, las cuales se alteran cuando la mezcla de oligonucleótidos magnéticos-partículas magnéticas reacciona con un ácido nucleico diana para formar agregados.

Ciertas realizaciones emplean una mezcla de al menos dos tipos de partículas magnéticas de óxido metálico magnético, cada una con una secuencia específica de oligonucleótido, y cada una con más de una copia del oligonucleótido unido, por ejemplo, por vía covalente, por partícula magnética. Por ejemplo, el protocolo del ensayo puede involucrar preparar una mezcla de poblaciones de conjugados de oligonucleótidos-partícula magnética y hacer reaccionar la mezcla con ácido nucleico diana. Alternativamente, los conjugados de nucleótido-partícula magnética pueden hacerse reaccionar con la diana en una forma secuencial. Ciertas realizaciones presentan el uso de resonancia magnética para detectar la reacción de los conjugados de oligonucleótidos-partícula magnética con el ácido nucleico objetivo. Cuando está presente una diana, los conjugados dispersos se autoensamblan para formar pequeños agregados.

Por ejemplo, las unidades estructurales de enlazamiento oligonucleótidos pueden enlazarse al óxido metálico a través de unión covalente a un polímero funcionalizado o a óxidos metálicos funcionalizados en superficie no poliméricos. En este último método, las partículas magnéticas pueden ser sintetizadas de acuerdo con el método de Albrecht et al., *Biochimie*, 80:379 (1998). El ácido dimercaptosuccínico es acoplado al óxido de hierro y provee un grupo funcional carboxilo.

En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos se unen a partículas magnéticas a través de un polímero funcionalizado asociado con el óxido metálico. En algunas realizaciones, el polímero es hidrofílico. En ciertas realizaciones, los conjugados se hacen utilizando oligonucleótidos que tienen grupos amino, sulfihidrido o fosfato terminal, y partículas magnéticas de óxido de hierro superparamagnéticas que portan grupos amino o carboxi sobre un polímero hidrofílico. Hay varios métodos para sintetizar partículas magnéticas derivadas con carboxi y amino.

En una realización, los oligonucleótidos se unen una partícula a través de interacción de enlazamiento ligando-proteína, tal como biotina-estreptavidina, en donde el ligando es unido covalentemente al oligonucleótido y la proteína a la partícula, o viceversa. Esta metodología puede permitir una preparación de reactivo más rápida.

5 Pueden usarse otras formas de oligonucleótidos. Por ejemplo, los aptámeros son oligonucleótidos de ARN o ADN de cadena sencilla de 15 a 16 bases de longitud que en solución forman interacciones intramoleculares que pliegan la molécula de ácido nucleico lineal en un complejo tridimensional que puede enlazarse con alta afinidad a dianas moleculares específicas; frecuentemente con constantes de equilibrio en el rango de 1 pM a 1 nM, lo cual es similar a algunas interacciones anticuerpos-antígenos monoclonales. Los aptámeros pueden enlazarse específicamente a otras moléculas de ácidos nucleicos, proteínas, compuestos orgánicos pequeños, moléculas pequeñas y células (organismos o patógenos).

Unidades estructurales de enlazamiento polipéptidos

15 En ciertas realizaciones, la unidad estructural es un polipéptido (esto es, una proteína, polipéptido o péptido), unida, utilizando una variedad de químicas, mediante un enlace covalente sencillo de tal manera que no afectan la actividad biológica del polipéptido. En una realización, la unión se hace a través del grupo tiol del residuo de cisteína reactivo sencillo colocado de tal manera que su modificación no afecta la actividad biológica del polipéptido. En este aspecto el uso de polipéptidos lineales, con cisteína en el extremo C-terminal o N-terminal provee un tiol sencillo de una manera similar a la cual el alcanotiol suministra un grupo tiol en el extremo 3' o 5' de un oligonucleótido. Pueden utilizarse reactivos de conjugación bifuncionales similares, tales como SPDP y hacerlos reaccionar con el grupo amino de la partículas magnética y el grupo tiol del polipéptido, con cualquier unidad estructural que porta tiol. Los tipos de polipéptidos utilizados como unidades estructurales de enlazamiento pueden ser anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, y secuencias de polipéptidos naturales y sintéticas. Las unidades estructurales de enlazamiento de péptidos tienen un patrón de enlazamiento, esto es, una molécula a la cual se enlazan selectivamente.

25 El uso de péptidos como unidades estructurales de enlazamiento ofrece varias ventajas. El uso de péptidos como unidades estructurales de enlazamiento ofrece varias ventajas. Por ejemplo, los polipéptidos pueden ser manipulados para tener residuos reactivos únicamente, distales de los residuos requeridos para la actividad biológica, para unión a la partícula magnética. El residuo reactivo puede ser una tiolcisteína, un grupo amino N-terminal, un grupo carboxilo C-terminal o un grupo carboxilo de aspartato o glutamato, etc. Un residuo reactivo individual sobre el péptido se utiliza para asegurar un sitio único de unión. Estos principios de diseño pueden ser seguidos con péptidos sintetizados químicamente o polipéptidos producidos biológicamente. Las unidades estructurales de enlazamiento también pueden contener secuencias y aminoácidos a partir de polipéptidos o proteínas de origen natural (tipo silvestre). Por ejemplo, el polipéptido natural puede ser una hormona (por ejemplo, una citoquina, un factor de crecimiento), una proteína de suero, una proteína viral (por ejemplo, hemoaglutinina), una proteína de matriz extracelular, una lectina o uno ectodominio de una proteína de superficie celular. Otro ejemplo es una proteína de enlazamiento a ligando, tal como estreptavidina o avidina que enlazan la biotina. En general, la unidad estructural de enlazamiento-partícula magnética resultante se utiliza para medir la presencia de analitos en el medio de prueba que reacciona con la unidad estructural de enlazamiento.

40 Adicionalmente, una unidad estructural de enlazamiento polipéptido puede ser utilizada en una configuración de reactivo universal, en donde la diana de la unidad estructural de enlazamiento (por ejemplo molécula pequeña, ligando o asociado de enlazamiento) es preunida al analito diana para crear un analito marcado que, en la presencia de las partículas cubiertas de polipéptido, induce la aglomeración.

45 Ejemplos de hormonas proteínicas que pueden ser utilizadas como unidades estructurales de enlazamiento incluyen, sin limitación, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que enlaza el receptor PDGF; factor de crecimiento I y II (Igf) similar a insulina, el cual enlaza el receptor Igf; factor de crecimiento de nervios (NGF), el cual enlaza el receptor NGF; factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el cual enlaza el receptor FGF (por ejemplo un aFGF y bFGF); factor de crecimiento epidérmico (EGF) el cual enlaza el receptor EGF; factor de crecimiento de transformación (TGF, por ejemplo, TGF- α , TGF- β), el cual enlaza el receptor TGF; eritropoyetina, el cual enlaza el receptor de eritropoyetina; hormona de crecimiento (por ejemplo, hormona de crecimiento humana), la cual enlaza al receptor de hormona de crecimiento; y proinsulina, insulina, insulina de cadena A e insulina de cadena B, todas las cuales enlazan al receptor de insulina.

50 Las unidades estructurales de enlazamiento receptoras son útiles para detectar y generar imágenes de la aglomeración del receptor sobre la superficie de una célula. Los ectodominios útiles incluyen los de la proteína Notch, proteína Delta, integrinas, cadherinas, y otras moléculas de adhesión celular.

Unidades estructurales de enlazamiento anticuerpos

55 Otras unidades estructurales de enlazamiento polipéptidos incluyen unidades estructurales de enlazamiento de inmunoglobulina que incluyen al menos un dominio de inmunoglobulina, y típicamente al menos dos de tales

dominios. Un "dominio de inmunoglobulinas" se refiere a un dominio de una molécula de anticuerpo como por ejemplo, un dominio variable o constante. Un "dominio de superfamilia de inmunoglobulinas" se refiere a un dominio que tiene tres estructuras tridimensionales relacionadas con un dominio de inmunoglobulina, pero es una molécula que no es inmunoglobulina. Los dominios de inmunoglobulina y los dominios de superfamilia de inmunoglobulina incluyen típicamente dos láminas β formadas de alrededor de siete cadenas β , y un puente de disulfuro conservado (véase, por ejemplo Williams and Barclay Ann. Rev Immunol., 6:381 (1988)). Las proteínas que incluyen los dominios de las superfamilias Ig incluyen receptores de célula T, CD4, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), y molécula de adhesión intercelular (ICAM).

Un tipo de unidad estructural de enlazamiento de inmunoglobulina es un anticuerpo. El término "anticuerpo", tal como se utiliza aquí se refiere una molécula de inmunoglobulina de longitud completa de dos cadenas y una porción de enlazamiento al antígeno y fragmentos de la misma, que incluye variantes sintéticas. Un anticuerpo típico incluye dos regiones de cadena variable pesada (H) (abreviadas aquí como VH), y dos regiones variables de cadena liviana (L) (abreviadas aquí como VL). Las regiones VH y VL pueden ser subdivididas adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones de determinación de complementareidad" (CDR), intercaladas con regiones que son más conservadas, denominadas "regiones marco" (FR). La extensión de la región marco y de los CDR ha sido definida con precisión (véase, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, y Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). Cada VH y VL está compuesto de tres CDR y cuatro FR, dispuestos desde el terminal amino a terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4.

Un anticuerpo también puede incluir una región constante como parte de una cadena liviana o pesada. Las cadenas livianas pueden incluir un gen de región constante kappa o lambda en el término COOH (denominado CL). Las cadenas pesadas pueden incluir, por ejemplo, una región constante gamma (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4; que codifican aproximadamente 330 aminoácidos). Una región constante gamma puede incluir, por ejemplo, CH1, CH2, y CH3. El término "anticuerpo de longitud completa" se refiere una proteína que incluye un polipéptido que incluye VL y CL, y un segundo polipéptido que incluye VH, CH1, CH2, y CH3.

El término "fragmento de enlazamiento a antígeno" de un anticuerpo, tal como se utiliza aquí, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo de longitud completa que retiene la capacidad de enlazarse específicamente una diana. Ejemplos de fragmentos de enlazamiento a antígeno incluyen pero no se limitan a: (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente consistente de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab enlazados mediante un puente de disulfuro en la región bisagra; (iii) y el fragmento Fv que consiste de los dominios de VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste de los dominio VL y VH de un brazo sencillo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., Nature 341:544 (1989)), que consiste de un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementareidad aislada (CDR). Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH son codificados por genes separados, pueden ser unidos, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazante sintético que les permite constituirse como una cadena de proteína sencilla en la cual las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como cadena sencilla Fv (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al., Science 242:423 (1988); y Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879 (1988)). Tales anticuerpos de cadena sencilla también son abarcados dentro del término "fragmento de enlazamiento antígeno".

Un anticuerpo de dominio sencillo (sdAb, nanocuerpo) es un fragmento anticuerpo que consiste de un dominio anticuerpo variable monomérico sencillo, y puede también ser utilizado en los métodos de la invención. Al igual que un anticuerpo completo, los sdAbs son capaces de enlazarse selectivamente a un antígeno específico. Con un peso molecular de solamente 12-15 kDa, los anticuerpos de dominio sencillo son mucho más pequeños que los anticuerpos comunes (150-160 kDa) los cuales están compuestos de dos cadenas de proteína pesada y dos cadenas livianas, e incluso más pequeñas que los fragmentos Fab (~50 kDa, una cadena liviana y la mitad de una cadena pesada) y fragmentos variables de cadena sencilla (~25 kDa, dos dominios variables, uno de una cadena liviana y uno de una cadena pesada).

Unidades estructurales de enlazamiento de polisacáridos

En ciertas realizaciones, la unidad estructural de enlazamiento es un polisacárido, enlazado, por ejemplo, utilizando cualquiera de una variedad de químicas, mediante un enlace sencillo, por ejemplo un enlace covalente, en uno de los dos extremos, a un grupo funcional sobre la partícula magnética. Los polisacáridos pueden ser sintéticos o naturales. Pueden utilizarse mono, di, tri y polisacáridos como unidad estructural de enlazamiento. Estos incluyen, por ejemplo, glicósidos, N-glicosilaminas, derivados de O-acilo, derivados de O-metilo, osazonas, alcoholes azúcares, ácidos azúcares, fosfatos azúcares, cuando se utilizan con la química a la partícula magnética.

Un método para lograr el enlazamiento es acoplar avidina a una partícula magnética y hacer reaccionar la avidina-partícula magnética con polisacáridos biotinilados comercialmente disponibles, para producir conjugados de polisacáridos-partícula magnética. Por ejemplo, los polisacáridos basados en sialilo de Lewis están disponibles comercialmente como reactivos biotinilados y reaccionarán con avidina-CLIO (véase Syntesome, Gesellschaft für

medizinische Biochemie mbH.). El tetrasacárido x de Lewis de sialilo (Sle^x) es reconocido por proteínas tales como Selectinas, las cuales están presentes sobre la superficie de los leucocitos y funcionan como parte de la cascada inflamatoria para el reclutamiento de leucocitos.

5 Todavía otras unidades estructurales de direccionamiento incluyen un elemento no proteináceo, por ejemplo, una modificación de glicosilo (tal como un antígeno de Lewis) u otras moléculas orgánicas no proteináceas. Otro método es el acoplamiento covalente de la proteína a la partícula magnética.

Otra característica de los métodos incluye la identificación de tipos celulares específicos, para investigaciones hematológicas o histopatológicas por ejemplo recuentos de células CD4/CD3 y células tumorales circulantes utilizando cualquiera de las unidades estructurales de enlazamiento descritas más arriba.

10 Agentes de enlazamiento multivalentes

Los ensayos de la invención pueden incluir un agente de enlazamiento multivalente (i) que portan múltiples analitos enlazados a un portador (por ejemplo un armazón sintético sencillo, o una proteína o polisacárido portador más grande, tal como BSA, transferrina o dextrano), o epítopos múltiples portadores para enlazamiento, por ejemplo, a dos o más poblaciones de partículas magnéticas para formar un agregado.

15 Cuando se emplea un agente de enlazamiento multivalente, los analitos múltiples pueden ser enlazados a un portador (por ejemplo, un armazón sintético sencillo, o una proteína o polisacárido portador más grande, tal como BSA, transferrina, o dextrano). Alternativamente, el agente de enlazamiento multivalente puede ser un ácido nucleico diseñado para enlazarse a dos o más poblaciones de partículas magnéticas. Tales agentes de enlazamiento multivalentes actúan como aglomerantes y la arquitectura de ensayo está caracterizada por una competición entre el
20 analito que está siendo detectado y el agente de enlazamiento multivalente (por ejemplo, en un ensayo de inhibición, ensayo de competición, o ensayo de desagregación).

25 El grupo funcional presente en el analito puede ser utilizado para formar un enlace covalente con el portador. Alternativamente, el analito puede ser derivado para proveer un enlazante (esto es, un espaciador que separa el analito del portador en el conjugado) terminando en un grupo funcional (esto es, un alcohol, una amina, un grupo carboxilo, un grupo sulfhidrilo o un grupo fosfato), el cual se usa para formar el enlace covalente con el portador.

El enlace covalente de un analito y un portador puede ser efectuado usando un enlazante que contiene unidades estructurales reactivas capaces de reaccionar con tales grupos funcionales presentes en el analito y el portador. Por ejemplo, un grupo hidroxilo del analito puede reaccionar con un grupo carboxilo del enlazante, o un derivado activado del mismo, dando como resultado la formación de un éster que enlaza a los dos.

30 Ejemplos de unidades estructurales capaces de reaccionar con grupos sulfhidrilo incluyen compuestos de α -haloacetilo del tipo XCH_2CO- (donde $X=Br, Cl$ o I), los cuales muestran reactividad particular por grupos sulfhidrilo, pero que también pueden ser utilizados para modificar grupos imidazolilo, tioéter, fenol y amino, como lo describe Gurd, *Methods Enzymol.* 11:532 (1967). Los derivados de N-maleimida también se consideran reactivos hacia
35 grupos sulfhidrilo, pero adicionalmente pueden ser útiles en el acoplamiento a grupos amino bajo ciertas condiciones. Reactivos tales como 2-iminotiolano (Traut et al., *Biochemistry* 12:3266 (1973)), que introducen un grupo tiol a través de la conversión de un grupo amino, pueden ser considerados como reactivos de sulfhidrilo si el enlazamiento ocurre a través de la formación de puentes disulfuro.

Ejemplos de unidades estructurales reactivas capaces de reaccionar con grupos amino incluyen, por ejemplo, agentes alquilantes y acilantes. Agentes alquilantes representativos incluyen:

40 (i) compuestos de α -haloacetilo, los cuales muestran especificidad hacia grupos amino en la ausencia de grupos tiol reactivos y son del tipo XCH_2CO- (donde $X=Br, Cl$ o I), por ejemplo, como lo describe Wong, *Biochemistry* 24:5337 (1979); (ii) derivados de N-maleimida, los cuales pueden reaccionar con grupos amino bien sea a través de una reacción tipo Michael o a través de la acilación por adición al grupo carbonilo del anillo, por ejemplo, como lo describe Smyth et al., *J. Am. Chem. Soc.* 82:4600 (1960) y *Biochem. J.* 91:589 (1964); (iii) haluros de arilo tales
45 como compuestos nitrohaloaromáticos reactivos; (iv) haluros de alquilo, como los descritos, por ejemplo, por McKenzie et al., *J. Proteína Chem.* 7:581 (1988); (v) aldehídos y cetonas capaces de formar bases de Schiff con grupos amino, siendo estabilizados usualmente los aductos formados a través de reducción para dar una amina estable; (vi) derivados de epoxi tales como epiclorohidrina y bisoxiranos, los cuales pueden reaccionar con los grupos amino, sulfhidrilo o hidroxilo fenólico; (vii) derivados de s-triazinas que contienen cloro, los cuales son muy reactivos hacia nucleófilos tales como grupos amino, sulfhidrilo e hidroxilo; (viii) aziridinas con base en compuestos de s-triazina detallados más arriba, por ejemplo, como los descritos por Ross, *J. Adv. Cancer Res.* 2:1 (1954), los cuales reaccionan con nucleófilos tales como grupos amino por apertura de anillo; (ix) dietil ésteres del ácido escuárico tal como lo describe Tietze, *Chem. Ber.* 124:1215 (1991); y (x) éteres de α -haloalquilo, los cuales son
50 agentes alquilantes más reactivos que los haluros de alquilo normales por la activación causada por el átomo de

oxígeno del éter, como lo describe Benneche et al., Eur. J. Med. Chem. 28:463 (1993).

Agentes acilantes reactivos a amino representativos incluyen: (i) isocianatos e isotiocianatos, particularmente derivados aromáticos, los cuales forman derivados de urea y tiourea estables respectivamente; (ii) cloruros de sulfonilo, los cuales han sido descritos por Herzig et al., Biopolymers 2:349 (1964); (iii) haluros de ácido; (iv) ésteres activos tales como nitrofenilésteres o N-hidroxisuccinimidil ésteres; (v) anhídridos de ácido tales como mixtos, simétricos, o N-carboxianhídridos; (vi) otros reactivos útiles para la formación de enlaces amida, por ejemplo, los descritos por M. Bodansky, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, 1984; (vii) acilazidas, por ejemplo en donde el grupo azida es generado por un derivado de hidrazida preparado utilizando nitrito de sodio, tal como lo describe Wetz et al., Anal. Biochem. 58:347 (1974); y (viii) imidoésteres, los cuales forman amidinas estables por reacción con grupos amino, por ejemplo, como lo describe Hunter and Ludwig, J. Am. Chem. Soc. 84:3491 (1962). Los aldehídos y cetonas pueden hacerse reaccionar con aminas para formar bases de Schiff, las cuales pueden ser estabilizadas ventajosamente a través de la aminación reductiva. Las unidades estructurales alcoxilamino reaccionan fácilmente con cetonas y aldehídos para producir alcoxaminas estables, por ejemplo, como las descritas por Webb et al., Bioconjugate Chem. 1:96 (1990).

Ejemplos de unidades estructurales reactivas capaces de reaccionar con grupos carboxilo incluyen compuestos diazo tales como los diazoacetato ésteres y diazoacetamidas, los cuales reaccionan con alta especificidad para generar grupos éster, por ejemplo como lo describe Herriot, Adv. Protein Chem. 3:169(1947). También pueden emplearse reactivos modificadores de carboxilo tales como carbodiimidas, los cuales reaccionan a través de la formación de O-acilurea seguida por la formación del enlace amida.

Será evidente que los grupos funcionales en el analito y/o el portador, si se desea, pueden ser convertidos en otros grupos funcionales antes de la reacción, por ejemplo, para conferir reactividad o selectividad adicionales. Ejemplos de métodos útiles para este propósito incluyen la conversión de aminas a carboxilos utilizando reactivos tales como anhídridos dicarboxílicos; conversión de aminas a tioles utilizando reactivos tales como N-acetilhomocisteina tilactona, anhídrido S-acetil mercaptosuccínico, 2-iminotiolano, o derivados de succinimidilo que contienen tiol; conversión de tioles a carboxilos utilizando reactivos tales como α -haloacetatos; conversión de tioles a aminas utilizando reactivos tales como etilenimina o 2-bromoetilamina; conversión de carboxilos a aminas utilizando reactivos tales como las carbodiimidas seguidas por diaminas; y conversión de alcoholes a tioles utilizando reactivos tales como cloruro de tosilo seguido por transesterificación con tioacetato e hidrólisis al tiol con acetato de sodio.

Los así llamados enlazantes de longitud cero, que involucran la unión covalente directa de un grupo químico reactivo del analito con un grupo químico reactivo del portador sin introducir material de enlazamiento adicional, si se desea, pueden ser utilizados de acuerdo con la invención. De la forma más común, sin embargo, el enlazante incluirá dos o más unidades estructurales reactivas, como se describió más arriba, conectadas por un elemento espaciador. La presencia de tal espaciador permite que los enlazantes bifuncionales reaccionen con grupos funcionales específicos dentro del analito y el portador, dando como resultado un enlace covalente entre los dos. Las unidades estructurales reactivas en un enlazante pueden ser las mismas (enlazantes homobifuncionales) o diferentes (enlazantes heterobifuncionales o, cuando están presentes varias unidades estructurales reactivas disímiles, enlazante heteromultifuncional), proveyendo una diversidad de reactivos potenciales que pueden generar enlazamiento covalente entre el analito y el portador.

Elementos espaciadores en el enlazante típicamente consisten de cadenas lineales o ramificadas y pueden incluir C_{1-10} alquilo, un heteroalquilo de 1 a 10 átomos, un C_{2-10} alqueno, un C_{2-10} alquino, C_{5-10} arilo, un sistema cíclico de 3 a 10 átomos, o $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2-$, en el cual n es de 1 a 4.

Típicamente, un agente de enlazamiento multivalente incluirá 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 15, 50 o 100 (por ejemplo, de 3 a 100, de 3 a 30, de 4 a 25, o de 6 a 20) analitos conjugados. Los agentes de enlazamiento multivalentes son típicamente de 10 kDa a 200 kDa en tamaño y pueden ser preparados como se describe en los ejemplos.

45 Analitos

Realizaciones de la invención incluyen métodos para detectar la presencia de un analito seleccionado de un patógeno, virus o ácido nucleico diana en una muestra de sangre entera. Los analitos pueden incluir la identificación de células o tipos celulares específicos. Los analitos pueden incluir una o más sustancias y/o metabolitos, marcadores y/o otros indicadores biológicamente activos de sustancias biológicamente activas. Una sustancia biológicamente activa puede ser descrita como una entidad individual o una combinación de entidades. El término "sustancia biológicamente activa" incluye sin limitación, medicaciones; vitaminas, suplementos minerales; sustancias usadas para el tratamiento, prevención, diagnóstico, cura o mitigación de enfermedad o malestar; o sustancias que afectan la estructura o funcionamiento del cuerpo; o profármacos, los cuales se hacen biológicamente activos o más activos después de que han sido colocados en un ambiente fisiológico predeterminado; o agentes biológicamente tóxicos tales como los usados en guerras biológicas incluyendo organismos tales como ántrax, ébola, Salmonella typhimurium, virus de Marburg, plaga, cólera, Francisella tularensis (tularemia), brucelosis, fiebre Q, fiebre hemorrágica Boliviana, micosis por coccidioides, muermos, Melioidosis, Shigella, fiebre con manchas de las

Montañas Rocosas, tifo, Psittacosis, fiebre amarilla, encefalitis Japonesa B, fiebre del Valle del Rift, y viruela; toxinas de origen natural que pueden ser utilizadas como armas incluyen ricina, aflatoxina, SEB, toxina de botulinum, saxitoxina, y muchas micotoxinas. Los analitos también pueden incluir organismos tales como *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Streptococo* negativo a coagulasa, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Aspergillus fumigates*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides fragilis*, blaSHV, *Burkholderia cepacia*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacteriaceae* spp., *Haemophilus influenza*, *Kingella kingae*, *Klebsiella oxytoca*, *Listeria monocitogenes*, bacterias portadoras del gen Mec A (MRSA), *Morganella morgana*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria* spp., non-meningitidis, *Prevotella buccae*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Propionibacterium acnes*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella enteric*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus maltophilia*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus agalactie*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus dysgalactie*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus sanguinis*, gen Van A, gen Van B. Los analitos también pueden incluir organismos virales tales como virus de ADNds (por ejemplo, adenovirus, virus de herpes, virus de viruela); virus ssDNA (+)ADN sentido (e.g., parvovirus); virus dsRNA (e.g., reovirus); virus (+)ssRNA (+)ARN sentido (e.g., picornavirus, togavirus); virus (-)ssRNA (-)ARN sentido (e.g., ortomixovirus, rhabdovirus); virus ssARN-RT (+)ARN sentido con intermediario de ADN en ciclo de vida (e.g., retrovirus); y virus dsDNA-RT (e.g., hepadnavirus).

Las infecciones oportunistas que pueden ser detectadas utilizando los sistemas y métodos de la invención incluyen, sin limitación, infecciones fúngicas, virales, bacterianas, protozoarias, tales como: 1) infecciones fúngicas tales como las de *Candida* spp. (cepas resistentes y no resistentes a fármacos), *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, y *Aspergillus fumigates*; 2) infecciones gram negativas, tales como las provocadas por *E. coli*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumonia/oxytoca*, y *Pseudomonas aeruginosa*; y 3) infecciones por gram positivas tales como las causadas por *Staphylococcus* spp., *S. aureus*, *S. pneumonia*, *Enterococcus* ssp. (*E. faecalis* y *E. faecium*). La infección puede ser por estafilococcus negativo a coagulasa, *Corynebacterium* spp., *Fusobacterium* spp., *Morganella morganii*, *Pneumocystis jirovecii* (previamente conocida como *Pneumocystis carinii*), *F. hominis*, *S. pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, poliomavirus JC poliomavirus (el virus que causa la leucoencefalopatía multifocal progresiva), *Acinetobacter baumannii*, *Toxoplasma gondii*, citomegalovirus, *Aspergillus* spp., Kaposi's Sarcoma, *Cryptosporidium* spp., *Cryptococcus neoformans*, y *Histoplasma capsulatum*.

Se divulga que los ejemplos de amplias categorías de analitos que pueden ser detectados utilizando los dispositivos, sistemas y métodos descritos aquí incluyen, sin limitación, las siguientes categorías terapéuticas: agentes anabólicos, antiácidos, agentes antiasmáticos, agentes antiolesterolémicos y agentes antilipídicos, anticoagulantes, anticonvulsivos, antidiarreicos, antieméticos, agentes antiinfecciosos, agentes antiinflamatorios, agentes antimaniacos, agentes antináuseas, agentes antineoplásicos, agentes antiobesidad, agentes antipiréticos y analgésicos, agentes antiespasmódicos, agentes antitrombóticos, agentes antiuricémicos, agentes antianginales, antihistaminas, antitusivos, supresores del apetito, productos biológicos, dilatadores cerebrales, dilatadores de la coronaria, descongestionantes, diuréticos, agentes diagnósticos, agentes eritropoyéticos, expectorantes, sedantes gastrointestinales, agentes hiperglicémicos, hipnóticos, agentes hipoglicémicos, resinas para intercambio de iones, laxantes, suplementos minerales, agentes mucolíticos, fármacos neuromusculares, vasodilatadores periféricos, psicotrópicos, sedantes, estimulantes, agentes tiroidales y anti-tiroidales, relajantes uterinos, vitaminas y profármacos.

Más específicamente, se divulga que ejemplos de analitos que pueden ser detectados utilizando los dispositivos, sistemas y métodos divulgados aquí incluyen, sin limitación, las siguientes categorías terapéuticas: analgésicos, tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos, agonistas de opio y salicilatos; antihistaminas, tales como bloqueadores de H₁ y bloqueadores de H₂; agentes antiinfecciosos tales como antihelmínticos, antianaeróbicos, antibióticos, antibióticos aminoglicósidos, antibióticos antifúngicos, antibióticos de cefalosporina, antibióticos de macrólido, antibióticos misceláneos de β-lactama, antibióticos de penicilina, antibióticos de quinolona, antibióticos de sulfonamida, antibióticos de tetraciclina, antimicobacterianos, antimicobacterianos antituberculosis, antiprotozoarios, antiprotozoarios antimalaria, agentes antivirales, agentes antirretrovirales, escabidas, y agentes antiinfecciosos urinarios; agentes antineoplásicos, tales como agentes alquilantes, agentes alquilantes de mostaza de nitrógeno, agentes alquilantes de nitrosourea, antimetabolitos, antimetabolitos análogos a la purina, antimetabolitos análogos a la pirimidina, antineoplásicos hormonales, antineoplásicos naturales, antineoplásicos naturales antibióticos, y antineoplásicos naturales de alcaloides vinca; agentes autonómicos, tales como anticolinérgicos, anticolinérgicos antimuscarínicos, alcaloides ergot, parasimpatomiméticos, parasimpatomiméticos agonistas colinérgicos, parasimpatomiméticos inhibidores de colinesterasa, simpatolíticos, simpatolíticos bloqueadores alfa, simpatolíticos bloqueadores beta, simpatomiméticos y simpatomiméticos agonistas adrenérgicos; agentes cardiovasculares, tales como antianginales, antianginales bloqueadores beta, antianginales bloqueadores del canal de calcio, antianginales de nitrato, antiarrítmicos, antiarrítmicos cardiacos de glicósido, antiarrítmicos clase I, antiarrítmicos clase II, antiarrítmicos clase III, antiarrítmicos clase IV, agentes antihipertensores, antihipertensores bloqueadores de alfa, antihipertensivos inhibidores de enzimas por conversión de angiotensina (inhibidor de ACE), antihipertensores bloqueadores beta, antihipertensores bloqueadores del canal de calcio, antihipertensores

adrenérgicos de acción central, agentes antihipertensores diuréticos, antihipertensores vasodilatadores periféricos, antilipémicos, antilipémicos secuestrantes de ácidos biliares, antilipémicos inhibidores de la HMG-COA reductasa, inotropos, inotropos cardiacos de glicósido, y agentes trombolíticos; agentes dermatológicos, tales como antihistaminas, agentes antiinflamatorios, agentes antiinflamatorios de corticosteroides, anestésicos antipruríticos/locales, agentes antiinfecciosos tópicos, antiinfecciosos tópicos antifúngicos, antiinfecciosos tópicos antivirales y antineoplásicos tópicos; agentes electrolíticos y renales, tales como agentes acidificantes, agentes alcalinizantes,, diuréticos, diuréticos inhibidores de la anhidrasa carbónica, diuréticos de bucle, diuréticos osmóticos, diuréticos para reposición de potasio, diuréticos de tiazida, reemplazantes de electrolitos, y agentes uricosúricos; enzimas, tales como enzimas pancreáticas y enzimas trombolíticas; agentes gastrointestinales tales como antidiarreicos, antieméticos, agentes antiinflamatorios gastrointestinales, agente antiinflamatorios gastrointestinales de salicilato, agentes antiulcera antiácidos, agentes antiulcera gástricos inhibidores de la bomba de ácido, agentes antiulcera de la mucosa gástrica, agentes antiulcera bloqueadores de H₂, agentes colerilolíticos, digestivos, eméticos, laxantes y ablandadores de las heces, y agentes proquinéticos; anestésicos generales tales como anestésicos por inhalación, anestésicos por inhalación halogenados, anestésicos intravenosos, anestésicos intravenosos de barbiturato, anestésicos intravenosos de benzodiacepina, y anestésicos intravenosos agonistas de opiato; agentes hematológicos, tales como agentes antianemia, agentes antianemia hematopoyéticos, agentes de coagulación, anticoagulantes, agentes de coagulación hemostáticos, agentes de coagulación inhibidores de plaquetas, agentes de coagulación de enzima trombolítica, y expansores del volumen de plasma; hormonas y modificadores de hormonas, tales como abortifacientes, agentes adrenales, agentes adrenales corticosteroides, andrógenos, antiandrógenos, antiidiabéticos, agentes antiidiabéticos de sulfonilurea, agentes antihipoglicémicos, anticonceptivos orales, anticonceptivos de progestina, estrógenos, agentes de fertilidad, oxitócicos, agentes para la paratiroides, hormonas pituitarias, progestinas, agentes antiitiroides, hormonas tiroidales, y tocolíticos; agentes inmunobiológicos, tales como inmunoglobulinas, inmunosupresores, toxoides y vacunas; anestésicos locales tales como anestésicos locales de amida y anestésicos locales de éster; agentes musculoesqueletales, tales como agentes antiinflamatorios antigota, agentes antiinflamatorios corticosteroides, agentes antiinflamatorios con compuestos de oro, agentes antiinflamatorios inmunosupresores, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs), agentes antiinflamatorios de salicilato, relajantes del armazón muscular, relajantes del armazón muscular bloqueadores neuromusculares, y relajantes del armazón muscular bloqueadores neuromusculares reversos; agentes neurológicos, tales como anticonvulsivos, anticonvulsivos de barbiturato, anticonvulsivos de benzodiacepina, agentes antimigraña, agentes antiparkinsonianos, agentes antivértigo, agonistas de opiato y antagonistas de opiato; agentes oftálmicos, tales como agentes antiglaucoma, agentes antiglaucoma bloqueadores beta, agentes antiglaucoma mióticos, midriáticos, midriáticos agonistas adrenérgicos, midriáticos antimuscarínicos, anestésicos oftálmicos, antiinfecciosos oftálmicos, antiinfecciosos oftálmicos de aminoglicósido, antiinfecciosos oftálmicos de macrólida, antiinfecciosos oftálmicos de quinolona, antiinfecciosos oftálmicos de sulfonamida, antiinfecciosos oftálmicos de tetraciclina, agentes antiinflamatorios oftálmicos, agentes antiinflamatorios oftálmicos de corticosteroides y fármacos antiinflamatorios oftálmicos no esteroideos (NSAIDs); agentes psicotrópicos, tales como antidepresivos, antidepresivos heterocíclicos, inhibidores de la monoamina oxidasa (MAOIs), inhibidores de la retoma selectiva de serotonina (SSRIs), antidepresivos tricíclicos, antimaniacos, antipsicóticos, antipsicóticos de fenotiazina, ansiolíticos, sedantes e hipnóticos, sedantes e hipnóticos de barbiturato, ansiolíticos sedantes e hipnóticos de benzodiacepina y psicoestimulantes, agentes respiratorios, tales como antitusivos, broncodilatadores, broncodilatadores agonistas adrenérgicos, broncodilatadores antimuscarínicos, expectorantes, agentes mucolíticos, agentes antiinflamatorios respiratorios y agentes antiinflamatorios respiratorios de corticosteroide; agentes de toxicología tales como antidotos, antagonistas de metales pesados/agentes quelantes, agentes contra el abuso de sustancias, agentes contra el abuso de sustancias disuasivas, y agentes contra el abuso de sustancias por abandono; minerales; y vitaminas, tales como vitamina A, vitamina B, vitamina C, vitamina D, vitamina E y vitamina K.

Se divulga que ejemplos de clases de sustancias biológicamente activas de las categorías anteriores que pueden ser detectadas utilizando los dispositivos, sistemas y métodos descritos aquí incluyen, sin limitación, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs), analgésicos, tales como diclofenaco, ibuprofeno, cetoprofen y naproxeno; analgésicos agonistas de opiato, tales como codeína, fentanil, hidromorfona y morfina; analgésicos de salicilato tales como aspirina (ASA)(ASA con recubrimiento entérico); antihistaminas bloqueadoras de H₁, tales como clemastina y terfenadina; antihistaminas bloqueadoras de H₂, tales como cimetidina, famotidina, nizatidina y ranitidina; agentes antiinfecciosos tales como mupirocina, agentes antiinfecciosos antianaeróbicos, tales como cloranfenicol y clindamicina; antiinfecciosos antibióticos antifúngicos, tales como anfotericina B, clotrimazol, fluconazol y ketoconazol; antiinfecciosos antibióticos de macrólida, tales como azitromicina y eritromicina, antiinfecciosos antibióticos de betalactama misceláneas, tales como aztreonam e imipenem; antiinfecciosos antibióticos de penicilina tales como nafcilina, oxacilina, penicilina G y penicilina V; antiinfecciosos antibióticos de quinolona, tales como ciprofloxacina y norfloxacina; antiinfecciosos antibióticos de tetraciclina tales como doxiciclina, minociclina y tetraciclina; antiinfecciosos antimicobacterianos antituberculosis tales como isoniazida (INH) y rifampin; antiinfecciosos antiprotozoarios tales como atovacuona y dapsona; antiinfecciosos antiprotozoarios antimalaria, tales como cloroquina y pirimetamina; agentes antiinfecciosos antirretrovirales, tales como ritonavir y zidovudina; agentes antiinfecciosos antivirales, tales como aciclovir, ganciclovir, interferón alfa y rimantadina; agentes antineoplásicos alquilantes, tales como carboplatino y cisplatino; agentes antineoplásicos alquilantes de nitrosourea, tales como carmustina (BCNU); agentes antineoplásicos antimetabolitos, tales como metotrexato; agentes antineoplásicos antimetabolito análogos de la pirimidina, tales como fluorouracil (5-FU) y gemcitabina;

antineoplásicos hormonales, tales como goserelina, leuprolida y tamoxifen; antineoplásicos naturales, tales como aldesleucina, interleucina-2, docetaxel, etopósido (VP-16), interferón alfa, paclitaxel y tretinoína (ATRA); antineoplásicos naturales antibióticos tales como bleomicina, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina y mitomicina; antineoplásicos naturales de alcaloides vinca, tales como vinblastina y vincristina; agentes autonómicos, tales como nicotina; agentes autonómicos anticolinérgicos, tales como benzotropina y trihexifenidilo; agentes autonómicos anticolinérgicos antimuscarínicos, tales como atropina y oxibutinina; agentes autonómicos alcaloides ergot, tales como bromocriptina; parasimpatomiméticos agonistas colinérgicos, tales como pilocarpina; parasintomiméticos inhibidores de colinesterasa, tales como piridostigmina; simpatolíticos bloqueadores de alfa, tales como prazosin; simpatolíticos bloqueadores β , tales como atenolol; simpatomiméticos agonistas adrenérgicos tales como albuterol y dobutamina; agentes cardiovasculares, tales como aspirina (ASA) (ASA con recubrimiento entérico); antianginales bloqueadores α , tales como atenolol y propranolol; antianginales bloqueadores del canal de calcio, tales como nifedipina y verapamil; antianginales de nitrato, tales como dinitrato de isosorbide (ISDN), antiarrítmicos cardíacos de glicósido, tales como digoxina; antiarrítmicos clase I, tales como lidocaína, mexiletine, fentoina, procainamida y quinidina; antiarrítmicos clase II, tales como atenolol, metoprolol, propranolol y timolol; antiarrítmicos clase III, tales como amiodarona; antiarrítmicos clase IV, tales como diltiazem y verapamil; antihipertensivos bloqueadores de alfa, tales como prazosin; antihipertensores inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (inhibidor de ACE), tales como captopril y enalapril; antihipertensores bloqueadores beta, tales como atenolol, metoprolol, nadolol y propranolol; agentes antihipertensores bloqueadores del canal de calcio, tales como diltiazem y nifedipina; antihipertensores adrenérgicos de acción central, tales como clonidina y metildopa; agentes antihipertensores diuréticos, tales como amiloride, furosemida, hidroclorotiazida (HCTZ) y espironolactona; antihipertensores vasodilatadores periféricos, tales como hidralazina y minoxidil; antilipémicos, tales como gemfibrozil y probucol; antilipémicos secuestrantes de ácidos biliares, tales como colestiramina; antilipémicos inhibidores de HMG-CoA reductasa, tales como lovastatina y pravastatina, inotropos, tales como amrinona, dobutamina y dopamina; inotropos cardíacos de glicósido, tales como digoxina; agentes trombolíticos, tales como alteplasa (TPA), anistreplasa, estreptoquinasa y uroquinasa; agentes dermatológicos, tales como colchicina, isotretinoína, metotrexato, minoxidil, tretinoína (ATRA); agentes antiinflamatorios dermatológicos corticosteroides, tales como betametasona y dexametasona; antiinfecciosos tópicos antifúngicos, tales anfotericina B, clotrimazol, miconazol y nistatina; antiinfecciosos antivirales tópicos, tales como aciclovir; antineoplásicos tópicos, tales como fluorouracil (5-FU); agentes electrolíticos renales, tales como lactulosa; diuréticos de bucle, tales como furosemida; diuréticos de reposición de potasio, tales como triamterene; diuréticos de tiazida, tales como hidroclorotiazida (HCTZ); agentes uricosúricos, tales como probenecid; enzimas tales como ARasa y ADNasa; enzimas trombolíticas, tales como alteplasa, anistreplasa, estreptoquinasa y uroquinasa; antieméticos, tales como plocloperazina; agentes antiinflamatorios gastrointestinales de salicilato, tales como sulfasalazina; agentes antiúlceras gástricas inhibidores de la bomba de ácido, tales como omeprazol; agentes antiúlceras bloqueadores de H_2 , tales como cimetidina, famotidina, nizatidina y ranitidina; digestivos, tales como pancrelipasa; agentes procinéticos, tales como eritromicina; anestésicos intravenosos agonistas de opiato, tales como fentanil; agentes antianemia hematopoyéticos, tales como eritropoyetina, filgrastim (G-CSF) y sargramostim (GM-CSF); agentes de coagulación, tales como factores antihemofílicos 1-10 (AHF 1-10); anticoagulantes, tales como warfarina; agentes de coagulación de enzima trombolíticos, tales como alteplasa, anistreplasa, estreptoquinasa y uroquinasa; hormonas y modificadores de hormonas, tales como bromocriptina; abortifacientes, tales como metotrexato; agentes antidiabéticos, tales como insulina, anticonceptivos orales, tales como estrógeno y progestina; anticonceptivos de progestina, tales como levonorgestrel y norgestrel; estrógenos tales como estrógenos conjugados, dietilestilbestrol (DES), estrógeno (estradiol, estrona y estropipato); agentes de fertilidad, tales como clomifeno, gonadotropina coriónica humana (HCG) y menopinas; agentes paratiroides tales como calcitonina; hormonas de la pituitaria, tales como la desmopresina, goserelina, oxitocina y vasopresina (ADH); progestinas, tales como medroxiprogesterona, noretindrona y progesterona; hormonas de la tiroides, tales como levotiroxina; agentes inmunobiológicos, tales como interferón beta-1b e interferón gamma-1b; inmunoglobulinas, tales como inmunoglobulina IM, IMiG, iGIM e inmunoglobulina IV, iViG, iGiV; anestésicos locales de amida, tales como lidocaína; anestésicos locales de éster, tales como benzocaina y procaina; agentes antiinflamatorios corticosteroides musculoesqueléticos, tales como beclometasona, betametasona, cortisona, dexametasona, hidrocortisona y prednisona; inmunosupresores antiinflamatorios musculoesqueléticos, tales como azatioprina, ciclofosfamida y metotrexato; fármacos antiinflamatorios no esteroideos musculoesqueléticos (NSAIDs), tales como diclofenaco, ibuprofeno, cetoprofeno, ketorlac y naproxeno; relajantes musculares esqueléticos, tales como baclofen, ciclobenzaprina y diazepam; relajantes musculares esqueléticos bloqueadores neuromusculares reversos, tales como piridostigmina; agentes neurológicos, tales como nimodipina, riluzol, tacrina y ticlopidina; agentes anticonvulsionantes, tales como carbamazepina, gabapentina, lamotrigina, fentoina y ácido valproico, anticonvulsionantes de barbiturato, tales como fenobarbital y pirimidona; anticonvulsionantes de benzodiacepina, tales como clonazepam, diazepam y lorazepam; agentes antiparkinsonianos, tales como bromocriptina, levodopa, carbidopa y pergolide; agentes antivértigo, tales como meclizina; agonistas de opiato, tales como codeína, fentanil, hidromorfona, metadona, y morfina; agonistas de opiato, tales como naloxona; agentes antiglaucoma bloqueadores beta, tales como timolol; agentes antiglaucoma mióticos, tales como pilocarpina; antiinfecciosos oftálmicos de aminoglicósido, tales como gentamicina, neomicina y tobramicina; antiinfecciosos oftálmicos de quinolona, tales como ciprofloxacina, norfloxacina y ofloxacina; agentes antiinflamatorios oftálmicos de corticosteroides, tales como dexametasona y prednisolona; fármacos antiinflamatorios oftálmicos no esteroideos (NSAIDs), tales como diclofenaco; antipsicóticos, tales como clozapina, haloperidol, y risperidona; ansiolíticos, sedantes e hipnóticos de benzodiacepina, tales como clonazepam, diazepam, lorazepam, oxazepam, y prazepam; psicoestimulantes, tales como metilfenidato y pemolina; antitusivos, tales como

codeína; broncodilatadores, tales como teofilina; broncodilatadores adrenérgicos agonistas, tales como albuterol; agentes antiinflamatorios respiratorios de corticosteroides, tales como dexametasona; antídotos, tales como flumazenil y naloxona; agonistas de metales pesados/agentes quelantes, tales como penicilamina; agentes contra el abuso de sustancias disuasivas, tales como disulfiram, naltrexona, y nicotina; agentes contra el abuso de sustancias por retiro de bromocriptina; minerales, tales como hierro, calcio y magnesio; compuestos de vitamina B, tales como cianocobalamina (vitamina B₁₂) y niacina (vitamina B₃); compuestos de vitamina C, tales como ácido ascórbico; y compuestos de vitamina D, tales como calcitriol; beta-glucano recombinante; concentrado de inmunoglobulina bovina; superóxido dismutasa bovina; la formulación que incluye fluorouracil, epinefrina, y colágeno bovino; hirudina recombinante (r-Hir), inmunógeno VIH-1; anticuerpo anti-TAC humano; hormona de crecimiento humana recombinante (r-hGH); hemoglobina humana recombinante (r-Hb); mecasermina humana recombinante (r-IGF-1); interferón beta-la recombinante; lenograstime (G-CSF); olanzapina; hormona estimulante tiroide recombinante (r-TSH); topotecan; aciclovir sodio; aldesleucina; atenolol; sulfato de bleomicina, calcitonina humana; calcitonina de salmón; carboplatino; carmustina; dactinomicina, daunorrubicina HCl; docetaxel; doxorubicina HCl; epoetina alfa; etopósido (VP-16); fluorouracilo (5-FU); ganciclovir sodio; sulfato de gentamicina; interferón alfa; acetato de leuprolide; meperidina HCl; metadona HCl; metotrexato sodio; paclitaxel; ranitidina HCl; sulfato de vinblastina; y zidovudina (AZT).

Se divulga que ejemplos específicos adicionales de sustancias activas biológicamente de las categorías anteriores que pueden ser detectados usando los dispositivos, sistemas y métodos descritos aquí incluyen, sin limitación, antineoplásicos tales como inhibidores de andrógeno, antimetabolitos, agentes citotóxicos, e inmunomoduladores; antitusivos tales como dextrometorfan, dextrometorfan bromhidrato, noscapina, citrato de carbetapentano, y clorhidrato de clorfedianol; antihistamínicos tales como maleato de clorfeniramina, tartrato de fenindamina, maleato de pirilamina, succinato de doxilamina y citrato de feniltoloxamina; descongestionantes tales como fenilefrina clorhidrato, clorhidrato de fenilpropanolamina, clorhidrato de pseudoefedrina y efedrina; diversos alcaloides tales como fosfato de codeína, sulfato de codeína y morfina; suplementos minerales tales como cloruro de potasio, cloruro de zinc, carbonato de calcio, óxido de magnesio y otras sales de metales alcalinos y metales alcalinotérreos; resinas de intercambio iónico tales como colestiramina; antiarrítmicos tales como N-acetilprocaïnamiada; antipiréticos y analgésicos tales como acetaminofén, aspirina e ibuprofeno; supresores del apetito tales como fenilpropanolamina clorhidrato o cafeína; expectorantes tales como guaifenesina; antiácidos tales como hidróxido de aluminio e hidróxido de magnesio; agentes biológicos tales como péptidos, polipéptidos, proteínas y aminoácidos, hormonas, interferones o citoquinas, y otros compuestos peptídicos bioactivos, tales como interleucinas 1-18 incluyendo mutantes y análogos, ARNasa, ADNasa, hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) y análogos, hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), factor beta de crecimiento transformante (TGF-beta), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor alfa y beta de necrosis tumoral (TNF-alfa y beta), factor de crecimiento de nervios (NGF), factor liberador de hormona de crecimiento (GHRF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor homólogo de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFHF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de insulina (IGF), factor 2 inhibidor de la invasión (IIF-2), proteínas morfogenéticas de hueso 1-7 (BMP 1-7), somatostatina, timosina- α -1, T-globulina, superóxido dismutasa (SOD), factores de complemento, hGH, tPA, calcitonina, ANF, EPO e insulina; y agentes antiinfecciosos tales como antifúngicos, antivirales, antisépticos y antibióticos.

Se divulga que sustancias biológicamente activas que pueden ser detectadas usando los dispositivos, sistemas y métodos descritos aquí también incluyen radiosensibilizadores, tales como metoclopramida, sensamida o neusensamida (manufacturada por Oxigene); profiromicina (hecha por Vion); RSR13 (hecho por Allos); Thymitaq (hecho por Agouron), etanidazol o lobonguane (manufacturados por Nycomed); gadolinio texafrin (hecho por Pharmaclics); BuDR/Broxine (hecha por NeoPharm); IPdR (hecha por Sparta); CR2412 (hecha por Cell Therapeutic); L1X (hecha por Terrapin); o similares.

Sustancias biológicamente activas que pueden ser detectadas utilizando los dispositivos, sistemas y métodos descritos aquí incluyen medicaciones para el tracto gastrointestinal o sistema digestivo, por ejemplo, antiácidos, supresores de reflujo, antiflatulentos, antidopaminérgicos, inhibidores de la bomba de protones, antagonistas del receptor de H₂, citoprotectores, análogos de la prostaglandina, laxantes, antiespasmódicos, antidiarreicos, secuestrantes de ácidos biliares y opioides; medicaciones para el sistema cardiovascular, por ejemplo, bloqueadores del receptor beta, bloqueadores del canal de calcio, diuréticos, glucósidos cardiacos, antiarrítmicos, nitratos, antianginales, vasoconstrictores, vasodilatadores, activadores periféricos, inhibidores de ACE, bloqueadores del receptor de angiotensina, bloqueadores alfa, anticoagulantes, heparina, HSGAGs, fármacos antiplaquetas, fibrinolíticos, factores antihemofílicos, fármacos hemostáticos, agentes hipolipémicos, y estatinas; medicaciones para el sistema nervioso central, por ejemplo hipnóticos, anestésicos, antipsicóticos, antidepresivos, antieméticos, anticonvulsivos, antiepilépticos, ansiolíticos, barbituratos, fármacos para el trastorno del movimiento, estimulantes, benzodiazepina, ciclopirlolona, antagonistas de dopamina, antihistamínicos, colinérgicos, anticolinérgicos, eméticos, canabinoides, antagonistas de 5-HT; medicaciones para el dolor y/o la conciencia, por ejemplo NSAIDs, opioides y huérfanos tales como paracetamol, antidepresivos tricíclicos, y anticonvulsionantes; para trastornos musculoesqueléticos, por ejemplo, NSAIDs, relajantes musculares y fármaco de anticolesterasa neuromuscular; medicaciones para el ojo, por ejemplo bloqueadores de la neurona adrenérgicos, astringentes, lubricantes oculares, anestésicos tópicos, simpatomiméticos, parasimpatomolíticos, midriáticos, ciclopéjicos, antibióticos, antibióticos tópicos,

fármacos tipo sulfa, aminoglicósidos, fluoroquinolonas, antivirales, antifúngicos, imidazoles, polienos, NSAIDs, corticosteroides, inhibidores de mastocitos, agonistas adrenérgicos, bloqueadores beta, inhibidores/hiperosmóticos de anhidrasa carbónica, colinérgicos, mióticos, parasimpatomiméticos, prostaglandina, inhibidores de prostaglandina/agonistas, nitroglicerina; medicaciones para el oído, nariz y orofaringe, por ejemplo, simpatomiméticos, antihistamínicos, anticolinérgicos, NSAIDs, esteroides, antisépticos, anestésicos locales, antifúngicos, cerumenolíticos; medicaciones para el sistema respiratorio, por ejemplo, broncodilatores, NSAIDs, antialérgicos, antitusivos, mucolíticos, descongestionantes, corticosteroides, antagonistas del receptor beta, anticolinérgicos, esteroides; medicaciones para los problemas endocrinos, por ejemplo, andrógenos, antiandrógenos, gonadotropina, corticosteroides, hormona del crecimiento, insulina, antidiabéticos, hormonas de la tiroides, fármacos antitiroidales, calcitonina, difosfonato, y análogos de la vasopresina; medicaciones para el sistema reproductivo o sistema urinario, por ejemplo, antifúngicos, agentes alcalinizantes, quinolonas, antibióticos, colinérgicos, anticolinérgicos, anticolinesterasa, antiespasmódicos, inhibidor de la 5-alfa reductasa, bloqueadores alfa 1 selectivos y sildenafil; medicaciones para anticoncepción, por ejemplo, anticonceptivos orales, espermicidas, y anticonceptivos de reserva; medicaciones para obstetricia y ginecología, por ejemplo, NSAIDs, anticolinérgicos, fármacos hemostáticos, antifibrinolíticos, terapia de reemplazo de hormonas, regulador óseo, agonistas del receptor beta, hormona estimulante de folículo, hormona luteinizante, ácido gamolénico LHRH, inhibidor de la liberación de gonadotropina, progestógeno, agonista de dopamina, oestrógeno, prostaglandina, gonadorelina, clomifeno, tamoxifen, y dietilestilbestrol; medicaciones para la piel, por ejemplo, emolientes, antipruríticos, antifúngicos, desinfectantes, escabicida, pediculicida, productos de alquitrán, derivados de vitamina A, análogos de vitamina D, queratolíticos, abrasivos, antibióticos sistémicos, antibióticos tópicos, hormonas, agentes para control de la risa, absorbentes exudados, fibrinolíticos, proteolíticos, bloqueadores solares, antiperspirantes, y corticosteroides; medicaciones para infecciones e infestaciones, por ejemplo, antibióticos, antifúngicos, antilepróticos, fármacos antituberculosos, antimalaria, antihelmínticos, amebicidas, antivirales, antiprotozoarios, y antisuero; medicaciones para el sistema inmune, por ejemplo, vacunas, inmunoglobulina, inmunosupresores, interferón, anticuerpos monoclonales; medicaciones para trastornos alérgicos, por ejemplo, antialérgicos, antihistaminas, y NSAIDs; medicaciones para la nutrición, por ejemplo, tónicos, preparaciones de hierro, electrolitos, vitaminas, fármacos antiobesidad, fármacos anabólicos, fármacos hematopoyéticos, y fármacos en productos alimenticios; medicaciones para trastornos neoplásicos, por ejemplo, drogas citotóxicas, hormonas sexuales, inhibidores de la aromatasa, inhibidores de la somatostatina, interleucinas recombinantes, G-CSF, y eritropoyetina; medicaciones para diagnóstico, por ejemplo, agentes de contraste; y medicaciones para cáncer (agentes anticáncer).

Ejemplos de medicaciones para el dolor (por ejemplo, analgésicos) que pueden ser detectados utilizando los dispositivos, sistemas y métodos descritos aquí incluyen opiodes tales como buprenorfina, butorfanol, dextropropoxifeno, dihidrocodeína, fentanil, diamorfina (heroína), hidromorfona, morfina, nalbufina, oxicodona, oximorfona, pentazocina, petidina (meperidina), y tramadol; ácido salicílico y derivados tales como ácido acetilsalicílico (aspirina), diflunisal, y etenzamida; pirazonas tales como aminofenazona, metamizol, y fenazona; anilidas tales como paracetamol (acetaminofén), fenacetina; y otros tales como ziconotida y tetradirocanabinol.

Ejemplos de medicaciones para la presión sanguínea (por ejemplo, antihipertensores y diuréticos) que pueden ser detectados usando los dispositivos, sistemas y métodos descritos aquí incluyen agentes antiadrenérgicos, tales como clonidina, doxazosina, guanetidina, guanfacina, mecamilamina, metildopa, moxonidina, prazosina, rescinamina, y reserpina; vasodilatores tales como diazoxida, hidralazina, minoxidil, y nitropruside; diuréticos de bajo techo tales como bendroflumetiazida, clortiazida, clortalidona, hidroclorotiazida, indapamide, quinethazone, mersalyl, metolazone, y teobromina; diuréticos de alto techo tales como bumetanida, furosemida, y torasemida; diuréticos para reposición de potasio tales como amiloride, eplerenona, espironolactona, y triamterene; y otros antihipertensores tales como bosentan y ketanserín.

Ejemplos de antitrombóticos (por ejemplo, trombolíticos, anticoagulantes, y fármacos antiplaquetas) que pueden ser detectados utilizando los dispositivos, sistemas y métodos descritos aquí incluyen antagonistas de vitamina K tales como acenocoumarol, clorindiona, dicumarol, difenadiona, polietil biscoumacetato, phenprocoumon, fenindiona, tiocloamarol, y warfarina; grupo de la heparina (inhibidores de la agregación de plaquetas tales como anti-trombina III, bemiparina, dalteparina, danaparoid, enoxaparina, heparina, nadroparina, parnaparina, reviparina, sulodexide, y tinzaparina; otros inhibidores de la agregación de plaquetas tales como abciximab, ácido acetilsalicílico (aspirina), aloxiprin, beraprost, ditazol, carbasalate calcio, cloricromen, clopidogrel, dipiridamol, epoprostenol, eptifibatide, indobufen, iloprost, picotamida, prasugrel, ticlopidina, tirofiban, treprostinil, y triflusal; enzimas tales como alteplasa, ancrod, anistreplasa, brinasa, drotrecogina alfa, fibrinolisina, proteína C, reteplasa, saruplasa, estreptoquinasa, tenecteplasa, y uroquinasa; inhibidores directos de la trombina, tales como argatroban, bivalirudin, desirudin, lepirudin, melagatran, y ximelagatran; otros antitrombóticos tales como dabigatran, defibrotide, dermatan sulfato, fondaparinux, y rivaroxaban; y otros tales como citrato, EDTA y oxalato.

Ejemplos de anticonvulsivos que pueden ser detectados utilizando los dispositivos, sistemas y métodos descritos aquí incluyen barbituratos tales como barbexaclona, metarbitol, polietilfenobarbital, fenobarbital, y primidona; hidantoínas tales como etotoina, fosfenitoina, mefenitoina, y fenitoina; oxazolidinadionas tales como ethadiona, parametadiona, y trimethadiona; succinimidias tales como ethosuximida, mesuximida, y phensuximida; benzodiazepinas tales como clobazam, clonazepam, clorazepato, diazepam, lorazepam, midazolam, y nitrazepam;

carboxamidas tales como carbamazepina, oxcarbazepina, rufinamida; derivados de ácidos grasos tales como valpromida y valnoctamida; ácidos carboxílicos tales como ácido valproico, tiagabina; análogos de GABA tales como gabapentina, pregabalina, progabide, y givabatrina; monosacáridos tales como topiramate; alcoholes alílicos aromáticos tales como estiripentol; ureas tales como fenacemida y feneturide; carbamatos tales como emylcamato, felbamato, y meprobamato; pirrolidinas tales como brivaracetam, levetiracetam, nefiracetam, y seletracetam; sulfas tales como acetazolamida, etoxzolamida, sultiame, y zonisamida; propionatos tales como beclamida; aldehídos tales como paraldehído; y bromuros tales como bromuro de potasio.

Ejemplos de agentes anticáncer que pueden ser detectados utilizando los dispositivos, sistema y métodos descritos aquí incluyen acivicina; aclarubicina; acodazol clorhidrato; acronina; adriamicina; adozelesin; aldesleucina; altretamina; ambomicina; ametantrone acetato; aminoglutethimide; amsacrina; anastrozol; antramicina; asparaginase; asperlin; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamide; bisantrene clorhidrato; bisnafide dimesilato; bizelesin; bleomicina sulfato; brequinar sodio; bropirimine; busulfan; cactinomicina; calusterone; caracemide; carbetimer; carboplatino; carmustina; carubicina clorhidrato; carzelesin; cedefingol; chlorambucil; cirolemicina; cisplatino; cladribina; crinamol mesilato; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; daunorrubicina clorhidrato; decitabina; dexormaplatino; dezaguanine; dezaguanine mesilato; diaziquone; docetaxel; doxorubicina; doxorubicina clorhidrato; droloxifene; droloxifene citrato; dromostanolone propionato; duazomicina; edatrexate; eflornithine clorhidrato; elsamitrucin; enloplatino; enpromate; epipropidina; epirubicina clorhidrato; erbulozol; esorubicina clorhidrato; estramustina; estramustina fosfato sodio; etanidazol; etopósido; etopósido fosfato; etoprine; fadrozol clorhidrato; fazarabina; fenretinide; floxuridina; fludarabina fosfato; fluorouracil; flurocitabina; fosquidone; fostriecin sodio; gemcitabina; gemcitabina clorhidrato; hidroxiaurea; idarrubicina clorhidrato; ifosfamida; ilmofosina; interferon alfa-2a; interferon alfa-2b; interferon alfa-n1; interferon alfa-n3; interferon beta-1 a; interferon gamma-1 b; iproplatin; irinotecan clorhidrato; lanreotide acetato; letrozol; leuprolide acetato; liarozol clorhidrato; lometrexol sodio; lomustina; losoxantrone clorhidrato; masoprocol; maytansine; mechlorethamina clorhidrato; megestrol acetato; melengestrol acetato; melphalan; menogaril; mercaptopurina; methotrexate; methotrexate sodio; metoprine; meturedpa; mitindomide; mitocarcin; mitocromin; mitogillin; mitomalcin; mitomicina; mitosper; mitotane; mitoxantrone clorhidrato; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamicina; ormaplatino; oxisuran; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; peplomicina sulfato; perfosfamida; pipobroman; piposulfan; piroxantrone clorhidrato; plicamicina; plomestane; porfimer sodio; porfiromicina; prednimustina; procarbazona clorhidrato; puromicina; puromicina clorhidrato; pyrazofurin; riboprine; roletimide; safingol; safingol clorhidrato; semustina; simtrazene; sparfosate sodio; esparsomicina; espirogermanio clorhidrato; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalan sodio; tegafur; teloxantrone clorhidrato; temoporfin; tenipósido; teroxirone; testolactone; tiamiprina; tioguanina; thiotepa; tiazofurin; tirapazamina; topotecan clorhidrato; toremifene citrato; trestolone acetato; triciribina fosfato; trimetrexate; trimetrexate glucuronato; triptorelin; tubulozol clorhidrato; mostaza de uracilo; rredpa; vapreotide; verteporfin; vinblastina sulfato; vincristine sulfato; vindesine; vindesine sulfato; vinepidina sulfato; vinglicinate sulfato; vinleurosine sulfato; vinorelbine tartrato; vinrosidina sulfato; vinzolidina sulfato; vorozol; zeniplatino; zinostatin; y zorrubicina clorhidrato.

Otras sustancias biológicamente activas que pueden ser detectadas utilizando los dispositivos, sistemas y métodos descritos aquí incluyen los mencionados en Basic and Clinical Pharmacology (LANGE Basic Science), Katzung and Katzung, ISBN 0071410929, McGraw-Hill Medical, 9th edition (2003).

40 Condiciones médicas

Pueden utilizarse realizaciones de la invención para monitorizar uno o más analitos en el diagnóstico, manejo y/o tratamiento de un amplio rango de condiciones médicas. Diversas categorías de condiciones médicas incluyen, por ejemplo, trastornos de dolor, alteraciones en temperatura corporal (por ejemplo fiebre); de disfunción del sistema nervioso (por ejemplo, síncope, mialgias, trastornos de movimiento, insensibilidad, pérdida sensorial, delirio, demencia, pérdida de memoria o trastornos del sueño); de los ojos, oídos, nariz y garganta; de las funciones circulatoria y/o respiratoria (por ejemplo, disnea, edema pulmonar, tos, hemoptisis, hipertensión, infarto del miocardio, hipoxia, cianosis, colapso cardiovascular, fallo cardiaco congestivo, edema o choque); de función gastrointestinal (por ejemplo, disfagia, diarrea, constipación, sangrado GI, ictericia, ascitis, indigestión, náusea, vomito); de la función del tracto renal y urinario (por ejemplo, acidosis, alcalosis, desbalance de fluidos y electrolitos, azotemia, o anomalías urinarias); de la función sexual y reproducción (por ejemplo, disfunción eréctil, perturbaciones menstruales, hirsutismo, virilización, infertilidad, trastornos asociados con el embarazo y mediciones estándar); de la piel (por ejemplo, eczema, psoriasis, acné, rosácea, infección cutánea, enfermedades inmunológicas de la piel o fotosensibilidad); de la sangre (por ejemplo, hematología); de los genes (por ejemplo, trastornos genéticos); de respuesta a fármacos (por ejemplo, respuestas adversas a fármacos); y de nutrición (por ejemplo, obesidad, trastornos en la alimentación o definición nutricional). Otros campos médicos con los cuales las realizaciones de la invención encuentran utilidad incluyen oncología (por ejemplo, neoplasmas, enfermedades malignas, angiogénesis, síndromes paraneoplásicos o emergencias oncológicas); hematología (por ejemplo, anemia, hemoglobinopatías, anemias megaloblásticas, anemias hemolíticas, anemia aplásica, mielodisplasia, fallo de la médula ósea, policitemia vera, enfermedades mieloproliferativas, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, enfermedades malignas linfoides, trastornos de las células plasmáticas, biología de transfusión o trasplante); hemostasis (por ejemplo, trastornos de coagulación y trombosis, o trastornos de las plaquetas y las

paredes de los vasos); y enfermedades infecciosas (por ejemplo, sepsis, choque séptico, fiebre de origen desconocido, endocarditis, picaduras, quemaduras, osteomielitis, abscesos, envenenamiento por alimentos, enfermedad inflamatoria pélvica, bacterianas (por ejemplo, gram positiva, gram negativa, mixta (nocardia, actinomicetos, mixtos), micobacteriana, por espiroquetas, rickettsia, o micoplasma); clamidia; infecciones virales (ADN, ARN), fúngicas y por algas; infecciones por protozoarios y helmintos; enfermedades endocrinas; enfermedades nutricionales; y enfermedades metabólicas.

Otras condiciones médicas y/o campos con los cuales las realizaciones encuentran utilidad incluyen aquellas mencionadas en Harrison's Principles of Internal Medicine, Kasper et al., ISBN 0071402357, McGraw-Hill Professional, 16th edition (2004), así como las mencionadas en Robbins Basic Pathology, Kumar, Cotran, y Robbins, eds., ISBN 1416025340, Elsevier, 7th edition (2005).

Pruebas médicas (por ejemplo, pruebas de sangre, pruebas de orina, y/o otras pruebas de tejidos humanos o animales) que pueden llevarse a cabo utilizando diversas realizaciones descritas aquí incluyen, por ejemplo, pruebas de química general (por ejemplo, los analitos incluyen albúmina, nitrógeno ureico en sangre, calcio, creatinina, magnesio, fósforo, proteína total y/o ácido úrico); pruebas electrolíticas (por ejemplo, los analitos incluyen sodio, potasio, cloruro y/o dióxido de carbono); pruebas para diabetes (por ejemplo, los analitos incluyen glucosa, hemoglobina A1C, y/o microalbúmina); pruebas de lípidos (por ejemplo, los analitos incluyen apolipoproteína A1, apolipoproteína B, colesterol, triglicéridos, lipoproteína de colesterol de baja densidad y/o lipoproteína de colesterol de alta densidad); definición nutricional (por ejemplo, los analitos incluyen albúmina, prealbúmina, transferrina, proteína enlazante de retinol, glicoproteína alfa1 ácida, y/o ferritina); pruebas hepáticas (por ejemplo, los analitos incluyen alanina transaminasa, albúmina, fosfatasa alcalina, aspartato transaminasa, bilirrubina directa, gammaglutamil transaminasa, lactato deshidrogenasa, inmunoglobulina A, inmunoglobulina G, inmunoglobulina M, prealbúmina, bilirrubina total y/o proteína total); pruebas cardíacas (por ejemplo, los analitos incluyen apolipoproteína A1, apolipoproteína B, troponina-1 cardíaca, creatinina quinasa, creatinina quinasa MB isoenzima, CRP de alta sensibilidad, creatinina de masa quinasa MB isoenzima mioglobina, y/o péptido natriurético procerebro con terminal N); pruebas para anemia (por ejemplo, los analitos incluyen ferritina, folato, homocisteína, haptoglobina, hierro, receptor de transferrina soluble, capacidad enlazante total de hierro, transferrina, y/o vitamina B12); pruebas pancreáticas (por ejemplo, los analitos incluyen amilasa y/o lipasa); nefropatías (por ejemplo, los analitos incluyen albúmina, alfa1-microglobulina, alfa2-macroglobulina, beta2-microglobulina, cistatina C, proteína enlazante de retinol, y/o transferrina); pruebas en huesos (por ejemplo, los analitos incluyen fosfatasa alcalina, calcio y/o fósforo); monitorización de marcadores cancerosos (por ejemplo, los analitos incluyen PSA total); pruebas para la tiroides (por ejemplo, los analitos incluyen tiroxina libre, triyodotironina libre, tiroxina, hormona estimulante de la tiroides y/o triyodotironina); pruebas de fertilidad (por ejemplo, los analitos incluyen gonadotropina coriónica beta humana); monitorización de fármacos terapéuticos (por ejemplo, los analitos incluyen carbamazepina, digoxina, digitoxina, gentamicina, lidocaina, litio, N-acetil procainamida, fenobarbital, fenitoina, procainamida, teofilina, tobramicina, ácido valproico, y/o vancomicina); fármacos inmunosupresores (por ejemplo, los analitos incluyen ciclosporina A, sirolimus, y/o tacrolimus); pruebas para actividad de complemento y/o enfermedad autoinmune (por ejemplo, los analitos incluyen complemento C3, complemento C4, inhibidor C1, proteína reactiva C, y/o factor reumatoide); gamopatías policlonales/monoclonales (por ejemplo, los analitos incluyen inmunoglobulina A, inmunoglobulina G, inmunoglobulina M, cadenas ligeras 1 g tipo kappa y/o lambda, subclases de inmunoglobulina G 1, 2, 3, y/o 4); pruebas para enfermedades infecciosas (por ejemplo, los analitos incluyen antistreptolisina O); pruebas para trastornos inflamatorios (por ejemplo, los analitos incluyen glicoproteína ácida alfa1-antitripsina, celuloplasma, proteína reactiva C y/o haptoglobina); pruebas de alergia (por ejemplo, los analitos incluyen inmunoglobulina E); pruebas para proteína en orina (por ejemplo, los analitos incluyen alfa1-microglobulina, inmunoglobulina G, cadenas livianas 1 g tipo kappa y/o lambda, microalbúmina, y/o fluido proteínico urinario/cerebroespinal); pruebas para proteínas-CSF (por ejemplo, los analitos incluyen inmunoglobulina G y/o proteína en fluido urinario/cerebroespinal); pruebas de toxicología (por ejemplo, los analitos incluyen acetaminofén en suero, barbituratos en suero, benzodiacepinas en suero, salicilato en suero, antidepresivos tricíclicos en suero y/o alcohol etílico en la orina); y/o pruebas para fármacos de abuso (por ejemplo, los analitos incluyen anfetamina, cocaína, barbituratos, benzodiacepinas, éxtasis, metadona, opiato, penicilidina, tetrahidrocanabinoides, propoxifeno y/o metacualona). Marcadores específicos para cáncer que pueden ser detectados usando los métodos, dispositivos, cartuchos y kits descritos aquí incluyen, sin limitación, 17-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1, Abl interactuador 2, Proteína relacionada con actina 2/3 subunidad compleja 1A, Albúmina, Aldolasa A, Fosfatasa alcalina, tipo placenta, Alfa 1 antitripsina, Alfa -1-ácidoglicoproteína 1, Alfa -2-HS-glicoproteína, Alfa lactalbúmina, Alfa-2-macroglobulina, Alfa-fetoproteína (AFP), Angiogenina ribonucleasa familia RNasa A 5, Angiopoyetina 1, Angiopoyetina 2, Antígeno identificado por anticuerpo monoclonal Ki-67, Antileucoproteínasa 1 (SLPI), Apolipoproteína A1, ATP7B, β 2-microglobulina, Células B, CLL/linfoma 2, proteína X asociada a BCL2, BRCA1, BRCA2, BrMS1, transcripto 1 inducido por butirato, CA15.3/CA27-29, Antígeno de cáncer 125, Antígeno de cáncer 15.3, Antígeno de cáncer 19.9, Antígeno de cáncer 602, Antígeno de cáncer 72-4/TAG-72, antígeno galactotransferasa asociado con cáncer, antígeno de suero asociado con cáncer (CASA), antígeno Carcinoembrionario (CEA), Catenin beta 1, Catepsina D, Catepsina miembro 8, CC quimioquina 4 (HCC-4), CCL21 (citoquina pequeña inducible A21), CCL5, CD15, CD24, CD34, CD44, proteína quinasa 5 de división celular, ceruloplasma, 1 proteína protooncogénica de cáncer cervical p40, c-Ets1, Chaparonina con TCP1, subunidad 3, Quimioquina (motivo c-c) ligando 4, citoquina pequeña inducible A4 (CCL4, MIP-1-beta), Quimioquina ligando 5, proteína 1 tipo quitinasa 3(YKL-40), Canal intracelular de cloruros 4

(CLIC4), cadena de Coriogonadotropina beta, Claudin-3, Claudina-4, clusterina, Factor de coagulación II (protrombina), Factor de coagulación III, cadena a del Factor de coagulación XIII, cadena b del Factor de coagulación XIII, péptido terminal C de colágeno I, Factor estimulante de colonias 2, Factor estimulante de colonias 3, Componente de complemento 3, proteína C reactiva, Creatinina quinasa cerebro (CKB), CTD pequeña tipo fosfatasa, Ciclina D1, quinasa 6 dependiente de ciclina (CDK 6), inhibidor 1 de quinasa dependiente de ciclina (p21), Ciclooxygenasa -1, Citocromo c oxidasa Va, Citocromo c-1, Desmina, Distroglicano 1, Endogлина, Endotelina 1, (EGFR), Factor de crecimiento epidérmico (EGF), Eritropoyetina, E-selectina, EST variante de traslocación 4 (EST 4), Inductor de metaloproteínasa de la matriz extracelular(EMMPRN), Ferritina H, Ferritina L, Factor de crecimiento de fibroblastos 2, fibronectina, ligando Fit-3, Fluorodesoxiglucosa-PET (FDG-PET) con CA125, tirosina quinasa 1 relacionada con Fms (VEGFR-1), GADD45A, Geminina, Glifosato N-acetiltransferasa, precursor de Granulin-epitelina (GEP), Factor de diferenciación de crecimiento 15, Haptoglobina 1, Haptoglobulina –subunidad a, HE4 (proteína epidimis humana), Her2, HER2-neu, hK10, hK11, hK13, hk6, hk7, hk8, HLA clase II Doβ, hLMH1, hLMH2, TNF-1β, Gonadotropina coriónica humana- subunidad β, Gonadotropina coriónica humana (hCG), IGFBP-2, IL-2R alfa (receptor alfa soluble de interleucina 2), inmunoglobulinas, proteína ácida inmunosupresora (1AP), Indoleamina 2,3-dioxigenasa, proteína 1 de enlazamiento a factor de crecimiento tipo insulina, proteína 2 de enlazamiento a factor de crecimiento tipo insulina, proteína 3 de enlazamiento a factor de crecimiento tipo insulina, Integrina α-V, Integrina αvβ6, Molécula de adhesión intercelular, Interferon alfa 1, Interleucina 1 alfa, Interleucina 1 beta, Interleucina 10, Interleucina 12A, Interleucina 16, fragmento inhibidor de Inter-α-tripsina Kallikreina 8, Queratina, Queratina 18, Queratina, tipo I citoesquelética 19 (citoqueratina 19), Kit de ligando, KRAS, Lactotransferrina, Laminina-β3, Leptilselectina, receptor de hormona liberadora de la hormona luteinizante, proteína de 90k de enlazamiento a Mac-2, factor estimulante de colonias de macrófagos, factor inhibidor de migración de macrófagos, antígeno de suero mamario, Mamoglobina B, M-CAM, MIR21, Mesotelina, MMP3, antígeno de glicoproteína tipo mucina, Miosina X, factor beta de crecimiento de nervios, Netrina-1, proteína-55 secretora neuroendocrina, defensina 1 de neutrófilos, defensina 3 de neutrófilos, Nm23-H1, proteína 2 de células no metálicas, proteína 1 de células no metálicas (NM23A), dominio de O-aciltransferasa que contiene 2, OVX1, OX40, P53, Paraoxonase 2, Pcaf, p-glicoproteína, fosforribosilaminoimidazol carboxilasa, receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas, receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas, molécula de adhesión celular endotelial de plaquetas (PECAM-1), factor 4 de plaquetas, proteína A de plasma asociado con embarazo, proteína de zona de embarazo, Procol-lys 1,2 oxoglut 5-digoxig 3, Procol-lys 1,2 oxoglute 5-digoxig 1, receptor Progesterona (PR), Prolactina, proteína secretora de la próstata PSP94, antígeno específico de la próstata (PSA), Prostatina, proteína 1 de enlazamiento a Proteína quinasa C, p-selectina, Pirrolina-5-carboxilato reductasa 1, regulador de la señalización 12 de proteína G, Reticulocalbina, S-100 cadena alfa, s-adenosilhomocisteína hidrolasa, proteína A amiloide de suero, siete proteínas de dominio transmembrana, factor determinante del sexo Y-caja-4, Sialyl SSEA-1, Citoquina pequeña inducible A18 (CCL18, M1P-4), Citoquina pequeña inducible A2 (CCL2), Citoquina pequeña inducible A3 (CCL3) (proteína 1-alfa inflamatoria de macrófago, Citoquina pequeña inducible B5 (CXCL5), Somatostatina, factor de crecimiento de Somatotropina, antígeno 1 de carcinoma de células escamosas, antígeno 2 de carcinoma de células escamosas, receptores de hormonas esteroidales, Survivina, Syndecan-1, Sinucleína gamma, Tetranectina, Tetraspanina 9, TGF-α, timidina fosforilasa (TP), tiroglobulina (Tg), inhibidor de tejido de metaloproteinasas 2, antígeno P35B de trasplante específico para tejido, activador (tPA) de plasminógeno tipo tejido, topoisomerasa II, receptor de transferencia p90 CD71, factor alfa de crecimiento transformante, factor beta 1 de crecimiento transformante, translocasa de membrana de mitocondria externa, Transtirretina, fragmento de Transtirretina (realbúmina), glicoproteína de trofoblastos, Tropomiosina 1 cadena alfa (alfa-tropomiosina), Tripsina, Tubulina β2, Tubulina β3, miembro 5 de la superfamilia de factor del necrosis tumoral (ligando) (CD154), miembro 6 de superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando) (ligando Fas), factor alfa de necrosis tumoral, factor de receptor p75/p55 de necrosis tumoral, factor de receptor del miembro 6 de superfamilia de necrosis tumoral (fas), proteína 1 asociada al receptor del factor de necrosis tumoral, proteína p53 tumoral, enzima E2C de conjugación con ubiquitina (enzima conjugadora de ubiquitina), angiostatina urinaria (uAS), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor promotor del crecimiento vascular en músculos lisos (VSGPIF-Spondin), VEGF (165) b, V-erb-b2, proteína enlazante de Vitamina D, proteína C dependiente de Vitamina K, Vitronectina, factor de Von Willebrand, tumor 1 de Wilms (WT-1), proteína 11 de enlazamiento de dominio WW, proteína 1 de enlazamiento de caja X y YKL-40. Véase Polanski et al., Biomarker Insights, 1:1 (2006); Cherneva et al., Biotechnol. & Biotechnol. EQ. 21/2007/2:145 (2007); Alaoui-Jamali et al., J. Zhejiang Science B 7:411 (2006); Basil et al., Cancer Res. 66:2953 (2006); Suh et al., Expert Rev. Mol. Diagn. 10:1069 (2010); y Diamandis, E. P., Molecular and Cellular Proteomics 3:367 (2004).

Otros analitos que pueden ser detectados utilizando los dispositivos, sistemas y métodos descritos aquí incluyen los mencionados en Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, Burtis, Ashwood, y Bruns, ISBN 0721601898, Elsevier, 4th edition (2006).

Los métodos de la invención pueden ser configurados para detectar un panel de combinación predeterminado de analitos que puede ser utilizado para entender la condición médica del sujeto. Por ejemplo, un panel de combinación puede incluir la detección de patógenos, agentes terapéuticos usados para tratar los patógenos en sospecha, y un biomarcador potencial para monitorizar el proceso farmacológico terapéutico (eficacia o farmacocinética), o monitorizar la presencia del patógeno o subproductos del patógeno. Adicionalmente, se podría prever un panel de tratamiento de la enfermedad configurado para utilizar para la detección de una enfermedad o un biomarcador de enfermedad, el nivel de concentración de un fármaco terapéutico para uso en el tratamiento de la enfermedad

sospechada, un biomarcador potencial para monitorizar el progreso farmacológico terapéutico (eficacia o farmacocinética), y un biomarcador de química general u otro marcador fisiológico de la enfermedad o efecto del tratamiento. De esta manera, los paneles para la detección de analitos pueden utilizarse para informar y guiar hacia una decisión médica apropiada.

5 Por ejemplo, los sistemas y métodos descritos pueden ser utilizados para monitorizar sujetos inmunocomprometidos después de trasplante alogeneico. En sujetos de trasplante que reciben un órgano sólido, médula ósea, células madre hematopoyéticas u otras donaciones alogeneicas, hay necesidad de monitorizar el estado inmune, la función de los órganos y, si es necesario, identificar rápida y exactamente las infecciones oportunistas. El tacrolimus (también FK-506, Prograf, o Fujimicina) es un fármaco inmunosupresor cuyo principal uso es después del trasplante de órganos alogeneicos reducir la actividad del sistema inmune del sujeto y así disminuir el riesgo de rechazo del órgano. Reduce la producción de interleucina-2 (IL-2) por las células T. También se utiliza en una preparación tópica en el tratamiento de dermatitis atópica severa (eczema), uveítis refractaria severa después de trasplante de médula ósea, y la condición de la piel conocida como vitiligo. Es una macrólida lactona de 23 miembros descubierta en 1984 a partir del caldo de fermentación de una muestra de suelo Japonés que contenía la bacteria *Streptomyces tsukubaensis*. Tiene propiedades inmunosupresoras similares a la ciclosporina, pero mucho más potente en volúmenes iguales. La inmunosupresión con tacrolimus fue asociada con una rata significativamente inferior de rechazo agudo en comparación con la inmunosupresión basada en ciclosporina (30.7% versus 46.4%) en un estudio. El rendimiento a largo plazo no ha sido mejorado en el mismo nivel. El tacrolimus normalmente es prescrito como parte de un coctel postrasplante que incluye esteroides, micofenolato e inhibidores del receptor de IL-2. Las dosificaciones se titulan para direccionar los niveles sanguíneos. Los efectos laterales pueden ser severos e incluyen infección, daño cardíaco, hipertensión, visión borrosa, problemas de hígado y riñón, ataques, temores, hipercalcemia, hipomagnesemia, hiperglicemia, diabetes mellitus, picazón, insomnio y problemas neurológicos tales como confusión, pérdida de apetito, debilidad, depresión, calambres y neuropatía. Además el tacrolimus puede incrementar potencialmente la severidad de condiciones fúngicas o infecciosas existentes, tales como herpes zoster o infecciones virales de polio, y ciertas reacciones cruzadas de antibióticos con tacrolimus.

La medición de la creatinina en suero es una prueba simple y es el indicador más comúnmente utilizado de la función renal. Una elevación en los niveles de creatinina en sangre se observa solamente con daño marcado a los nefrones en funcionamiento. Por lo tanto, esta prueba no es adecuada para detectar una enfermedad renal en etapa temprana. Una estimación mejor de la función renal es dada por la prueba de eliminación de creatinina. La eliminación de creatinina puede calcularse exactamente utilizando la concentración de creatinina en suero y una parte o todas las siguientes variables; sexo, edad, peso y raza tal como lo sugiere la American Diabetes Association sin recolección de orina durante 24 horas. Algunos laboratorios calcularán la eliminación de creatinina si está escrita en la forma de solicitud de patología; y, la edad, sexo y peso necesario si están incluidas en la información para el sujeto.

35 Hay una necesidad de monitorizar los niveles de creatinina y tacrolimus a partir de la misma muestra de sangre de un sujeto puesto que la monitorización de la concentración del fármaco y la función renal pueden ayudar y guiar al médico para una terapia óptima postrasplante. La terapia de optimización es un balance ajustado para prevenir el rechazo pero también para asegurar la función inmune con el fin de combatir infecciones oportunistas y los resultados globales en el cumplimiento potenciado del sujeto de la terapia inmunosupresora. En gran parte, los receptores de trasplantes sucumben al rechazo del trasplante, a la enfermedad de injerto versus anfitrión, o a las infecciones oportunistas. En las primeras dos, los agentes inmunosupresores pueden anular o inhibir las reacciones. Sin embargo, si el sujeto tiene una infección subyacente, entonces el manejo clínico es un reto. Para un ejemplo específico, un sujeto de trasplante de corazón, o de pulmón que presente fiebre de origen desconocido entra en una instalación para el cuidado de la salud. El sujeto es iniciado con antibióticos de amplio espectro hasta que se conocen los resultados de los cultivos. Si la condición empeora y el cultivo revela una infección específica, por ejemplo una *Candida*, puede administrarse un antifúngico específico, fluconazol, al sujeto conocido. Sin embargo, este antifúngico puede alterar los niveles del agente inmunosupresor dado a casi todos los receptores de trasplantes alogeneicos, tacrolimus. Al probar ambos niveles de tacrolimus y creatinina, el médico suspende el tacrolimus, creyendo que el fluconazol derrotará la infección, y de manera rápida. Bajo este régimen, el sujeto puede empeorar y la especie de *Candida* es resistente a fluconazol, y el sujeto entonces es iniciado con un agente antifúngico apropiado. Sin embargo, puesto que el tacrolimus puede ser suspendido, la terapia inmunosupresora no es manejada y el sujeto puede dejar de responder a cualquier terapia adicional y puede sobrevenir la muerte. Así, si hubiera una prueba para monitorizar simultáneamente la creatinina (función renal), los niveles en sangre de tacrolimus y la identificación exacta de las infecciones oportunistas, el sujeto anterior podría haber sido salvado.

55 Los métodos de la invención pueden incluir un sistema automatizado de un método de detección sencillo, sin preparación de muestra, multiplex para determinar el nivel de fármaco, la toxicidad o efecto adverso determinante, y la identificación del patógeno que tiene un papel crítico en la definición del sujeto inmunocomprometido. Por ejemplo, un cartucho que tiene portales o pozos que contienen 1) partículas magnéticas que tienen anticuerpos específicos para la creatinina cubiertas en su superficie, 2) partículas magnéticas que tienen anticuerpos específicos de tacrolimus sobre su superficie, y 3) partículas magnéticas que tienen sondas de ácidos nucleicos específicas para identificar especies de patógenos podrían ser empleadas para determinar rápidamente y proveer valores de manejo

clínico para un sujeto de trasplante dado. Las infecciones oportunistas que pueden ser monitorizadas en tales sujetos, y cualquier otra población de pacientes en riesgo de infección incluyen, sin limitación, infecciones fúngicas; *Candida* (cepas resistentes y no resistentes); infecciones bacterianas con gram negativos, (por ejemplo, *E. coli*, *estenotrofomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae/oxytoca*, o *Pseudomonas aeruginosa*); y otras infecciones bacteriana gram positivas (por ejemplo, especies de *Staphylococcus*: *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. faecalis*, y *E. faecium*). Otras infecciones oportunistas que pueden ser monitorizadas incluyen *staphylococcus* negativos a coagulasa, *Corynebacterium* spp., *Fusobacterium* spp., y *Morganella morganii*, y organismos virales, tales como CMV, BKV, EBC, HHV-6, HIV, HCV, HBV, y HAV.

Los sistemas y métodos descritos también pueden ser utilizados para monitorizar y diagnosticar pacientes de cáncer como parte de una prueba diagnóstica multiplex. Una forma específica de cáncer, el cáncer colorrectal, ha demostrado ser una promesa positiva para tratamiento médico personalizado para un tumor sólido específico. Pueden utilizarse marcadores farmacogénéticos para optimizar el tratamiento de los cánceres colorrectales y otros. Existe una variación genética individual significativa en el metabolismo de fármacos de 5FU, capecitabina, irinotecan, y oxaliplatino que influye tanto en la toxicidad como eficacia de estos agentes. Ejemplos específicos de marcadores genéticos incluyen UGT1A1*28 que llevan a la conjugación reducida de SN-38, el metabolito activo de irinotecan, dando como resultado una rata incrementada de efectos adverso, especialmente neutropenia. En un grado menor, la toxicidad incrementada de 5-FU es predicha por DPYD*2A. Un número variable de polimorfismos repetidos en tándem en la región potenciadora de la timidilato sintasa, en combinación con un polimorfismo de nucleótidos sencillo C>G, puede predecir una respuesta más pobre a 5-FU. La eficacia del oxaliplatino es influida por polimorfismos en componentes de sistemas de reparación de ADN, tales como ERCC1 y XRCC1. Los cambios polimórficos en el receptor de factor del crecimiento endotelial predicen probablemente la eficacia del cetuximab. Adicionalmente, el efecto citotóxico mediado por células dependiente de anticuerpos del cetuximab puede ser reducido por polimorfismos en los receptores C del fragmento de inmunoglobulina G. Los cambios polimórficos en el gen VEGF y el gen 1 alfa del factor inducible por hipoxia también se consideran como participantes en la variabilidad del resultado de la terapia. Así, la identificación de tales polimorfismos en sujetos puede ser utilizada para ayudar a los médicos con las decisiones acerca del tratamiento. Por ejemplo, se han desarrollado pruebas genéticas basadas en PCR para ayudar a los médicos con las decisiones acerca de los tratamientos terapéuticos para sujetos con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer colorrectal (CRC) y cáncer gástrico. La expresión de ERCC1, TS, EGFR, RRM1, VEGFR2, HER2, y la detección de mutaciones en KRAS, EGFR, y BRAF están disponibles para los médicos con el fin de identificar la opción terapéutica óptima. Sin embargo, estas pruebas por PCR no están disponibles en el sitio y así la muestra debe ser enviada a un laboratorio externo. Frecuentemente se hace biopsia de estos tumores sólidos y se preparan muestras FFPE (fijadas en formalina, (tejido) embebido en parafina). Los sistemas y métodos descritos pueden ser usados durante 5-7 días para obtener los datos e información y usar las muestras fijadas requeridas para los métodos existentes. Los sistemas y métodos descritos pueden proveer una plataforma sencilla para analizar muestras, sin preparación de las muestras, para tipo de analito múltiples, como en cáncer para fármacos quimioterapéuticos, genotipificación, toxicidad y marcadores de eficacia lo que puede revolucionar la práctica de la medicina personalizada y proveer una prueba diagnóstica rápida y exacta.

Los sistemas y métodos también pueden ser utilizados para monitorizar y diagnosticar enfermedades neurológicas, tales como demencia (una pérdida de capacidad cognitiva en una persona previamente incapacitada) y otras formas de incapacidad cognitiva. Sin establecer cuidadosamente la historia, el síndrome a plazo corto de delirio (que frecuentemente dura de días a semanas) puede confundirse fácilmente con la demencia, porque tienen todos los síntomas en común excepto la duración, y el hecho de que el delirio está frecuentemente asociado con sobreactividad del sistema nervioso simpático. Algunas enfermedades mentales, incluyendo la depresión y la psicosis, también pueden producir síntomas que deben de ser diferenciados tanto del delirio como de la demencia. También se llevan a cabo pruebas sanguíneas de rutina para establecer causas tratables. Estas pruebas incluyen vitamina B12, ácido fólico, hormona estimulante de la tiroides (TSH), proteína reactiva C, recuento sanguíneo completo, electrolitos, calcio, función renal y enzimas del hígado. Las anomalías pueden sugerir deficiencia de vitaminas, infección u otros problemas que producen comúnmente confusión o desorientación en los mayores. El problema se complica por el hecho de que estos causan confusión más frecuentemente en personas que tienen demencia temprana, de tal manera que la "reversión" de tales problemas puede finalmente ser solo temporal. Las pruebas para alcohol y otros fármacos conocidos por inducir demencia pueden estar indicadas. Los inhibidores de acetilcolinesterasa-Tacrina (Cognex), donepezil (Aricept), galantamina (Razadyne), y rivastigmina (Exelon) son aprobadas por la United States Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de demencia inducida por la enfermedad de Alzheimer. Pueden ser útiles para otras enfermedades similares que producen demencia tales como Parkinson o demencia vascular. Los bloqueadores de N-metil-D-aspartato incluyen memantina (Namenda), la cual es un fármaco representativo de esta clase. Puede utilizarse en combinación con inhibidores de acetilcolinesterasa. Los inhibidores del depósito de amiloides incluyen minociclina y clioquinolina, los cuales son antibióticos que pueden ayudar a reducir los depósitos amiloides en los cerebros de las personas con enfermedad de Alzheimer. La depresión está asociada frecuentemente con la demencia y en general empeora el grado de incapacidad cognitiva y de comportamiento. Los antidepresivos tratan efectivamente los síntomas cognitivos y de comportamiento de la depresión en sujetos con enfermedad de Alzheimer, pero las evidencias para su uso en otras formas de demencia es débil. Muchos sujetos con demencia experimentan síntomas de ansiedad. Aunque las benzodiacepinas como el diazepam (Valium) han sido utilizadas para tratar la ansiedad en otras situaciones, frecuentemente se evitan porque

pueden incrementar la agitación en personas con demencia y probablemente empeoren los problemas cognitivos o son demasiado sedantes. La Buspirona (Buspar) es ensayada inicialmente con frecuencia para ansiedad media a moderada. Hay poca evidencia sobre la efectividad de las benzodiazepinas en la demencia, mientras que hay evidencia para la efectividad de los antipsicóticos (a bajas dosis). La selegilina, un fármaco utilizado principalmente en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, parece hacer más lento el desarrollo de la demencia. Se considera que la selegilina actúa como un antioxidante, previniendo el daño por radicales libres. Sin embargo, también actúa como un estimulante, haciendo difícil determinar si el retardo en la aparición de los síntomas de la demencia es debido a la protección frente a los radicales libres o a la elevación general de la actividad cerebral proveniente del efecto estimulante. Tanto los antipsicóticos típicos (tales como el haloperidol) como los antipsicóticos atípicos tales como (risperidona) incrementan el riesgo de muerte en psicosis asociada con demencia. Esto significa que cualquier uso de la medicación antipsicótica para psicosis asociada con la demencia está fuera de las recomendaciones y solo debería ser considerada después de discutir los riesgos y beneficios del tratamiento con estos fármacos y después de que hayan fallado otras modalidades de tratamiento. En el Reino Unido alrededor de 144,000 pacientes de demencia son preescritos innecesariamente con fármacos antipsicóticos, alrededor 2,000 sujetos mueren como resultado del consumo de fármacos cada año. La demencia puede ser categorizada ampliamente en dos grupos: demencias corticales y demencias subcorticales. Las demencias corticales incluyen: la enfermedad de Alzheimer, demencia vascular (también conocida como demencia por multinfartos), incluyendo la enfermedad de Binswanger, demencia con cuerpos de Lewy (DLB), demencia persistente inducida por alcohol, síndrome de Korsakoff, encefalopatía de Wernicke, degeneraciones lobulares frontotemporales (FTLD), incluyendo la enfermedad de Pick, demencia frontotemporal (o variante frontal FTLD), demencia semántica (o variante FTLD temporal), afasia no fluida progresiva, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, demencia pugilística, enfermedad de Moyamoya, tebestia (frecuentemente confundida con un cáncer), atrofia cortical posterior o síndrome de Benson. Las demencias subcorticales incluyen la demencia debido a la enfermedad de Huntington, la demencia debida a hipotiroidismo, demencia debida a la enfermedad de Parkinson, demencia debida a la deficiencia de vitamina B1, la demencia debida a la deficiencia de vitamina B12, la demencia debida a la deficiencia de folato, la demencia debida a sífilis, demencia debida a hematomas subdural, la demencia debida a hipercalcemia, la demencia debida a hipoglicemia, el complejo demencia SIDA, pseudodemencia (un episodio depresivo principal con síntomas cognitivos prominentes), demencia persistente inducida por abstinencia (relacionada con el uso psicoactivo y ausentismo temprano), demencia debida a etiologías múltiples, demencia debida a otras condiciones médicas generales (por ejemplo, fallo renal en etapa terminal, enfermedad cardiovascular, etc.), o demencia no especificada de otra manera (utilizada en casos donde no se satisfacen criterios específicos). La enfermedad de Alzheimer es una forma común de demencia. Hay tres compañías que actualmente ofrecen pruebas de diagnóstico solamente para investigación de proteínas (Satoris), variantes de empalme (Exonhit), o niveles de expresión de proteínas (Diagenic) en sujetos que sufren de demencia, enfermedad de Lewy Body, o incapacidad cognitiva moderada. Puesto que la demencia está asociada fundamentalmente con muchas enfermedades neurodegenerativas, la capacidad para probar estas proteínas, como biomarcadores para la enfermedad, junto con niveles de fármacos o metabolitos de fármacos en una plataforma sencilla ayudará a los médicos a ajustar la dosificación, alterar un régimen, o en general monitorizar la progresión de la enfermedad. Estas pruebas se llevan a cabo corrientemente en localizaciones alejadas del sujeto y del proveedor de salud. Así, para tener la capacidad de monitorizar los niveles de fármaco y el biomarcador en el mismo sistema de detección, en el sitio se proveerá una ventaja enorme para esta enfermedad debilitante y devastadora. El método de la invención puede ser multiplex, sin preparación de muestras, con un método de detección sencillo, un sistema automatizado para determinar el nivel de fármaco, la toxicidad o efectos adversos determinantes y el biomarcador potencial de la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, un cartucho que tenga portales o pozos que contengan 1) partículas magnéticas que tengan anticuerpos específicos para biomarcadores proteínicos decorados en su superficie, 2) partículas magnéticas que tengan anticuerpos específicos sobre su superficie y 3) partículas magnéticas que tengan sondas específicas para ácidos nucleicos para identificar los niveles de expresión de proteína podrían emplearse para determinar rápidamente y proveer valores de manejo clínico para un sujeto con demencia dado.

Los métodos de la invención también pueden ser utilizados para monitorizar y diagnosticar enfermedades infecciosas en un sistema multiplex, automatizado sin preparación de muestra. Ejemplos de patógenos que pueden ser detectados utilizando los dispositivos, sistemas y métodos de la invención incluyen por ejemplo, *Candida* (cepas resistentes y no resistentes), por ejemplo, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, y *C. parapsilosis*; *A. fumigatus*; *E. coli*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae/oxytoca*, *P. aeruginosa*; *Staphylococcus* spp. (e.g., *S. aureus* o *S. pneumoniae*); *E. faecalis*, *E. faecium*, *staphylococcus* spp. Negativos a coagulasa, *Corynebacterium* spp., *Fusobacterium* spp., *Morganella morganii*, *Pneumocystis jirovecii*, conocidas previamente como *pneumocystis carinii*, *F. hominis*, *streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Poliomavirus JC* *poliomavirus* (el virus que produce la leucoencefalopatía multifocal progresiva), *Acinetobacter baumannii*, *Toxoplasma gondii*, *Citomegalovirus*, *Aspergillus* spp., *Kaposi's Sarcoma*, *cryptosporidium*, *Cryptococcus neoformans*, y *Histoplasma capsulatum*, entre otros organismos infecciosos de bacterias, levaduras, fúngicos, virus, priones, mohos, actinomicetos, protozoarios, parasíticos, protistos y helmínticos.

Los métodos de la invención también pueden ser utilizados para identificar y monitorizar la patogénesis de la enfermedad en un sujeto, para seleccionar intervenciones terapéuticas, y para monitorizar la efectividad del tratamiento seleccionado. Por ejemplo, para un paciente que tiene o está en riesgo de una infección viral, los

métodos de la invención pueden ser utilizados para identificar el virus infeccioso, la carga viral y para monitorizar el recuento de glóbulos blancos y/o biomarcadores indicativos del estado de la infección. La identidad del virus puede ser utilizada para seleccionar una terapia apropiada. La intervención terapéutica (por ejemplo, un agente antiviral particular) puede ser monitorizada también para correlacionar el régimen de tratamiento con la concentración
5 circulante de agente antiviral y carga viral para asegurar que el paciente está respondiendo al tratamiento.

Los métodos de la invención pueden ser utilizados para monitorizar una infección viral en un sujeto, por ejemplo, con un panel viral configurado para detectar citomegalovirus ((CMV), virus de Epstein Barr, virus BK, virus de hepatitis B, virus de hepatitis C, virus de Herpes simplex (HSV), HSV1, HSV2, Virus respiratorio sincicial (RSV), Influenza; Influenza A, Influenza A subtipo H1, Influenza A subtipo H3, Influenza B, Human Herpes Virus 6, Human Herpes
10 Virus 8, Human Metapneumovirus (hMPV), Rhinovirus, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2, Parainfluenza 3, y Adenovirus. Los métodos de la invención pueden ser usados para monitorizar una terapia adecuada para el sujeto con una infección viral (e.g., Abacavir, Aciclovir, Aciclovir, Adefovir, Amantadine, Amprenavir, Ampligen, Arbidol, Atazanavir, Atripla, Boceprevir, Cidofovir, Combivir, Darunavir, Delavirdine, Didanosine, Docosanol, Edoxudine, Efavirenz, Emtricitabina, Enfuvirtide, Entecavir, Famciclovir, Fomivirsen, Fosamprenavir, Foscarnet, Fosfonet, Ganciclovir, Ibacitabina, Imunovir, Idoxuridina, Imiquimod, Indinavir, Inosine, inhibidor de integrasa, Interferon tipo III, Interferon tipo II, Interferon tipo I, Interferon α , Interferon β , Lamivudine, Lopinavir, Loviride, Maraviroc, Moroxydine, Methisazone, Nelfinavir, Nevirapine, Nexavir, análogos de nucleósidos, Oseltamivir (Tamiflu), Peginterferon alfa-2a, Penciclovir, Peramivir, Pleconaril, Podophyllotoxin, Raltegravir, inhibidor de transcriptasa reversa, Ribavirin, Rimantadine, Ritonavir, Pyramidina, Saquinavir, Stavudine, aceite de árbol del té, Tenofovir, Tenofovir disoproxil, Tipranavir, Trifluridina, Trizivir, Tromantadine, Truvada, Valaciclovir (Valtrex), Valganciclovir, Vicriviroc, Vidarabina, Viramidina, Zalcitabina, Zanamivir (Relenza), o Zidovudine), y para monitorizar la concentración circulante del agente
15 terapéutico administrado al sujeto.

Los métodos de la invención también pueden ser utilizados para monitorizar pacientes con VIH/SIDA. Cuando los médicos sospechan de una infección aguda (por ejemplo, un sujeto con un reporte de comportamiento de riesgo reciente en asociación con síntomas y signos del síndrome retroviral agudo), se lleva a cabo usualmente una prueba de ARN HIV. Los altos niveles de ARN de HIV detectados en plasma a través del uso de ensayos de amplificación sensibles (PCR, bDNA, o NASBA), en combinación con una prueba de anticuerpo de HIV negativo o indeterminado, soporta el diagnóstico de infección por HIV aguda. Los resultados de PCR positivos de bajo nivel (<5000 copias/mL) frecuentemente no son diagnóstico de infección aguda por HIV y deberían repetirse para excluir un resultado de falso positivo. Los niveles de ARN de HIV tienden a ser muy altos en una infección aguda. Sin embargo un valor bajo puede representar cualquier punto de la pendiente ascendente o descendente de la viremia asociada con la infección aguda. Los niveles de ARN de HIV en plasma durante la seroconversión no parecen significativamente diferentes en sujetos que tienen síntomas agudos versus aquellos que son asintomáticos. La viremia ocurre aproximadamente 2 semanas antes de la detección de una respuesta inmune específica en los sujetos diagnosticados con infección por VIH aguda por ARN VIH. Los síntomas de fiebre y similares a resfriado son comunes en la infección aguda por HIV pero lo son picazón no específica, úlceras mucocutáneas o candidiasis faríngea y meningismo son más específicos y deberían elevar el índice de pruebas de sospecha que requieren todavía pruebas de antibióticos con inmunoprecipitación Western de confirmación a 3 a 6 semanas más tarde.
25

Los sujetos que pasan por la prueba de VIH que no se sospecha que estén en etapas agudas de infección deberían recibir la prueba de anticuerpos de VIH de acuerdo con el protocolo estándar. Los resultados de las pruebas de anticuerpos que inicialmente son negativas deberían ser seguidos con pruebas para anticuerpos de VIH a los 3 meses para identificar la infección por VIH en individuos que pueden no haber sido seroconvertidos en el momento de la presentación inicial. Los niveles de ARN de VIH en plasma indican la magnitud de la replicación del VIH y su rata asociada de destrucción de células T CD4+ mientras que los recuentos de células T CD4+ indican el grado del daño inmune inducido por VIH ya sufrido. La medición regular periódica de los niveles de ARN de VIH en plasma y del recuento de células T CD4+ es necesaria para determinar el riesgo de progresión de la enfermedad en un individuo infectado por VIH para determinar cuando iniciar o modificar los regímenes de tratamiento antirretrovirales.
30

A medida que las ratas de progresión de la enfermedad difieren entre individuos, las decisiones sobre el tratamiento deberían ser individualizadas por el nivel de riesgo indicado por los niveles de ARN de VIH en plasma y recuentos de células T CD4+. Las guías y recomendaciones actuales de la OMS para la terapia para VIH incluyen una combinación de los siguientes fármacos, AZT (zidovudina), 3TC (lamivudina), ABC (abacavir), ATV (atazanavir), d4T (estavudina), ddI (didanosina), NVP (nevirapina), EFV (efavirenz), FTC (emtricitabina), LPV (lopinavir), RTV (ritonavir), TDF (tenofovir disoproxil fumarato) en regímenes establecidos. La terapia con fármacos para el VIH es un inicio en sujetos que tienen un recuento de CD4 < 350 células/mm³ independiente de los síntomas clínicos. Al menos uno de los cuatro siguientes regímenes para sujetos aún no sometidos a tratamiento antirretroviral comienza: 1) AZT + 3TC + EFV, 2) AZT + 3TC + NVP, 3) TDF + 3TC o FTC+EFV, o 4) TDF + 3TC ir FTC + NVP. Estos regímenes evitan que la d4T (estavudina) limite la toxicidad desfigurante, no placentera y potencialmente amenazante para la vida de este fármaco. El fallo del tratamiento usualmente se determina por la carga viral, un valor persistente de 5,000 copias/ml confirma el fallo del tratamiento. En casos donde la medición de la carga viral no está disponible, los criterios inmunológicos (recuentos de células CD4) pueden utilizarse para determinar el progreso terapéutico. En casos de fallo del tratamiento, se agregan un inhibidor de proteasa potenciado más dos
35
40
45
50
55
60

análogos de nucleósidos al régimen y se considera una terapia antirretroviral de segunda línea. El ATV más una dosis baja de RTV, o LPV con baja dosis de RTV también se considera terapia de segunda línea. Frecuentemente la meta en los casos de fallo de tratamiento es regímenes temporizados más simples y dosis fijas.

5 Para sujetos que fallan los regímenes de segunda línea de tratamiento debían ser mantenidos sobre un régimen tolerado para la duración. El uso de una terapia antirretroviral de combinación potente para suprimir la replicación del VIH por debajo de los límites de detección de los ensayos de ARN de VIH de plasma sensibles limita el potencial para la selección de las variantes de VIH resistentes antirretrovirales, el principal factor limitante de la capacidad de los fármacos antirretrovirales para inhibir la replicación del virus y retardar la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, la supresión máxima alcanzable de la replicación del VIH debería ser la meta de la terapia. Los medios más efectivos para lograr la supresión durable de la replicación del VIH es la iniciación simultánea de combinaciones de fármacos anti VIH efectivos con los cuales el sujeto no ha sido tratado previamente y que no tienen resistencia cruzada con agentes antirretrovirales con los cuales el sujeto haya sido tratado previamente. Cada uno de los fármacos antirretrovirales usados en regímenes de terapia de combinación deberían ser usados siempre de acuerdo con programaciones y dosificaciones óptimas. Los fármacos antirretrovirales efectivos disponibles son limitados en número y mecanismo de acción, y se ha documentado la resistencia cruzada entre fármacos específicos. Por lo tanto, cualquier cambio en la terapia antirretroviral incrementa las restricciones terapéuticas futuras.

La monitorización de los sujetos con VIH/SIDA en cuanto a su carga viral, niveles de fármaco, recuentos de células CD4 y patrones de toxicidad en un método diagnóstico de plataforma sencilla proveería ventajas distintas a un sujeto. Los métodos de la invención pueden ser utilizados en un método multiplex, sin preparación de la muestra, sencillo, en un sistema automatizado para determinar el nivel de fármaco, la toxicidad o los determinantes de los efectos adversos, y el biomarcador potencial de la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, un cartucho que tenga portales o pozos que contienen 1) partículas magnéticas que tengan anticuerpos específicos para células CD4 decorados sobre su superficie, 2) partículas magnéticas que tengan anticuerpos específicos del biomarcador de toxicidad sobre su superficie, y 3) partículas magnéticas que tengan sondas específicas de ácidos nucleicos para identificar los niveles de carga viral podrían emplearse para determinar y proveer rápidamente valores de manejo clínico para un sujeto dado con VIH/SIDA.

Se divulga que los sistemas y métodos descritos aquí también pueden ser utilizados para monitorizar y diagnosticar enfermedades inmunes en un sujeto (por ejemplo enfermedad de Crohn, ileitis, enteritis, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome de intestino irritable, colitis ulcerativa, así como enfermedad inmune no gastrointestinal). El desarrollo relativamente reciente de los agentes diseñados genéticamente tiene el potencial de alterar el tratamiento de una enfermedad inmune radicalmente, y se introdujo el Remicade (también conocido como Infliximab, un anticuerpo anti-TNF) como una nueva clase terapéutica con alta eficacia, rápido inicio de su acción, efecto prolongado y tolerancia mejorada. Sin embargo estos agentes son costosos y al menos una tercera parte de los pacientes elegibles no muestra ninguna respuesta útil. El hallazgo de un medio para predecir aquellos que van a responder, y anticipar que son recaídas es, por lo tanto, de importancia obvia. Los linfocitos tipo 1 auxiliares T (Th1) orquestan mucha de la información en la enfermedad de Crohn a través de la producción de TNF-alfa, el cual parece jugar un papel de pivote como citoquina proinflamatoria. Ejerce esos efectos a través de su propia familia de receptores (TNFR1 y TNFR2), cuyo resultado final incluya apoptosis, activación de la proteína quinasa c-Jun N-terminal activada por quinasa/estrés (JN/SAPK) y activación de NF-kappaB. La NF-kappaB activada entra en el núcleo e induce la transcripción de genes asociados con la inflamación, defensa del huésped y supervivencia celular. La región promotora del gen TNF cae entre nucleótidos -1 y -1300, y abarca numerosos sitios polimórficos asociados con sitios de enlazamiento potenciales para diversos factores de transcripción. Los portadores del alelo 2 de TNF (TNF2) (los cuales contienen un polimorfismo de par de bases sencillo en la posición de promotor -308) producen ligeramente más TNF-alfa en su mucosa intestinal que los no portadores de TNF2. El polimorfismo de TNF también parece tener influencia en la naturaleza y frecuencia de las manifestaciones extraintestinales de la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD). Se está investigando una serie de rutas de inhibición de TNF. Más extensamente evaluado es el uso del remicade. Varios ensayos grandes controlados indican que el remicade tiene un papel en el tratamiento de pacientes con enfermedad de Crohn de moderada a severamente activa y en enfermedad de Crohn fistulante. Estudios pequeños han mostrado asociaciones posibles entre pobre respuesta al remicade y niveles incrementados en mucosa de NF-kappaB activada, calidad de homocigótico para el polimorfismo en el exón 6 de TNFR2 (genotipo Arg196Arg), positividad para anticuerpos citoplásmicos antineutrófilos perinucleares (ANCA), y con la presencia de números incrementados de células mononucleares de lamina propia que producen interferón-gamma y TNF-alfa. Así, la monitorización de pacientes con la enfermedad de Crohn en cuanto a TNF-alfa y patrones de toxicidad en un método diagnóstico de plataforma sencilla tendría ventajas distintas. El método descrito aquí puede ser un sistema automatizado de un método de detección sencillo, multiplex, sin preparación de la muestra para determinar el nivel de fármaco, la toxicidad o determinantes de los efectos adversos, y el biomarcador potencial de la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, un cartucho que tenga portales o pozos que contengan 1) partículas magnéticas que tengan anticuerpos específicos anti-TNF-alfa decorados sobre su superficie, 2) partículas magnéticas que tengan anticuerpos específicos de biomarcador de toxicidad sobre su superficie, y 3) partículas magnéticas que tengan sondas específicas para identificar marcadores de la progresión de la enfermedad podrían ser empleados para determinar y proveer rápidamente valores de manejo clínico para un paciente de enfermedad de Crohn dado.

Los métodos de la invención también pueden ser utilizados para monitorizar y diagnosticar enfermedades e inflamaciones infecciosas en un sistema de preparación multiplex, automatizados sin preparación de la muestra. Tales sistemas y métodos podrían ser utilizados para monitorizar, por ejemplo, bacteriemia, sepsis y/o síndrome de respuesta inflamatoria sistémico (SIRS). La diagnosis temprana es clínicamente importante en este tipo de infección, que si se deja sin tratar, puede llevar a disfunción orgánica, hipoperfusión, hipotensión, choque refractario (séptico) choque/SIRS, y/o síndrome de disfunción orgánica múltiple (MODS). Para un paciente típico, muchas infecciones bacterianas o fúngicas son el resultado de incubación en el momento de la admisión una instalación de cuidado de la salud y se denominan infecciones asociadas al cuidado de la salud (HAI), también conocidas como infecciones nosocomiales, adquiridas en hospital o aparecidas en hospital. Las infecciones asociadas al sitio de cuidado de la salud son causadas más comúnmente por patógenos virales, bacterianos y fúngicos y comúnmente se transmiten a través de heridas, dispositivos invasivos (catéteres, traqueotomía, intubación, drenajes quirúrgicos) o ventiladores y se encuentran como infecciones del tracto urinario, infecciones de sitios quirúrgicos, o en una forma de neumonía. Al cabo de algunas horas después de la admisión, la flora de un paciente comienza a adquirir características de la reserva bacteriana circundante. La mayoría de las infecciones que se hacen químicamente evidentes después de 48 horas de hospitalización se consideran como adquiridas en el hospital y los patógenos deberían ser investigados en todos los pacientes febriles que son admitidos para una enfermedad no febril o aquellos que desarrollan deterioro clínico no explicado por el diagnóstico inicial. El uso más cuidadoso y selectivo de agentes antimicrobianos, tales como antibióticos, también es deseable para hacer disminuir la presión de selección para la aparición de cepas resistentes. Las infecciones que se presentan después de que el paciente sale del hospital pueden considerarse asociadas con el sitio de cuidado de la salud si los organismos fueron adquiridos durante la estancia en el hospital. Los factores de riesgo relacionados con el paciente para invasión del patógeno colonizador incluyen severidad de la enfermedad, y estado inmunocomprometido subyacente y/o la longitud de la estancia del paciente. Los factores de riesgo para el desarrollo de infecciones en la corriente sanguínea asociadas con catéteres en neonatos incluyen la colonización del sitio de distribución del catéter, colonización del sitio de salida, inserción del catéter después de la primera semana de vida, duración de la nutrición parenteral y peso al nacer extremadamente bajo (<1000 g) en el momento de la inserción de catéter. En pacientes en el PICU los riesgos, para infecciones en corriente sanguínea asociadas con catéter se incrementan con la neutropenia, tiempo de residencia prolongada del catéter (>7 días), uso de CVL colocado percutáneamente (superior a dispositivos tunelados o implantados), y manipulación frecuente de las líneas. Las infecciones por *Candida* son patógenos crecientemente importantes en el NICU. Los factores de riesgo para el desarrollo de candidemia en neonatos incluyen edad gestacional menor de 32 semanas, marcadores Apgar de 5 minutos de menos de 5, choque, coagulopatía diseminada intravascular, antes del uso de intralípidos, administración en nutrición parenteral, uso de CVL, administración de bloqueadores de H₂, intubación o longitud de estancia superior a 7 días. Los factores de riesgo para el desarrollo de neumonía asociada con ventilador (VAP) en pacientes pediátricos incluyen reintubación, síndromes genéticos, inmunodeficiencia e inmunosupresión. En neonatos, un episodio previo de la infección en la corriente sanguínea es un factor de riesgo para el desarrollo de VAP. Factores de riesgo para el desarrollo de la infección en tracto urinario asociada con el sitio de cuidado de la salud de pacientes pediátricos incluye cateterización de la vejiga, terapia antibiótica previa, y parálisis cerebral. Entre las categorías de bacterias más conocidas por infectar los pacientes inmunocomprometidos están la MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina), bacterias gram positivas y *Helicobacter*, la cual es gram negativa. Mientras que hay fármacos antibióticos que pueden tratar enfermedades causadas por la MRSA gram positiva, hay actualmente pocos fármacos efectivos para *Acinetobacter*. Patógenos comunes en infecciones en corriente sanguínea son *Staphylococcus* negativos a la coagulasa, *Enterococcus* y *Staphylococcus aureus*. Además, la *Candida albicans* y patógenos para la neumonía tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Haemophilus influenzae* participan de muchas infecciones. Los patógenos para infecciones del tracto urinario incluyen *Escherichia coli*, *Candida albicans*, y *Pseudomonas aeruginosa*. Los organismos entéricos gram negativos son adicionalmente comunes en infecciones en el tracto urinario. Las infecciones en sitios quirúrgicos incluyen *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Staphylococcus* negativos a la coagulasa. El agente infeccioso puede ser seleccionado de, sin limitación, patógenos asociados con la sepsis, tales como *Acinetobacter baumannii*, *Aspergillus fumigatus*, *Bacteroides fragilis*, *B. fragilis*, blaSHV, *Burkholderia cepacia*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Candida guilliermondii*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus* negativo a coagulasa, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Kingella Kingae*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, Mec A gene (MRSA), *Morganella morganii*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria* spp. non-meningitidis, *Prevotella buccae*, *P. intermedia*, *P. melaninogenica*, *Propionibacterium acnes*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *S. haemolyticus*, *S. maltophilia*, *S. saprophyticus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *S. maltophilia*, *Streptococcus agalactiae*, *S. bovis*, *S. dysgalactiae*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, y *S. sanguinis*; o cualquier otro agente infeccioso descrito aquí. En ciertos casos, el método y sistema serán diseñados para establecer si el agente infeccioso porta un gen Van A o un gen Van B característico de resistencia a la vancomicina; mecA para resistencia a la meticilina, NDM-1 y ESBL para resistencia mas general a las beta lactamas.

La sepsis o el choque séptico son condiciones médicas serias que se caracterizan por un estado inflamatorio general del cuerpo (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica o SIRS) y la presencia de una infección conocida o sospechada. La sepsis se define como SIRS en la presencia de una infección, el choque séptico se define como una sepsis con hipotensión arterial refractaria o anomalías de hipoperfusión a pesar de resucitación de fluidos

adecuada, y sepsis severa se define como una sepsis con disfunción de órganos, hipoperfusión o hipotensión. Además de los síntomas relacionados con la infección generadora, la sepsis se caracteriza por la presencia de inflamación aguda presente a lo largo de todo el cuerpo, y por lo tanto, está asociada frecuentemente con fiebre y leucocitosis o bajo recuento de glóbulos blancos y temperatura muy por debajo del promedio, y vómitos. Por lo tanto se considera actualmente que la sepsis es la respuesta inmune del huésped a una infección y se cree que esta respuesta causa la mayoría de los síntomas de la sepsis, dando como resultado consecuencias hemodinámicas y daño en los órganos. La SIRS se caracteriza por el compromiso hemodinámico y el desarreglo metabólico resultante. Los síntomas físicos externos de esta respuesta frecuentemente incluyen un elevado ritmo cardíaco (por encima de 90 pulsaciones por minuto), alta tasa respiratoria (por encima de 20 respiraciones por minuto), elevado recuento de WBC (por encima de 12,000) y temperatura corporal elevada o disminuida (por debajo de 36°C (97°F) o por encima de 38°C (100°F)). La sepsis se diferencia de SIRS por la presencia de un patógeno conocido. Por ejemplo, el SIRS y un cultivo positivo en sangre para un patógeno indican la presencia de sepsis. Sin una infección conocida, no es posible clasificar los síntomas anteriores como sepsis, solamente como SIRS. La SIRS causa activación esparcida de proteínas en fase aguda, afectando el sistema complementario y las rutas de coagulación, lo cual produce daño a la vasculatura así como a los órganos. Se activan entonces diversos sistemas contrarreguladores neuroendocrinos también, complicando frecuentemente el problema. Incluso con tratamiento inmediato agresivo, esto puede avanzar hasta síndrome de disfunción orgánica múltiple y eventualmente la muerte. El componente del laboratorio del diagnóstico de la sepsis puede incluir varios marcadores que se consideran una vez y/o son medidos en serie. Una serie de estudios han examinado el valor de combinar marcadores disponibles actualmente como GRO-alfa, proteína 1 de grupo de caja de alta movilidad (HMBG-1), receptor de IL-1, antagonista de receptor de IL-1, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, proteína inflamatoria de macrófago (MIP-1), factor inhibidor de migración de macrófago (MIF), osteopontina, RANTES (células T normales, reguladas por activación, expresadas y secretadas; o CCL5), TNF- α , proteína reactiva C (CRP), CD64, y proteína 1 quimiotáctica de monocito (MCP-1). Adicionalmente, los sistemas y métodos pueden ser diseñados para monitorizar ciertas proteínas características de la sepsis, proteína de enlace de adenosina desaminasa (ABP-26), la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), proteína de enlace a lipopolisacárido (LBP), y procalcitonina (PCT). La sepsis se trata usualmente en la unidad de cuidados intensivos con fluidos intravenosos y antibióticos. Si el reemplazo de fluidos es insuficiente para mantener la presión sanguínea, pueden usarse medicaciones vasopresoras específicas. La ventilación mecánica y la diálisis pueden ser necesarias para soportar la función de los pulmones y riñones, respectivamente. Para guiar la terapia, pueden colocarse un catéter venoso central y un catéter arterial. Los pacientes en sepsis pueden requerir medidas preventivas para trombosis venosa profunda, úlceras por estrés y úlceras por presión, y algunos pacientes pueden beneficiarse del control de los niveles de azúcar sanguínea con insulina (direccionándose a la hiperglicemia por estrés), corticosteroides en dosis bajas o drotrecogina alfa activada (proteína C recombinante). Para un paciente inmunocomprometido, o un paciente con sospecha de infección que puede estar experimentando sepsis o SIRS, tales métodos de la invención proveen una plataforma de diagnóstico para la identificación rápida de uno o más patógenos, o de sí los patógenos son o no resistentes a ciertas terapias (para la selección de una terapia antimicrobiana apropiada). La plataforma tal como se describe permite la determinación simultánea de los niveles de los factores (por ejemplo, GRO-alfa, Proteína 1 de grupo de caja de alta movilidad (HMBG-1), Receptor de IL-1, Antagonista del receptor de IL-1, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, proteína inflamatoria de macrófago (MIP-1), factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), osteopontina, RANTES (regulado por activación, expresado por células T normales y secretado; o CCL5), TNF- α , Proteína C reactiva (CRP), CD64, y proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1)) y/o proteínas (e.g., proteína de enlace de la adenosina desaminasa (ABP-26), óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), proteína de enlace a lipopolisacáridos (LBP), y procalcitonina (PCT)) considerados como involucrados en la SIRS, permitiendo la optimización para el tratamiento de la sepsis y el SIRS. Así, esta plataforma reduce los protocolos empíricos y/o el uso de antimicrobianos no específicos/generales que pueden o pueden no dirigirse al patógeno específico y/o a la disfunción del sistema subyacente para un paciente dado. Esta plataforma permite diagnóstico rápido y exacto, el cual puede apuntar una terapia efectiva proveyendo un componente clave para la toma de decisiones por parte del médico y reducir la morbilidad y la mortalidad.

50 Para determinar si un paciente tiene sepsis, es necesario identificar la presencia de un patógeno. Para tratar de la manera más efectiva a un paciente, la iniciación más temprana de la terapia apropiada es crítica. El antimicrobiano y otros tratamientos para la sepsis se basan en la clasificación de patógenos a niveles múltiples, incluyendo la identificación de un agente como 1) bacteriano, viral, fúngico, parasítico o algún otro; 2) gram positivo, gram negativo, levadura o moho, 3) especie, y 4) susceptibilidad.

55 Cada uno de estos niveles de especificidad mejora el tiempo de iniciación de una terapia apropiada, y cada etapa avanza hacia la pista que lleva a un estrechamiento de los agentes terapéuticos hasta el conjunto más específico. Sin datos de susceptibilidad absolutos, las metodologías empíricas de cuidado se basan en la información disponible acerca del patógeno (cualquiera que sea su nivel) y el patrón de frecuencia del patógeno y las tendencias de susceptibilidad en el hospital de otro sitio de cuidado médico. Así, ciertas categorías de patógenos son supuestas frecuentemente como causantes hasta que más datos refinan el apareamiento de patógeno y terapia. Específicamente, estos objetivos caen en la categoría de ESKAPE (el cual es una serie de patógenos resistentes, y la categoría SPACE, la cual es un conjunto de patógenos de alta virulencia que requieren aislamiento de los pacientes.

Además de identificar estos patógenos en tipos de muestra múltiples (sangre, tejido, orina, etc), otro método para distinguir pacientes sintomáticos, por ejemplo, pacientes con síndrome inflamatorio sistémico, o SIRS, de pacientes sépticos, es el uso de biomarcadores que correlacionen bien sea individualmente o a través de un índice, la identificación de pacientes con una infección. En casos en los que las infecciones no son detectadas debido a la interferencia de la terapia antimicrobiana con el diagnóstico, el control del sistema inmune de la terapia, o de alguna otra forma, estos biomarcadores, que pueden ser tipos múltiples de analitos (citoquinas, metabolitos, expresión genética de ADN/ARN, etc.) indicarán infección y por lo tanto sepsis.

Para generar la información de diagnóstico requerida tanto para la presencia de una infección como de algún nivel de identificación de especie, un panel podría ser: (i) aglomerados gram positivos (por ejemplo, *S. aureus*, y CoNS (estafilococo negativo a coagulasa)); (ii) cadenas/pares gram positivos (por ejemplo, *Strep spp.*, *mitis*, *pneumonia spp.*, *agalactiae spp.*, *pyogenes spp.*, *Enterococcus spp.*(*E. faecium*, *E. faecalis*); (iii) barras gram negativas (por ejemplo, *E. coli*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Stenotrophomonas spp.*); (iv) SPACE (por ejemplo, *Serratia spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*); (v) *Pseudomonas* (por ejemplo, *Pseudomonas spp.*); (vi) ESKAPE (*E. faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Enterobacter spp.*); y (vii) PanBacterianos (todas las especies bacterianas).

El panel debería ser usado en conjunción con un ensayo fúngico para cubrimiento total. Las categorías representan la información requerida para una intervención efectiva con la terapia apropiada, dado que cada sitio de cuidado tendrá una metodología derivada empíricamente con base en una respuesta positiva a gram +, gram -, etc. Las especies identificadas en cada categoría representan aquellas que coincidirían bajo cada encabezamiento, pero no son exhaustivas. Adicionalmente, se incluye un marcador panbacteriano para cubrir cualquier especie que no esté cubierta por el método de diagnóstico empleado para cada categoría. Adicionalmente, la combinación de resultados también dará una indicación de las especies, aunque no completamente, si están incluidas como se describió más arriba. Las referencias cruzadas positivas y negativas por categoría permiten un proceso de metodología de eliminación para identificar algunas de las especies, probabilísticamente.

Además de los paneles de patógenos, podría llevarse a cabo una prueba en solitario o en compañía para biomarcadores que puedan indicar sepsis. Ejemplos de estos marcadores aparecen a continuación, y pueden ser utilizados individualmente o en combinación: IL-1 β , GRO α , Proteína 1 de grupo caja de alta movilidad (HMBG-1), Receptor de IL-1, Antagonista del receptor de IL-1, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, proteína inflamatoria de macrófago (MIP-1), factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), osteopontina, RANTES (regulado por activación, expresado por células T normales y secretado; o CCL5), IL-10, GM-CSF, MCP-1, TNF- α , hsCRP, PCT, LFB, y lactato.

Se divulga que los sistemas y métodos descritos aquí también pueden ser utilizados para monitorizar y diagnosticar enfermedades cardiacas en un sujeto, tales como un infarto del miocardio. Los marcadores cardiacos o enzimas cardiacas son proteínas que se escapan de las células del miocardio lesionadas y se utilizan para establecer lesiones cardiacas. Los marcadores cardiacos incluyen, sin limitación, las enzimas SGOT, LDH, el subtipo MB de la enzima creatinina quinasa, y troponinas cardiacas (T e I). Las troponinas cardiacas T e I que son liberadas al cabo de 4-6 horas de un ataque de infarto del miocardio (y permanecen elevadas por hasta 2 semanas) tienen especificidad a tejido casi completa y son ahora los marcadores preferidos para establecer daños en el miocardio. Las troponinas elevadas en la determinación del dolor en el pecho pueden predecir con exactitud una alta probabilidad de un infarto del miocardio en el futuro cercano. El diagnóstico de infarto al miocardio esta basado típicamente en la historia del sujeto, ECG, y marcadores cardiacos. Cuando ocurre un daño en el corazón, los niveles de los marcadores cardiacos se elevan con el tiempo, la cual es la razón por la cual las pruebas sanguíneas se toman a lo largo de un período de 24 horas. Puesto que esto niveles de enzimas no se elevan inmediatamente después de un ataque cardiaco, los pacientes que presentan dolor de pecho se tratan en general con la suposición de que ha ocurrido un infarto del miocardio y luego se evalúan para un diagnostico más preciso. Un MI es una emergencia médica que requiere atención médica inmediata. El tratamiento intenta el salvamento de tanto miocardio como sea posible y evitar complicaciones adicionales, de allí la frase "el tiempo es músculo". Usualmente se administran oxígeno, aspirina y nitroglicerina tan pronto como sea posible. Así, en el estado agudo, la monitorización de troponina I y T, así como otros biomarcadores potenciales de isquemia cardiaca, además de terapia con fármacos y patrones de toxicidad en un método diagnóstico de plataforma sencilla tendría ventajas distintivas. Los sistemas y métodos descritos aquí podrían ser utilizados para proveer un sistema automatizado de método de detección sencillo, multiplex, sin preparación de muestras para determinar el nivel de fármaco, la toxicidad o determinantes de efectos adversos, y el biomarcador potencial de la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, un cartucho que tenga portales o pozos que contengan 1) partículas magnéticas que contengan anticuerpos específicos para antitroponina I o troponina T, decorados sobre su superficie, 2) partículas magnéticas que tengan anticuerpos específicos biomarcadores de toxicidad sobre su superficie, y 3) partículas magnéticas que tengan sondas específicas para identificar marcadores de progresión de la enfermedad podrían ser empleados para determinar y proveer rápidamente valores de manejo clínico para un paciente con infarto de miocardio dado.

Uno o más cartucho de pozos múltiples pueden ser configurados para uso en los métodos de la invención y preparados con al menos una muestra en sangre entera del paciente; las partículas magnéticas para detectar cada

uno de los analitos que van a ser detectados (una o más moléculas pequeñas; uno o más metabolitos de la una o más moléculas pequeñas; biomarcador metabólico tal como el descrito para el panel de función hepática); y reguladores de dilución y lavado. Las pruebas de función del hígado se hacen en muestras de suero o plasma del paciente y el análisis de sangre en laboratorio de bioquímica clínica proporciona datos cruciales concernientes a la condición del hígado del paciente. Un "panel de función hepática" es una prueba de sangre en donde puede apuntarse a un nivel bajo o alto de una o más enzimas hacia enfermedades o daños en el hígado. Por ejemplo, el panel de función hepática puede incluir uno o más de los siguientes ensayos de detección de analitos: una o más moléculas pequeñas; uno o más metabolitos de las una o más moléculas pequeñas; un biomarcador metabólico biológico; genotipificación, perfil de expresión genética; y análisis proteómico.

Un panel de función hepática puede incluir análisis de una o más de las siguientes proteínas en una muestra biológica de un paciente o de un sujeto: 1) albúmina (el constituyente principal de la proteína total en el hígado; mientras que el remanente es llamado globulina; la albúmina debe estar presente a 3.9 hasta 5.0 g/dL, una hipoalbúminaemia indica pobre nutrición, bajo catabolismo de proteínas, cirrosis o síndrome nefrótico); 2) aspartato transaminasa (AST) (también conocida como transaminasa oxaloacética glutámica en suero o aspartato aminotransferasa, es una enzima en las células parenquimales del hígado y normalmente va de 10 a 34 IU/L; niveles elevados son indicativos de daño agudo en el hígado); 3) alanina transaminasa (ALT) (también conocida como transaminasa pirúvica glutámica en suero o alanina aminotransferasa, es una enzima que está presente en los hepatocitos a niveles entre 8 a 37 IU/L; niveles elevados son indicativos de daño agudo en el hígado en hepatitis viral o sobredosis de paracetamol; la relación de AST a ALT se utiliza para diferenciar entre las razones del daño al hígado); 4) fosfatasa alcalina (ALP) (una enzima que está presente en las células que recubren los ductos biliares del hígado; el rango normal es 44 a 147 IU/L y el nivel se eleva en caso de enfermedades infiltradoras del hígado, colestasis intrahepática u obstrucción del ducto biliar grande); 5) gamma glutamil transpeptidasa (GGT) (un marcador más sensible para daño colestático que la ALP. Es muy específica para el hígado; el rango estándar es de 0 a 51 IU/L; la toxicidad por alcohol tanto aguda como crónica eleva la GGT; la razón de una elevación aislada de ALP puede ser detectada por GGT); 6) bilirrubina total (TBIL) (un incremento en la bilirrubina total puede llevar a ictericia y puede ser atribuida a cirrosis, hepatitis viral, anemias hemolíticas o hemorragia interna); 7) bilirrubina directa; 8) tiempo de protrombina (PTT) (el daño en las células hepáticas y la obstrucción del flujo biliar puede producir cambios en el tiempo de coagulación de la sangre); 9) prueba de alfa-fetoproteína (niveles elevados indican hepatitis o cáncer); 10) lactato deshidrogenasa; y 11) anticuerpos mitocondriales (si están presentes pueden indicar hepatitis activa crónica, cirrosis biliar primaria u otros trastornos autoinmunes). Las proteínas descritas más arriba deberían ser analizadas en el panel de función hepático usando los métodos de la invención.

Un panel de función hepático adicional puede incluir genotipificación de enzimas de citocromo P450. La superfamilia de citocromo P450 (CYP) es un grupo grande y diverso de enzimas. La función de la mayoría de las enzimas CYP es catalizar la oxidación de sustancias orgánicas. Los sustratos de las enzimas CYP incluyen intermediarios metabólicos tales como lípidos y hormonas esteroidales, así como sustancias xenobióticas tales como fármacos y otros agentes químicos tóxicos. Las CYP son las enzimas principales involucradas en el metabolismo y bioactivación de los fármacos, participando en cerca del 75% del metabolismo total. La mayor parte de los fármacos sufren biotransformación y eventualmente son excretados del cuerpo; y muchos requieren activación para formar el compuesto activo. Las enzimas CYP que metabolizan muchas medicaciones incluyen CYP3A4/5 (36%), CYP2D6 (19%), CYP2C8/9 (16%), y CYP1A2 (11%).

Las pruebas para genotipificación de citocromo P450 se utilizan para determinar cómo un paciente o sujeto metaboliza un fármaco. Los resultados de las pruebas de citocromo P450 pueden utilizarse para dividir los individuos en cuatro tipos principales:

(i) Metabolizadores pobres. Ciertos fármacos son metabolizados más lentamente de lo normal y la medicación tendrá una vida media más larga y posiblemente incrementa la probabilidad de que produzca efectos colaterales.

(ii) Metabolizadores normales. Los fármacos serán metabolizados una rata promedio y así es indicativo de que hay un beneficio del tratamiento y puntos para efectos colaterales menores que en otros individuos que no metabolizan aquellas medicaciones particulares de forma tan efectiva.

(iii) Metabolizadores intermedios. Los fármacos pueden o pueden no ser metabolizados una rata promedio. Al menos un gen involucrado en el metabolismo del fármaco es sospechoso de funcionar anormalmente. Hay entonces una predisposición a metabolizar ciertos fármacos de manera diferente.

(iv) Metabolizadores ultrarrápidos. Los fármacos son metabolizados más rápido y más eficientemente que el promedio. Puesto que la rata metabólica es más alta que la promedio, algunas medicaciones son inactivadas más pronto o excretadas más pronto de lo normal y la medicación puede no tener la eficacia deseada.

Actualmente, la genotipificación de los genes responsables de estas enzimas a través de una población han demostrado que las diferencias polimórficas en estas enzimas pueden llevar a variación en eficacia y toxicidad de algunos fármacos. El establecimiento del estado del citocromo P450 en una muestra de paciente puede lograrse

- 5 midiendo la actividad de la enzima de la muestra, o determinando si se presenta una diferencia genética en uno de los genes de este sistema metabólico en el genoma. La genotipificación requiere una muestra de células representativa del genoma del paciente o sujeto y el análisis busca determinar las diferencias genéticas en estos genes clínicamente importantes. Alternativamente, la fenotipificación de enzimas CYP450 (identificación de estado de los metabolizadores enzimáticos) puede lograrse administrando un sustrato de enzima de prueba a un paciente y monitorizar el sustrato original y las concentraciones de metabolito con el tiempo (por ejemplo, en orina). Sin embargo, la prueba e interpretación consumen tiempo y son inconvenientes. Como resultado, la fenotipificación se lleva a cabo a raramente.
- 10 A continuación se presenta una lista de las posibles enzimas metabólicas hepáticas que pueden ser parte de un panel de función hepática.
- 15 La CYP2C19 metaboliza varios tipos importantes de fármacos, incluyendo inhibidores de la bomba de protones, diazepam, propranolol, imipramina y amitriptilina. La FDA liberó la prueba con “base en los resultados de un estudio llevado a cabo por los fabricantes de cientos de muestras de ADN así como en un amplio rango de literatura de soporte cuidadosamente revisada”. De acuerdo con la etiqueta de la FDA, “la información acerca del genotipo CYP2D6 puede ser utilizada como una ayuda para los médicos en la determinación de una estrategia terapéutica y dosis de tratamiento para agentes terapéuticos que son metabolizados por el producto CYP2D6”. Así, un panel de función hepática que emplea los métodos de la invención, puede ser utilizado para genotipificar muestras de un paciente o un sujeto para establecer el estado del sistema enzimático del citocromo P450 para luego optimizar la eficacia y seguridad terapéuticas.
- 20 La CYP2D6 (citocromo P450 2D6) es la mejor estudiada de las DMEs y actúa sobre una cuarta parte de todos los fármacos de prescripción, incluyendo los inhibidores de reconsumo de serotonina selectivos (SSRI), antidepresivos tricíclicos (TCA), beta bloqueadores tales como Inderal y antiarrítmicos tipo 1A. Aproximadamente 10% de la población tiene una forma de actuación lenta de esta enzima y 7% una forma de actuación superrápida. El treinta y cinco por ciento son portadores de un alelo 2D6 no funcional, que eleva especialmente el riesgo de ADRs cuando estos individuos toman fármacos múltiples. Los fármacos que la CYP2D6 metabolizan incluyen Prozac, Zoloft, Paxil, Effexor, hidrocodona, amitriptilina, Claritin, ciclobenzaprina, Haldol, metoprolol, Rithmol, Tagamet, tamoxifen, dextrometorfan, bloqueadores beta, antiarrítmicos, antidepresivos, y derivados de la morfina, incluyendo muchos de los fármacos más prescritos y los fármacos de difenilhidramina de venta libre (por ejemplo, Allegra, Dytuss, y Tusstat). La CYP2D6 es responsable de la activación del profármaco codeína en su forma activa y el fármaco es inactivo por lo tanto en metabolizadores lentos CYP2D6.
- 30 La CYP2C9 (citocromo P450 2C9) es la ruta primaria de metabolismo para la Cumadina (warfarina). Aproximadamente el 10% de la población son portadores de al menos un alelo para la forma metabolizante lenta de CYP2C9 y pueden ser tratables con 50% de la dosis a la cual son tratados los metabolizadores normales. Otros fármacos metabolizados por CYP2C9 incluyen Amaril, isoniazid, ibuprofeno, amitriptilina, Dilantin, Hizaar, THC (tetrahidrocanabinol), naproxen, y Viagra.
- 35 CYP2C 19 (citocromo P450 2C 19) está asociado con el metabolismo de carisoprodol, diazepam, Dilantin, y Prevacid.
- CYP1A2 (citocromo P450 1A2) está asociado con el metabolismo de amitriptilina, olanzapina, haloperidol, duloxetina, propranolol, teofilina, cafeína, diazepam, clordiazepóxido, estrógenos, tamoxifen, y ciclobenzaprina.
- 40 NAT2 (N-acetiltransferasa 2) es una enzima metabolizante de fármacos secundarios que actúa sobre isoniazid, procainamida, y Azulfidina. La frecuencia del “acetilador lento” NAT2 en diversas poblaciones del mundo varía del 10% a más de 90%.
- La DPD (Dihidropirimidina deshidrogenasa) es responsable por el metabolismo de Fluorouracilo (5-FU), uno de los fármacos para quimioterapia más exitoso y ampliamente usados.
- 45 Las variaciones de UGT1A1 (UDP-glucuronosiltransferasa) pueden llevar a reacciones severas incluso fatales a la primera dosis de Camptosar (irinotecan).
- La 5HTT (transportador de serotonina) ayuda a determinar si las personas responden probablemente a SSRIs, una clase de medicaciones que incluyen citalopram, fluoxetina, paroxetina, y sertralina, entre otras y frecuentemente se prescribe para depresión o ansiedad.
- 50 Las pruebas de genotipificación para diagnóstico para ciertas enzimas de CYP450 están disponibles ahora. Se ofrecen algunas pruebas como servicios de prueba desarrollados en laboratorios internos, lo que no requiere la aprobación de la U.S. Food and Drug Administration (FDA) pero que deben satisfacer los estándares de calidad CLIA para pruebas de alta complejidad. La AmpliChip® (Roche Molecular Systems, Inc.) es la única prueba liberada

5 por la FDA para genotipificación de CYP450. La AmpliChip® es un microarreglo que consiste de muchas secuencias de ADN complementarias a los genes de 2 CYP450 y se aplica en cantidades microscópicas en localizaciones ordenadas sobre una superficie sólida (chip). El AmpliChip® prueba el ADN de los glóbulos blancos de un paciente recolectados en una muestra de sangre anticoagulada estándar para 29 polimorfismos y mutaciones para el gen CYP2D6 y 2 polimorfismos para el gen CYP2C 19.

Por lo tanto, un análisis multiplex de una muestra de sangre individual (por ejemplo, una extracción de sangre sencilla, o cualquier otro tipo de muestra de paciente descrita aquí) de un paciente se divulga para determinar a) estado enzimático del hígado, así como b) el genotipo de las enzimas metabólicas clave para luego ser capaces de diseñar regímenes de farmacoterapia para cuidado terapéutico óptimo utilizando los métodos descritos aquí.

10 Los métodos de la invención pueden incluir uno o más cartuchos de pozo múltiples preparados con al menos una muestra de sangre entera del paciente; partículas magnéticas para detectar cada uno de los analitos que van a ser detectados; anticuerpos del analito; agentes de enlazamiento multivalentes; y/o reguladores de dilución y lavado para uso en un ensayo múltiplex como se describió más arriba.

Nefrotoxicidad

15 La toxicidad renal es un efecto colateral común del uso de xenobióticos y la detección temprana rápida de las etapas iniciales de la nefrotoxicidad puede ayudar en la toma de decisiones médicas. Los reportes tempranos de detección de toxicidad renal sugieren que la expresión incrementada de ARNm en ciertos genes puede ser monitorizada. Sin embargo, otros han sugerido que los marcadores de la toxicidad renal pueden ser detectados en la orina. Estos marcadores incluyen kim-1, lipocalina-2, lipocalina asociada con gelatinasa de neutrófilos (NGAL), timp-1, clusterina, osteopontina, vimentina y heme oxigenasa 1 (HO-1). De manera más amplia, la detección de ADN, iones de metales pesados o niveles BUN en orina puede ser información clínica útil. Así, los métodos de la presente invención incluyen también la capacidad de detectar estos marcadores de toxicidad renal. Opcionalmente, un panel de función hepática también puede incluir uno o dos biomarcadores decisivos de nefrotoxicidad, o viceversa.

Ensayos y métodos basados en no aglomeración

25 Las partículas magnéticas descritas aquí pueden ser utilizadas en un ensayo que no presenta aglomeración de partículas. Por ejemplo, las partículas magnéticas pueden ser utilizadas para capturar o concentrar un analito, por ejemplo, pasando una muestra líquida que contiene el analito sobre partículas magnéticas que incluyen unidades estructurales de enlazamiento específicas para el analito. Algunas ventajas en esta metodología incluyen a) no se necesita formar aglomerados (los aglomerados pueden ser inherentemente inestables en un cierto tamaño, llevando a CVs incrementados); b) el no aglomerar puede no requerir de vórtex puesto que las fuerzas de corte de flujo pueden desalojar el enlazamiento no específico de partículas magnéticas; c) pueden reducirse las etapas de manejo de fluidos, y d) la miniaturización del ensayo puede favorecer estos métodos no aglomerantes. En general, dos modelos de detección basada en superficie incluyen: (i) cambios en la señal T2 que surge de una eliminación de partículas magnéticas a partir de una solución y (ii) cambios en la señal de T2 que surgen del enriquecimiento de partículas magnéticas de una superficie.

40 Las partículas magnéticas derivadas con una unidad estructural de enlazamiento pueden ser mantenidas en posición mediante un campo magnético externo a la vez que la muestra que contiene el analito correspondiente se hace circular después de las partículas magnéticas "atrapadas" permitiendo capturar y/o concentrar el analito de interés. Las partículas pueden ser haladas hacia el lado o parte inferior del recipiente de ensayo, o una malla magnetizable o espuma metálica magnetizable con tamaño de poro apropiado pueden estar presentes en el recipiente de reacción, creando gradientes magnéticos locales muy altos. Una ventaja de tener la malla/espuma metálica en el recipiente de reacción es que la distancia que cada partícula magnética necesita recorrer para quedar "atrapada" o "capturada" puede ser muy corta, mejorando la cinética del ensayo.

45 Otro ensayo no aglomerante es tener superficies derivadas con ligandos complementarios a la unidad estructural de enlazamiento presente en la partícula magnética y utilizando un formato de captura/eliminación/flujo exhaustivo. El enlazamiento específico de partículas magnéticas una superficie elimina partículas magnéticas de la suspensión general de partículas utilizadas en el ensayo, llevando así a un cambio en el valor T₂ en el volumen de reacción detectado por el lector MR. La preincubación de las partículas con la muestra que contiene el analito puede reducir/inhibir el, enlazamiento/captura/eliminación de la partícula magnética por la superficie derivada en proporción a la concentración de analito en la muestra. Un ejemplo de este tipo de metodología de ensayo ha sido demostrado utilizando puntas de micropipeta de cromatografía de afinidad PhyNexus. Las PhyTips de 200 ul contienen un volumen de lecho de resina de 20 µl atrapado entre dos fritas. El lecho de resina consiste de perlas de agarosa entrecruzadas de 200 µm derivadas con avidina, proteína A, proteína G, o un analito. Un pipeteador electrónico programable puede aspirar y dispensar diversos volúmenes a diversas ratas de flujo. Las partículas magnéticas fluyen a través de los poros creados por el lecho de resina de perlas de agarosa empacadas. Pasando repetidamente la suspensión apropiada de partículas magnéticas sobre el lecho de resina atrapada para permitir que ocurran las interacciones productivas entre ellas, es decir, un lecho de resina de perlas de agarosa derivada con

avidina y partículas magnéticas derivadas con biotina, algunas de las partículas magnéticas se enlazarán específicamente y serán eliminadas de la suspensión de partículas. Midiendo el T2 de la suspensión de partículas antes y después de la exposición al lecho de resina de agarosa, la cantidad de eliminación de partículas puede ser cuantificada.

- 5 Otro formato de ensayo no aglomerante es similar al descrito anteriormente, pero utiliza espuma metálica magnetizable derivada para reemplazar el lecho de resina. La ventaja de la espuma metálica como sustrato de fase sólida es que cuando se coloca en un campo magnético, la espuma metálica genera gradientes de campo magnético locales muy altos en distancias muy cortas lo cual puede atraer las partículas magnéticas derivadas y ponerlas en contacto con el asociado de enlazamiento complementario sobre la espuma metálica y mejorar las oportunidades de una interacción productiva específica. Al optimizar el tamaño de poro y el área superficial de la espuma metálica, la cinética del ensayo puede desmejorarse notablemente puesto que las partículas necesitan desplazarse distancias mucho más cortas para encontrar una superficie complementaria a la cual unirse. La concentración de partícula en el volumen de reacción a través del flujo será reducida inversamente proporcional a la concentración de analito en la muestra y puede ser cuantificada utilizando el lector MR. La espuma metálica puede ser níquel que porta directamente unidades estructurales etiquetadas con his unidas, o puede ser níquel tratado con amilosilano y unidades estructurales de enlazamiento enlazadas covalentemente. Este proceso ha sido demostrado utilizando espuma metálica de níquel tratada con amilosilano con poros de 400 μm cubierta con anticuerpos anticreatinina y se demuestra que enlaza específicamente partículas magnéticas derivadas con creatinina.

- 20 Para preparar piezas circulares pequeñas de la espuma metálica de níquel (NMF), el material NMF es incubado con agua desionizada y luego congelado. El agua congelada en las grietas del NMF soporta la espuma de tal manera que no colapsará ni creará bordes diferenciales. A continuación, se utiliza un punzón para crear piezas de tamaño uniforme de NMF; un martillo y un punzón (por ejemplo, un tubo circular que tiene un borde de corte circular en un extremo) se utilizan para cortar piezas circulares, por ejemplo, de 2-3 mm de tamaño, de la espuma congelada. Se usa entonces un alambre para extraer las piezas, las cuales son secadas en un horno para vidrio. Para derivar las piezas de NMF y preparar para uso en los dispositivos y métodos descritos aquí, se llevan a cabo las siguientes etapas. Primero, las piezas NMF son lavadas con H_2SO_4 2M en un sonicador, y la solución de ácido sulfúrico se utiliza para limpiar el NMF y para hacer ásperas las superficies de NMF con el fin de ayudar en la unión subsecuente de los grupos amino del amilosilano. Las piezas de NMF lavadas con ácido son enjuagadas entonces con agua desionizada para eliminar cualquier solución ácida residual, y las piezas de NMF son secadas en un horno para vidrio. A continuación las piezas de NMF son derivadas con amilosilano, y se une covalentemente a aminodextrano de 70 kD. El aminodextrano es estrechado entonces opcionalmente un glutaraldehído. Pueden hundirse entonces covalentemente anticuerpos, oligonucleótidos y analitos específicos a los grupos amino sobre el aminodextrano utilizando diversas químicas, y las piezas de NMF derivadas son incubadas para bloquear el enlazamiento no específico. Los bloqueadores comunes incluyen pero no se limitan a BSA, leche desnatada seca, detergentes, ADN de esperma de salmón, entre otros.

- 40 Adicionalmente, hay ejemplos de ensayos que se dirigirían a detectar un cambio en propiedades físicas en una muestra líquida. Como se describe en casos pendientes, PCT/US2009/062537 (publicada como WO2010/051362) y PCT/US2008/073346 (publicada como WO2009/026164), la coagulación de la sangre puede ser determinada por los métodos presentes descritos aquí. Adicionalmente, pueden detectarse otras propiedades físicas tales como solidificación, cambios en densidad y pueden tener usos en determinar el curado de materiales (composiciones plásticas), cambios en alimentos y productos alimenticios con el tiempo, contaminación de productos encontrados en la naturaleza y monitorización de ciertos fluidos biológicos tales como orina, como una función de la función renal.

- 45 Las partículas magnéticas utilizadas en los métodos no aglomerantes descritos aquí pueden tener un diámetro promedio que va de 10 nm a 1200 nm (por ejemplo, desde 10 a 50, 50 a 150, 150 a 250, 200 a 350, 250 a 450, 300 a 500, 450 a 650, 500 a 700 nm, 700 a 850, 800 a 950, 900 a 1050, o desde 1000 a 1200 nm).

Amplificación y detección de ácidos nucleicos a partir de muestras complejas

Los métodos de la invención pueden incluir ensayos de detección de ácidos nucleicos basados en amplificación llevados a cabo partiendo de muestras complejas de sangre entera (por ejemplo, para análisis de diagnóstico, forenses y ambientales).

- 50 La preparación de la muestra también debe retirar o proveer resistencia a inhibidores de PCR comunes encontrados en muestras complejas (por ejemplo, fluidos corporales, suero, u otro medio complejo). Los inhibidores comunes aparecen en la lista de la Tabla 5 (véase también, Wilson, Appl. Environ. Microbiol., 63:3741 (1997)). Los inhibidores actúan típicamente bien sea por prevención de la lisis celular, degradación o secuestro de un ácido nucleico y/o inhibición de una actividad de polimerasa. La polimerasa empleada más comúnmente, Taq, es inhibida por la presencia de 0.1% de sangre en una reacción. Muy recientemente, se han diseñado polimerasas Taq mutantes que son resistentes a los inhibidores comunes (por ejemplo, hemoglobina y/o ácido húmico) encontrados en sangre y suero. (Kermekchiev et al., Nucl. Acid. Res., 37(5): e40, (2009)). Las recomendaciones del fabricante indican que estas mutaciones permiten la amplificación directa de hasta 20% de sangre. A pesar de la resistencia provista por

las mutaciones, la detección de PCR en tiempo real exacta es complicada debido a la detención de la fluorescencia observada en la presencia de una muestra de sangre (Kermekchiev et al., Nucl. Acid. Res., 37: e40, (2009)).

Tabla 5. Inhibidores de PCR y facilitadores/métodos para superar la inhibición

Sustrato	Diana	Inhibidor	Facilitador
Heces	Escherichia coli	>10 ³ células bacterianas	Columna de intercambio iónico
Sustrato	Diana	Inhibidor	Facilitador
Csf	Treponema pallidum	Residuos celulares que producen amplificación no específica	Cebadores anidados
Sangre entera	Tejido de mamífero	>4 µl de sangre/100 ml de mezcla de reacción (hemoglobina)	1-2% de sangre por reacción
Heces	Rotavirus	Dilución desconocida	Fibra de celulosa
Especímenes clínicos	Citomegalovirus	Componentes no identificados	Extracción con perlas de vidrio
Sangre y tejido humanos	Genes humanos	Proteínas de enlazamiento a ADN	Proteasa termofílica de cepa Thermus rt44A
Tejido de mamífero	Genéticos de tejidos mamíferos	Variaciones en ciclizador térmico	Formamida
Tejido de mamífero	Genético de tejidos mamíferos	Variaciones en ciclizador térmico	DMSO, glicerol, PEG, solventes orgánicos
Especímenes clínicos	Treponema pallidum	Factores desconocidos	Diversos métodos fisicoquímicos específicos para el sustrato
Muestras forenses de semen	Esperma	Errores de genotipificación; inhibición de PCR selectiva/total por microorganismos vaginales	
Heces	Salmonella entérica	Diversos fluidos corporales	Separación inmunomagnética
Heces	Diversos virus entéricos	Desconocido	Cromatografía de exclusión por tamaño, extracción fisicoquímica
Especímenes clínicos	Virus herpes simplex	Inhibidores endógenos, efectos aleatorios	Repurificación, control positivo coamplificado
Heces	Escherichia coli	Inhibidores no específicos, urea, hemoglobina, heparina, fenol, SDS	Cebadores adicionales y ciclizadores de reacción, potenciadores de PCR
Cultivo de tejidos	Citomegalovirus de VIH	Polvo de guantes	

Sustrato	Diana	Inhibidor	Facilitador
Suspensiones, biopsias de piel	Mycobacterium leprae	Fijadores basados en mercurio, formalina regulada neutra	Tiempos de fijación reducidos, fijación con etanol
Especímenes clínicos	Mycobacterium tuberculosis	Inhibidores desconocidos en pus, biopsias de tejido, esputo, fluido pleural	Extracción fisicoquímica
Tejido de mamífero	Genéticos de tejido de mamífero	Contaminante desconocido de transcriptasa reversa	ADN adicional
Sustrato	Diana	Inhibidor	Facilitador
Tejido en parafina fijado con formalina	Virus de hepatitis C	Complejo de ribonucleótido vanadilo	Fenol/extracción con cloroformo
Aspirados y frotis nasofaríngeos	Bordetella pertussis	Inhibidores desconocidos	Fenol/extracción con cloroformo
Células sanguíneas humanas mononucleares	VIH tipo I	Detergentes	Aceite mineral
Mancha de sangre	ADN mitocondrial humano	Compuesto heme identificado, hemina	BSA
Sangre	Diversos	Heparina	Polimerasas y reguladores alternativos, chelex, espermina, [Mg ²⁺], glicerol, BSA, heparinasa
Esputo	Mycoplasma pneumonia	N-acetil-L-cisteína, ditiotretol, agentes mucolíticos	
Tejido humano	Genotipificación HLA-DRB1	Polen, polvo de guantes, ADN impuro, heparina, hemoglobina	
Especímenes clínicos	Mycobacterium tuberculosis	Desconocido	Control interno competitivo
Placa dental	Muchos	Desconocido	Tierra de diatomáceas, isotiocianato de guanidio, etanol, acetona
Tejidos de mamíferos antiguos	Gen de citocromo b	Desconocido	Acetato de amonio, bromuro de etidio

La amplificación de ADN o ADNc por reacción en cadena de polimerasa es una metodología probada y confiable; sin embargo, tal como se discutió más arriba, las polimerasas son inhibidas por reactivos contenidos en muestras curadas, incluyendo pero no limitándose a anticoagulantes usados de manera común y hemoglobina. Se han diseñado Taq polimerasas mutantes recientemente para encerrar los inhibidores comunes encontrados en sangre y suero. Polimerasas actualmente disponibles, por ejemplo, HemoKlenTaq™ (New England BioLabs, Inc., Ipswich, MA) así como OmniTaq™ y OmniKlenTaq™ (DNA Polimerase Technology, Inc., St. Louis, MO) son mutantes (por ejemplo, mutaciones de truncamiento y/o punto en terminal N), de Taq polimerasa que las hacen capaces de amplificar ADN en presencia de hasta 10%, 20% o 25% en sangre entera, dependiendo del producto y condiciones de reacción (véase, por ejemplo, Kermekchiev et al. Nucl. Acids Res. 31:6139 (2003); y Kermekchiev et al., Nucl.

5

10

Acid., Res., 37:e40 (2009); y véase la Patente de los Estados Unidos No. 7,462,475). Adicionalmente, Phusion® Blood Direct PCR Kits (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia), incluyen una enzima polimerasa de ADN de fusión única diseñada para incorporar un dominio de enlazamiento de ADN de cadena doble, que permite amplificación bajo condiciones que son típicamente inhibitorias para polimerasas convencionales tales como Taq o Pfu, y permiten la
 5 amplificación de ADN en la presencia de hasta aproximadamente 40% de sangre entera bajo ciertas condiciones de reacción. Véase Wang et al., Nuc. Acids Res. 32:1197 (2004); y véanse Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,352,778 y 5,500,363. Adicionalmente, Kapa Blood PCR Mixes (Kapa Biosystems, Woburn, MA), proveen una enzima polimerasa de ADN diseñada genéticamente que permite la amplificación directa de sangre entera hasta
 10 aproximadamente 20% del volumen de reacción bajo ciertas condiciones de reacción. A pesar de estos avances, la detección óptica directa de amplicones generados no es posible con los métodos existentes puesto que la fluorescencia, absorbancia y otros métodos basados en la luz producen señales que son detenidas por la presencia de sangre. Véase Kermekchiev et al., Nucl. Acid. Res., 37:e40 (2009).

Hemos encontrado que las muestras complejas tales como sangre entera pueden ser amplificadas directamente utilizando aproximadamente 5%, 10%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%,
 15 aproximadamente 25%, aproximadamente 40%, y aproximadamente 45% o más sangre entera en reacciones de amplificación, y que los amplicones resultantes pueden ser detectados directamente a partir de la reacción de amplificación utilizando mediciones de relajación por resonancia magnética (MR) por la adición de partículas magnéticas conjugadas enlazadas a oligonucleótidos complementarios a la secuencia de ácidos nucleicos diana. Alternativamente, las partículas magnéticas pueden ser agregadas a la muestra antes de la amplificación. Así, se
 20 proveen métodos para el uso de amplificación de ácidos nucleicos en una muestra sucia compleja, hibridación del amplicón resultante a partículas paramagnéticas, seguida por detección directa de conjugado de partículas magnéticas hibridadas y amplicones diana utilizando sistemas de detección basados en partículas magnéticas. En realizaciones particulares, la detección directa de los conjugados de partículas magnéticas hibridadas y amplicones se hace a través de mediciones de relajación MR (por ejemplo, T₂, T₁, híbrido T₁/T₂, T₂^{*}, etc). Se proveen
 25 adicionalmente métodos que son cinéticos, con el fin de cuantificar el número de copias de ácido nucleico originales dentro de la muestra (por ejemplo, muestreo y detección de ácido nucleico en números de ciclos predefinidos, comparación de ácidos nucleicos de control interno endógenos, uso de ácidos nucleicos de control competitivos homólogos seleccionados).

Los términos "amplificación" o "amplifica" o derivados de los mismos tal como se utilizan aquí significan uno o más
 30 métodos conocidos en el arte de copiar un ácido nucleico diana o de plantilla, incrementando por lo tanto el número de copias de una secuencia de ácidos nucleicos seleccionados. La amplificación puede ser exponencial o lineal. Una ácido nucleico diana o de plantilla puede ser ADN o ARN. Las secuencias amplificadas de esta manera forman una "región amplificada" o "amplicón". Las sondas cebadoras pueden ser diseñadas fácilmente por los experimentados en el arte para dirigirse una secuencia de ácido nucleico de plantilla específica. En ciertas realizaciones preferidas,
 35 los amplicones resultantes son cortos para permitir una ciclización y generación de copias rápida. El tamaño del amplicón puede variar según se necesite para proveer la capacidad de discriminar ácidos nucleicos diana de ácidos nucleicos no diana. Por ejemplo, los amplicones pueden tener menos de aproximadamente 1,000 nucleótidos de longitud. De manera deseable los amplicones tienen de 100 a 500 nucleótidos de longitud (por ejemplo, de 100 a 200, 150 a 250, 300 a 400, 350 a 450, 400 a 500 nucleótidos de longitud).

Mientras que los métodos de ejemplo descritos de aquí en adelante se relacionan con amplificación utilizando
 40 reacción en cadena de polimerasa ("PCR"), se conocen numerosos otros métodos en el arte para la amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, métodos isotérmicos, métodos de círculo en enrollamiento, etc.). Los experimentados en el arte entenderán que estos otros métodos pueden ser utilizados bien sea en lugar de, o junto con, los métodos de PCR. Véase, por ejemplo, Saiki, "Amplification of Genomic DNA" in PCR Protocols, Innis et al., Eds., Academic Press, San Diego, Calif., pp 13-20 (1990); Wharam et al., Nucleic Acids Res. 29:E54 (2001); Hafner et al.,
 45 Biotechniques, 30:852 (2001). Métodos de amplificación adicionales adecuados para uso con los presente métodos incluyen, por ejemplo, el método de reacción en cadena de polimerasa (PCR), PCR con transcripción reversa (RT-PCR), reacción en cadena de ligas (LCR), sistema de amplificación basado en transcripción (TAS), amplificación mediada por transcripción (TMA), método de amplificación basado en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), el método de amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), el método de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), el método de amplificación de ácidos nucleicos isotérmico e iniciado por cebadores quiméricos (ICAN), y el método del sistema de amplificación inteligente (SMAP). Estos métodos, así como otros son bien
 50 conocidos en el arte y pueden ser adaptados para uso en conjunción con métodos provistos de detección de ácidos nucleicos amplificados.

El método por PCR es una técnica para hacer muchas copias de una secuencia de ADN de plantilla. El proceso de PCR está divulgado en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,683,195; 4,683,202 y 4,965,188. Se diseña un conjunto de cebadores complementarios a un ADN de plantilla, y se amplifica una región flanqueada por los
 55 cebadores por ADN polimerasa en una reacción que incluye múltiples ciclos de amplificación. Cada ciclo de amplificación incluye una desnaturalización inicial, y hasta 50 ciclos de fusión, elongación (o extensión de cadena) y separación (desnaturalización de cadena). En cada ciclo de la reacción, la secuencia de ADN entre los cebadores es copiada. Los cebadores pueden enlazarse al ADN copiado así como a la secuencia de plantilla original, de tal

manera que el número total de copias se incrementa exponencialmente con tiempo. El PCR puede llevarse a cabo de acuerdo con Whelan, et al., *Journal of Clinical Microbiology*, 33:556(1995). Hay disponibles diversos métodos de PCR modificados y son bien conocidos en el arte. Diversas modificaciones tales como el método "RP-PCR en el cual el ADN es sintetizado a partir de ARN utilizando una transcriptasa reversa antes de llevar a cabo el PCR; y el método "TaqMan PCR", en el cual solamente un alelo específico es amplificado y detectado utilizando una sonda TaqMan marcada con fluorescencia y Taq DNA polimerasa, son conocidos por los experimentados en el arte. El RT-PCR y variaciones del mismo han sido descritos, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos No. 5,804,383; 5,407,800; 5,322,770; y 5,310,652, y las referencias descritas allí; y el PCR TaqMan y los reactivos relacionados para uso en el método han sido descritos, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,210,015; 5,876,930; 5,538,848; 6,030,787; y 6,258,569.

El LCR es un método de amplificación de ADN similar al PCR, excepto que utiliza cuatro cebadores en vez de dos y utiliza la enzima ligasa para ligar o unir dos segmentos de ADN. La amplificación puede llevarse a cabo en un ciclizador térmico (por ejemplo, LCx of Abbott Labs, North Chicago, IL). La LCR puede llevarse a cabo, por ejemplo, de acuerdo con Moore et al., *Journal of Clinical Microbiology* 36:1028 (1998). Los métodos y variaciones de LCR han sido descritos, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente Europea No. EP0320308, y la Patente de los Estados Unidos No. 5,427,930.

El método TAS es un método para amplificar específicamente un ARN objetivo en el cual se obtiene un transcripto a partir de un ARN de plantilla por una etapa de síntesis de ADNc y una etapa de transcripción de ARN. En la etapa de síntesis de ADNc, una secuencia reconocida por una ARN polimerasa dependiente de ADN (esto es, una secuencia de enlazamiento a polimerasa o PBS) se inserta en la copia de ADNc corriente abajo del objetivo o secuencia marcadora para ser amplificada utilizando un cebador de oligonucleótidos de dos dominios. En la segunda etapa la ARN polimerasa se utiliza para sintetizar múltiples copias de ARN a partir de la plantilla de ADNc. La amplificación utilizando TAS requiere solamente unos pocos ciclos porque la transcripción de ARN dependiente de ADN puede dar como resultado 10-1000 copias para cada copia de plantilla de ADNc. La TAS puede ser ejecutada de acuerdo con Kwoh et al., *PNAS* 86:1173 (1989). El método TAS ha sido descrito, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud Internacional de Patente No. WO1988/010315.

La amplificación mediada por transcripción (TMA) es una reacción de amplificación isotérmica basada en transcripción que utiliza la transcripción de ARN por ARN polimerasa y transcripción de ADN por transcriptasa reversa para producir un amplicón de ARN a partir de un ácido nucleico diana. Los métodos TMA son ventajosos puesto que producen de 100 a 1000 copias por amplicón por ciclo de amplificación, en oposición a los métodos PCR o LCR que producen solamente dos copias por ciclo. La TMA ha sido descrita, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 5,399,491. La NASBA es un método basado en transcripción el cual para amplificar específicamente un ARN objetivo bien sea de una plantilla de ARN o ADN. El NASBA es un método usado para la amplificación continua de ácidos nucleicos en una mezcla individual una temperatura. Se obtiene un transcripto a partir de una plantilla de ARN por ARN polimerasa dependiente de ADN utilizando un cebador de avance que tiene una secuencia idéntica a un ARN objetivo y un cebador reverso que tiene una secuencia complementaria al ARN objetivo en el lado 3' y una secuencia promotora que reconoce la T7 ARN polimerasa en el lado 5'. Se sintetiza adicionalmente un transcripto utilizando el transcripto obtenido como plantilla. Este método puede ser llevado a cabo de acuerdo con Heim, et al., *Nucleic Acids Res.*, 26:2250 (1998). El método NASBA ha sido descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 5,130,238.

El método SDA es un método de amplificación de ácidos nucleicos isotérmico en el cual el ADN diana es amplificado utilizando una cadena de ADN sustituida con una cadena sintetizada mediante un ADN polimerasa tipo sustitución de cadena que carece de actividad de exonucleasa 5' → 3' mediante un intruso de cadena individual generado por una enzima de restricción como plantilla de la siguiente replicación. Un cebador que contiene un sitio de restricción es fusionado a la plantilla, y luego los cebadores de amplificación son fusionados a secuencias adyacentes 5' (formando un intruso). La amplificación se inicia una temperatura fija. Las cadenas de ADN recién sintetizadas son introducidas mediante una red de enzimas de restricción y la amplificación por polimerasa comienza de nuevo, desplazando las cadenas recién sintetizadas. El SDA puede ser llevado a cabo de acuerdo con Walker, et al., *PNAS*, 89:392 (1992). Los métodos SDA han sido descritos en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,455,166 y 5,457,027.

El método LAMP es un método de amplificación isotérmica en el cual se forma siempre un bucle en el extremo 3' de un ADN sintetizado, los cebadores son fusionados dentro del bucle, y la amplificación específica del ADN diana se lleva a cabo isotérmicamente. El LAMP puede ser llevado a cabo de acuerdo con Nagamina et al., *Clinical Chemistry*, 47:1742 (2001). Los métodos LAMP han sido descritos en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,410,278; 6,974,670; y 7,175,985.

El método ICAN es un método de amplificación isotérmica en el cual la amplificación específica de un ADN diana, se lleva a cabo isotérmicamente mediante una reacción de sustitución de cadena, una reacción de intercambio de plantilla y una reacción de introducción de intruso, utilizando un cebador quimérico que incluye ARN-ADN y ADN polimerasa que tiene una actividad de sustitución de cadena y ARNasa H. El ICAN puede llevarse a cabo de

acuerdo con Mukai et al., J. Biochem. 142: 273(2007). El método ICAN ha sido descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 6,951,722.

El método SMAP (MITANI) es un método en el cual un ácido nucleico diana es sintetizado de manera continua bajo condiciones isotérmicas utilizando un primer conjunto que incluye dos clases de cebadores y ADN o ARN como una plantilla. El primer cebador incluido en el conjunto de cebadores incluye, en la región de extremo 3' del mismo, una secuencia (Ac') hibridable con una secuencia (A) en la región extremo 3' de una secuencia de ácidos nucleicos diana así como, en el lado 5' de la secuencia (Ac') antes mencionada, una secuencia (B') hibridable con una secuencia (Bc) complementaria a una secuencia (B) existente en el lado 5' de la secuencia (A) antes mencionada en la secuencia de ácidos nucleico diana antes mencionado. El segundo cebador incluye, en la región terminal 3' de la misma, una secuencia (Cc') hibridable con una secuencia (C) en la región terminal 3' de una secuencia complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana antes mencionada así como una secuencia de retrobucle (D-Dc') que incluye dos secuencias de ácido nucleico hibridables una con otra en una cadena idéntica en el lado 5' de la secuencia (Cc') antes mencionada. El SMAP puede ser llevado a cabo de acuerdo con Mitani et al., Nat. Methods, 4(3): 257 (2007). Los métodos SMAP han sido descritos en las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nos. 2006/0160084, 2007/0190531 y 2009/0042197.

La reacción de amplificación puede ser diseñada para producir un tipo específico de un producto amplificado, tal como ácidos nucleicos que son de doble cadena; de cadena sencilla; de doble cadena con sobrantes 3' o 5'; o de doble cadena con ligandos químicos en los extremos 5' y 3'. El producto de PCR amplificado puede ser detectado por: (i) hibridación del producto amplificado a oligonucleótidos complementarios enlazados a una partícula magnética en donde se utilizan dos oligonucleótidos diferentes que hibridan al producto amplificado de tal manera que el ácido nucleico sirve como una interpartícula de atadura que promueve la aglomeración de las partículas; (ii) detección mediada por hibridación en donde el ADN del producto amplificado debe ser desnaturalizado primero; (iii) detección mediada por hibridación en donde las partículas hibridan a sobrantes en 5' y 3' del producto amplificado; (iv) enlazamiento de las partículas al ligando químico o bioquímico en los terminales del producto amplificado, tal como partículas funcionalizadas con estreptavidina que enlazan a un producto amplificado funcionalizado con biotina.

Los métodos de la invención pueden ser utilizados para llevar a cabo PCR en tiempo real y proveer información cuantitativa acerca de la cantidad de ácido nucleico diana presente en una muestra (véase figura 52 y Ejemplo 18). Los métodos para llevar a cabo PCR en tiempo real cuantitativo se proveen en la literatura (véanse por ejemplo, RT-PCR Protocols. Methods in Molecular Biology, Vol. 193. Joe O'Connell, ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2002, 378 pp. ISBN 0-89603-875-0.). El Ejemplo 18 describe el uso de los métodos de la invención para análisis por PCR en tiempo real de una muestra de sangre entera.

Los métodos de la invención pueden ser utilizados para llevar a cabo PCR en tiempo real directamente en muestras opacas de sangre entera, utilizando nanopartículas magnéticas modificadas con sondas de captura y separación magnética. La utilización de PCR en tiempo real permite la cuantificación de un ácido nucleico diana sin abrir el tubo de reacción después de que la reacción de PCR ha comenzado.

En una metodología, pueden utilizarse cebadores marcados con biotina o avidina para llevar a cabo PCR en tiempo real. Estas marcaciones tendrían unidades estructurales de enlazamiento correspondientes en las partículas magnéticas podrían tener tiempos de enlazamiento muy rápidos. Esto permite que un producto de doble cadena sea generado y permita tiempos de enlazamiento a partículas mucho más rápidos, haciendo disminuir el tiempo utilizado global. La química de enlazamiento sería reversible, evitando que los cebadores permanezcan enlazados a las partículas. Con el fin de reversar el enlazamiento, la muestra puede ser calentada o ajustado el pH.

En otra metodología, el PCR en tiempo real puede lograrse a través de la generación de ADN dúplex con sobrantes que pueden hibridar a las partículas superparamagnéticas. Adicionalmente, las sondas de captura LNA y/o fluoradas pueden acelerar los tiempos de hibridación. Un conjunto de ejemplo de zonas de captura útiles en este método se define en la tabla a continuación.

Pan Candida F cola única	5'- CAT GAT CTG CTG CAG /iSp18/GG CAT GCC TGT TTG AGC GTC -3' (SEQ ID NO. 19)
Pan Candida R cola única	5'- GCA GAA CTC CAG ACC /iSp18/GC TTA TTG ATA TGC TTA AGT TCA GCG GGT -3' (SEQ ID NO. 20)
3'AM universal cola CP	5'- CTG CAG CAG ATC ATG TTT TTT TTT TTT /3AmMO/ -3' (SEQ ID NO. 21)

5'AM universal cola CP	5'- /5AmMC6/TT TTT TTT TTT TGG TCT GGA GTT CTG C -3'
3'AM uni CP Fluorado	5'- CTG /i2FC/AG /i2FC/AG /i2FA/TC /i2FA/TG TTT TTT TTT TTT /3AmMO/ -3' (SEQ ID NO. 22)
5'AM uni CP Fluorado	5'- /5AmMC12/TT TTT TTT TTT TGG T/i2FC/T G/i2FG/A G/i2FU/T CTG C -3' (SEQ ID NO. 23)

En todavía otra metodología, las partículas están diseñadas para tener una horquilla que sepulta el sitio de enlazamiento al amplicón. El calentamiento de las partículas una temperatura de fusión más alta expondría el sitio de enlazamiento de la horquilla para permitir el enlazamiento a la diana.

5 En otra metodología, una sonda que hibrida a un amplicón ata dos (o más) partículas. La reacción sería llevada a cabo en la presencia de una polimerasa con actividad de exonucleasa en 5', dando como resultado la escisión de la atadura interpartículas y un cambio subsecuente en T2. La polimerasa es seleccionada para tener actividad de exonucleasa y compatibilidad con la matriz de selección (por ejemplo sangre). En esta metodología, pueden utilizarse partículas más pequeñas (por ejemplo, CLIO de 30 nm) para reducir el impedimento estérico de la hibridación a la diana o digestión enzimática subsecuente durante la polimerización (véanse, por ejemplo, Heid et al Genome Research 1996 6: 986-994).

15 En otra metodología, pueden sintetizarse dos poblaciones de partículas para soportar sondas de captura complementarias. En ausencia de amplicón, las sondas de captura hibridan promoviendo la aglomeración de partículas. Al generar el amplicón, el amplicón puede competir, hibridar y desplazar las zonas de captura llevando a la desaglomeración de las partículas. El método puede ser llevado con la presencia o ausencia de nanopartículas. Las partículas libres en solución se aglomerarán y desaglomerarán debido al termociclado (puesto que por ejemplo, el Tm puede estar por debajo de 95°C). El Tm del amplicón que se enlaza una de las sondas de captura inmovilizadas por la partícula puede ser diseñado de tal manera que la interacción de enlazamiento sea más favorable que la interacción de enlazamiento partícula a partícula (por ejemplo, el diseño de mutaciones puntuales con las sondas de captura para desestabilizar termodinámicamente los dúplex). En esta realización, la concentración de partículas puede mantenerse, por ejemplo, a niveles bajos o altos. Ejemplos de sondas y cebadores útiles en tales sistemas se definen en la tabla a continuación.

C.albicans ITS2 Reverso P	5'- CCG TCT TTC AAG CAA ACC CAA GTC G -3' (SEQ ID NO. 24)
C.albicans ITS2 de avance P	5'- TTT CTC CCT CAA ACC GCT GG -3' (SEQ ID NO. 25)
C.alb ITS2 CP1	5'- /5AmMC12/TT TTT TTT TTT TTT TGG TTT GGT GTT GAG CAA TAC G -3' (SEQ ID NO. 26)
C.alb ITS2 CP2	5'- /5AmMC12/TT TTT TTT TTT TCG TAT TGC TCA ACA CCA AAC C -3' (SEQ ID NO. 27)
C.alb ITS2 Largo CP1	5'- /5AmMC12/TT TTT TTT TTT TTT TAC CGC TGG GTT TGG TGT TGA GCA ATA CG -3' (SEQ ID NO. 28)
C.alb ITS2 Largo CP2	5'- /5AmMC12/TT TTT TTT TTT TTT TAC CGC TGG GTT TGG TGT TGA GCA ATA CG -3' (SEQ ID NO. 29)
C.alb ITS2 mut 3 CP1	5'- /5AmMC12/TT TTT TTT TTT TGG TTT GGC GTA GAG CCA TAC G -3' (SEQ ID NO. 30)
C.alb ITS2 mut 4 CP1	5'- /5AmMC12/TT TTT TTT TTT TGG TCT GGC GTA GAG CCA TAC G -3' (SEQ ID NO. 31)

Trabajos previos han demostrado que en algunos casos la presencia de partículas en la reacción de PCR podría

inhibir el PCR. Para estas partículas inhibidoras, se prevé que las partículas podrían ser haladas al sitio del tubo (u otra localización dentro del contenedor) para mantenerlas fuera de la solución durante la reacción de PCR. Pueden utilizarse métodos para liberar las partículas de regreso a la suspensión con el fin de permitirles hibridar al producto de PCR y luego extraerlas de nuevo de la solución.

- 5 En ciertas realizaciones, los métodos de la invención presentan el uso de enzimas compatibles con sangre entera, por ejemplo, enzima para sangre entera NEB Hemoklentaq, DNAP Omniklentaq, Kapa Biosystems, enzima Thermo-Fisher Finnzymes Phusion.

Los métodos de la invención también presentan PCR asimétrico cuantitativo en una realización preferida. Cualquiera de los métodos de PCR de tiempo real de la invención, el método puede involucrar las siguientes etapas:

- 10 1. tomar alícuotas de sangre entera en una matriz maestra de PCR preparada que contiene partículas superparamagnéticas;
2. antes del primer ciclo de PCR, cerrar el tubo hasta que se termine la ciclización por PCR;
3. cargar el tubo sobre el ciclizador térmico;
4. llevar a cabo "n" ciclos de ciclización térmica por PCR estándar;
- 15 5. llevar a cabo una detección T2 (la duración exacta del tiempo y las etapas varían dependiendo de la metodología de diseño bioquímico y de partícula descrito más adelante); y
6. repetir las etapas 4 y 5 hasta que se hallan tomado suficientes lecturas de T2 para una cuantificación exacta de la concentración de diana inicial.

- 20 Los métodos anteriores pueden ser utilizados con cualquiera de las siguientes categorías de detección de agregación o desagregación descritas aquí, incluyendo:

Nombre	Descripción
Detección basada en aglomeración y separación magnética	<ul style="list-style-type: none"> • Partículas >100 nm o compatibles con separación magnética. • Partículas retiradas de la solución durante PCR • T2 se eleva con la generación de amplicón • Agitación durante la etapa 5
Detección basada en aglomeración con partículas >100 nm	<ul style="list-style-type: none"> • Partículas >100 nm • Partículas no inhiben PCR • T2 se eleva con generación de amplicón • Agitación durante la etapa 5
Detección basada en desaglomeración y separación magnética	<ul style="list-style-type: none"> • Partículas >100 nm • Partículas al lado del tubo durante PCR • T2 cae con la generación de amplicón • Agitación durante la etapa 5
Detección basada en desaglomeración con partículas >100 nm	<ul style="list-style-type: none"> • Partículas >100 nm • Partículas no inhiben PCR • T2 cae con la generación de amplicón • Agitación durante la etapa 5
Detección basada en aglomeración con partículas <100 nm	<ul style="list-style-type: none"> • Partículas <100 nm (por ejemplo, partículas de 30 nm) • T2 cae con la aparición de amplicón (al menos para ciclos iniciales, T2 puede incrementarse subsecuentemente a medida que se incrementa el tamaño del aglomerado) • Tiene potencial para tiempos de hibridación mucho más rápidos. • No se requiere agitación para mantener las partículas suspendidas • Concentración de partículas en rango de nM

Nombre	Descripción
Detección basada en desaglomeración con partículas <100 nm	<ul style="list-style-type: none"> • Partículas <100 nm (por ejemplo, partículas de 30 nm) • T2 cae se eleva con la aparición de amplicón • T2 podría disminuir a medida que el tamaño del aglomerado se incrementa por encima de 100 nm • No se requiere agitación para mantener las partículas suspendidas. • Tiene potencial para tiempos de detección más rápidos. • Concentración de partículas en el rango de nM

Una variedad de impurezas y componentes de la sangre entera pueden ser inhibidores para la polimerasa y la fusión del cebador. Estos inhibidores pueden llevar a la generación de falsos positivos y bajas sensibilidades. Para reducir la generación de falsos positivos y bajas sensibilidades cuando se amplifican y detectan ácido nucleicos en muestras complejas, es deseable utilizar una polimerasa estable térmicamente no inhibida por las muestras de sangre entera (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 7,462,475) e incluir uno o más controles de ensayo de PCR internos (véase Rosenstraus et al. J. Clin Microbiol. 36:191 (1998) y Hoofar et al., J. Clin. Microbiol. 42:1863 (2004)). Por ejemplo, para asegurar que los especímenes clínicos son amplificados y detectados exitosamente, el ensayo puede incluir un ácido nucleico de control interno que contiene regiones de enlazamiento de cebador idénticas a las de la secuencia diana. Como se muestra en los ejemplos, el ácido nucleico diana y el control interno pueden ser seleccionados de tal manera que cada uno tenga una región de enlazamiento a sonda única que diferencie el control interno del ácido nucleico diana. El control interno, opcionalmente, se emplea en combinación con un control positivo de procesamiento, un control negativo de procesamiento, y un control de reactivos para la determinación e identificación segura y exacta de un organismo infeccioso, por ejemplo, en una muestra clínica de sangre entera. El control interno puede ser un control de inhibición que está diseñado para coamplificar el ácido nucleico diana que está siendo detectado. El fallo en el control de la inhibición interna que va a ser amplificada es evidencia de un fallo de reactivo o de error de proceso. Pueden diseñarse cebadores universales de tal manera que la secuencia diana y la secuencia de control interno se amplifica en el mismo tubo de reacción. Así, utilizando este formato, si el ADN diana es amplificado pero el control interno no lo es se asume entonces que el de ADN diana está presente en una cantidad proporcionalmente mayor que la del control interno y el resultado positivo es válido puesto que la amplificación del control interno es innecesaria. Si, por otro lado, ni el control interno ni la diana son amplificados se asume que ha ocurrido inhibición de la reacción de PCR y la prueba para esa muestra particular no es válida. Los ensayos de la invención pueden incluir uno o más controles de procesamiento positivos en los cuales uno o más ácidos nucleicos diana son incluidos en el ensayo (por ejemplo, cada uno incluido con uno o más cartuchos) a 3x hasta 5x el límite de detección. El T2 medido para cada uno de los controles de procesamiento positivos debe estar por encima del umbral predeterminado que indica la presencia del ácido nucleico diana. Los controles de procesamiento positivos pueden detectar todos los fallos de reactivos en cada etapa del proceso (por ejemplo, lisis, PCR y detección de T2), y pueden ser utilizados para control de calidad del sistema. Los ensayos de la invención pueden incluir uno o más controles de procesamiento negativos consistentes de una solución libre de ácido nucleico diana (por ejemplo, regulador solo). Las mediciones de T2 para el control de procesamiento negativo deberían estar por debajo del umbral indicando un resultado negativo mientras que el T2 medido para el control interno está por encima del umbral de decisión indicando un resultado positivo de control interno. El propósito del control negativo es detectar el arrastre de contaminación y/o contaminación de reactivos. Los ensayos de la invención pueden incluir uno o más controles de reactivos. El control de reactivos detectará fallos en los reactivos en la etapa de PCR de la reacción (esto es, transferencia incompleta de la mezcla principal a los tubos de PCR). Los controles de reactivos también pueden detectar fallos graves en la transferencia de reactivos antes de la detección de T2.

Control de contaminación

Uno de los problemas principales en el uso de PCR como herramienta analítica es el riesgo de tener nuevas reacciones contaminadas con productos amplificados anteriores. Fuentes potenciales de contaminación incluyen a) grandes números de organismos diana en especímenes clínicos que pueden dar como resultado contaminación cruzada, b) clones de plásmidos derivados de organismos que han sido analizados previamente y que pueden estar presentes en números mayores en el ambiente del laboratorio, y c) amplificación repetida de la misma secuencia diana que lleva a la acumulación de productos de amplificación en el ambiente del laboratorio. Una fuente común de la acumulación del amplicón de PCR es la aerosolización del producto. Típicamente, si ocurre una aerosolización no controlada, el amplicón contaminará los reactivos, equipo y sistemas de ventilación del laboratorio. Cuando esto sucede, todas las reacciones serán positivas, y no es posible distinguir entre los productos amplificados de la contaminación o una muestra positiva verdadera. Además de tomar precauciones para evitar o controlar este arrastre de productos antiguos, es necesario incluir una reacción de referencia de blanco en cada experimento de PCR para verificar cualquier arrastre. Con el fin de asegurarse de que todos los resultados son confiables, no

debería haber productos amplificados después de los ciclos de temperatura. Una contaminación por arrastre será visible en el gel de agarosa como bandas tenues. Adicionalmente, también es muy importante incluir una muestra positiva. Si, al contrario de lo esperado, la muestra es negativa, ninguno de los resultados puede ser considerado como verosímil (véase Aslanzadeh et al., *Annals of Clin Lab Science*, 34:389 (2004)).

- 5 Es concebible que los reactivos utilizados para preparar el PCR puedan estar contaminados. Después de la amplificación una muestra positiva puede contener 250 ng de producto de PCR en 50 μ l. Esto da un total de 3×10^{11} copias de producto de doble cadena de 600 bp. Una milésima de un microlitro de esta reacción contendrá aproximadamente 8 millones de copias. Si se forma un aerosol muy pequeño e invisible cuando se abre el recipiente de PCR, hay la posibilidad de que este aerosol pueda contener un número muy grande de productos amplificados.
- 10 Adicionalmente, las gotitas microscópicas en un aerosol son capaces de flotar durante un largo tiempo en el aire, y si hay turbulencia en el ambiente, pueden ser arrastradas una distancia larga. Considerando el hecho de que solamente una copia es suficiente para crear una reacción de falso positivo, es obvio que debe tenerse gran cuidado para evitar esta contaminación por arrastre.

Para abordar el problema de la contaminación, pueden utilizarse uno o más de los siguientes protocolos:

- 15 (i) Reemplace todos los reactivos y reguladores de reserva con productos químicos nuevos y agua nueva que nunca haya estado en contacto con las áreas de preparación de muestras y análisis por PCR.

(ii) Divida físicamente el área de mezcla de reactivos y preparación de muestras del área de análisis de producto (Kwok & Higuchi, *Nature*, 339:237 (1989)).

- 20 (iii) Las estaciones de trabajo de preparación de muestras pueden ser limpiadas (por ejemplo, con solución de hipoclorito de sodio al 10%, seguida por eliminación de la lejía con etanol). La ruptura oxidativa de los ácidos nucleicos evita la reamplificación de las impurezas en subsecuentes reacciones de PCR.

- (iv) La esterilización de los productos de amplificación asegura que los ensayos de diagnóstico subsecuentes no están comprometidos por el ADN arrastrado, y deben seguir dos criterios aceptados generalmente: (a) el PCR necesita estar expuesto al ambiente después de que ha habido alguna forma de modificación del amplicón, y (b) la modificación no debe interferir con el método de detección. Por ejemplo, la irradiación UV puede eliminar efectivamente el ADN contaminante (véase Rys et al., *J. Clin Microbiol.* 3:2356 (1993); y Sarker et al., *Nature*, 343:27 (1990)), pero la irradiación de los reactivos para PCR debe tener lugar antes de la adición de la polimerasa, cebadores y ADN de plantilla. Adicionalmente, esta metodología puede ser ineficiente porque los grandes números de mononucleótidos presentes en la reacción absorberán mucha de la luz UV (véase Frothingham et al., *BioTechniques* 13:208 (1992)). La esterilización por la luz UV de los productos de amplificación utiliza la propiedad de la luz UV para inducir los dímeros de timina y otras modificaciones covalentes del ADN que hacen no amplificable el ADN contaminante. Alternativamente, la incorporación dUTP en los fragmentos amplificados también alterarán la composición del producto de tal manera que es diferente de la composición del ADN plantilla (véase Longo et al., *Gene* 93:125 (1990); y Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,035,996; 7,687,247; y 5,418,149). La enzima uracil-N-glicosilasa (UNG) se añade junto con la enzima PCR normal a la mezcla de reacción. La enzima UNG escindirá la base de uracilo de las cadenas de ADN antes de la amplificación, y deja todos los productos antiguos amplificados incapacitados para actuar como plantillas para nuevas amplificaciones, pero no reaccionarán con dUTP no incorporado o nueva plantilla. Esto eliminará muy eficientemente los productos de PCR contaminantes de la reacción después de que el recipiente de PCR haya sido cerrado, y así no es posible una nueva contaminación. Sin embargo, el uso de dUTP en las reacciones de PCR para evitar el arrastre puede causar problemas cuando los productos se utilizan en un estudio de hibridación posterior, debido a la baja capacidad del uracilo para actuar en la hibridación (Carmody et al., *Biotechniques* 15:692 (1993)). El dUTP se incorpora en vez del dTTP. Cuando una sonda rica en T es amplificada con la sustitución de dTTP en vez de dUTP en la mezcla de reacción, puede eliminarse una señal de hibridación posterior con la sonda. Para evitar el descenso en la señal de hibridación el sitio de enlazamiento de la sonda debe ser escogido con no más de 25% de T, y sin estiramientos de poli-T. Además, el PCR debería contener concentraciones iguales de dUTP y dTTP y no solamente dUTP. En contraste con el descenso en la señal de hibridación está el incremento en la amplificación de producto cuando se utiliza dUTP, especialmente cuando se seleccionan secuencias diana ricas en AT. Esto se debe probablemente a que la incorporación de dUTP hace disminuir la fusión de los productos de PCR formados lo que evitaría que los cebadores se fusionen. Si esta metodología se utiliza para incrementar el rendimiento de producto, los sitios de enlazamiento del cebador deberían ser seleccionados con un bajo contenido de T, puesto que la primera fusión también será inhibida por la incorporación de dUTP (Carmody et al., *Biotechniques* 15:692 (1993)). El UDG lábil al calor aislado de BMTU 3346 está descrito en Schmidt et al., *Biochemica* 2:13 (1996) (véase también la Patente de los Estados Unidos No. 6,187,575). Un gen de uracil-ADN glicosilasa de *Psychrobacter* sp HJ147 está descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 7,723,093. Finalmente una uracil-ADN glicosilasa de bacalao ha sido descrita (Patente de los Estados Unidos No. 7,037,703).

(v) La digestión por ADNasa después de PCR puede ser utilizada para reducir la contaminación. Fue identificada una enzima ADNasa lábil al calor que puede ser usada para digerir ADN ds para eliminar cualquier ADN

contaminante antes de la etapa de amplificación por PCR del ADN diana. En este caso, el ADN ds es digerido, la muestra es calentada para inactivar la ADasa y la muestra diana y los reactivos de PCR se agregan al tubo de reacción para llevar a cabo la PCR específica de la diana (véase la Patente de los Estados Unidos No. 6,541,204).

(vi) La esterilización después de PCR puede ser utilizada para reducir la contaminación. La incorporación de un reactivo fotoquímico (isopsoraleno) en el producto durante la amplificación creará una diferencia en composición entre el ADN plantilla y los productos de PCR amplificados (véase Rys et al., J. Clin Microbiol. 3:2356 (1993). Los compuestos de furocumarina, tales como isopsoraleno y psoraleno, son una clase de reactivos tricíclicos planos que son conocidos por intercalarse entre los pares de ácidos nucleicos (véase Patente de los Estados Unidos No. 5,532,145). El tratamiento con luz del recipiente de PCR cerrado hará que los productos de PCR formados previamente sean incapaces de actuar como plantillas para amplificación posterior. Las capacidades de hibridación del producto no cambian, pero las capacidades de detección sobre gel de agarosa pueden disminuir debido al enlazamiento reducido del EtBr. El isopsoraleno de 25 mg/ml ha demostrado ser ineficaz en la prevención de la contaminación, y a concentraciones de hasta 100 mg/ml, el isopsoraleno puede tener un efecto inhibitorio sobre la reacción de PCR misma (véase la Patente de los Estados Unidos No. 5,221,608). Alternativamente, la hidrólisis del cebador puede ser utilizada para esterilizar una reacción después de la amplificación. La hidrólisis del cebador de la esterilización de productos de amplificación se basa en los cebadores quiméricos sintetizados exclusivamente que contienen uno o más enlaces ribosa en el extremo 3'. Los productos de amplificación generados que contienen estos residuos ribosa son susceptibles de hidrólisis alcalina en el sitio de la molécula de ribosa. El método incluye exponer a NaOH 1M e incubar durante 30 minutos para hidrolizar los productos de amplificación en los sitios de la ribosa incorporada. Así, si hay contaminación por arrastre, el antiguo amplicón habrá perdido su primer sitio debido a la hidrólisis de las moléculas de ribosa y el nuevo amplicón tendrá los sitios de enlazamiento a cebador. En otra metodología, la adición de clorhidrato de hidroxilamina a los tubos de reacción de PCR después de la amplificación es esterilizar los contenidos de la reacción, y es especialmente efectiva para productos de amplificación cortos (<100 bp) y ricos en GC. La hidroxilamina reacciona preferencialmente con átomos de oxígeno a los residuos citosina y crea aductos covalentes que evitan el apareamiento de bases con residuos guanina en reacciones subsecuentes. Así, el producto de amplificación modificado es reconocido como diana de amplificación en reacciones de PCR subsecuentes.

(vii) La prevención del arrastre por el cambio de la composición de productos a partir de la plantilla puede reducir la contaminación. En una metodología la composición de ADN del producto de pCR puede ser diferente de la composición de ADN de la plantilla natural. Se prevé que esta composición alterada hará que los productos de PCR sean sensibles al tratamiento y no alterará el ADN de plantilla. El tratamiento del recipiente de PCR cerrado justo antes de la amplificación debería hacer que el producto de PCR contaminante sea incapaz de participar en la amplificación. Aquí la modificación tendría que ser inocua al método de detección. Los tipos de modificaciones que pueden ser útiles en la distinción del producto de amplificación contaminante serán evidentes, pero incluyen la introducción de un ligando, agente de entrecruzamiento, sitio de reconocimiento enzimático u otra unidad estructural escindible (véanse las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,427,929; 5,650,302; 5,876,976 y 6,037,152).

Uno o más de los métodos descritos anteriormente pueden ser utilizados en conjunción con los métodos de la invención para reducir el riesgo de contaminación y falsos positivos. El arrastre de productos de PCR amplificados antiguos puede ser un riesgo muy serio en el análisis de ácidos nucleicos en la plataforma de diagnóstico T2 Biosystems. Una manera de evitar esta contaminación es dividir físicamente las áreas de trabajo de PCR. Alternativas a la separación física del método de reacción de PCR incluyen irradiación UV de la mezcla para PCR y la incorporación de reactivos en el producto de PCR recién formado puede ser utilizada para alterarlo con respecto a la plantilla.

Cinética de reacción

La reacción de las partículas magnéticas y los analitos específicos para formar agregados puede utilizarse para producir una señal de diagnóstico de los ensayos de la invención. En muchos casos, la incubación de la mezcla de reacción durante un período de tiempo es suficiente para formar los agregados. Los métodos, kits, cartuchos y dispositivos descritos pueden ser configurados para acortar la cantidad de tiempo necesaria para capturar un analito particular, o producir agregados de partículas magnéticas. A la vez que alterar la concentración global de las partículas magnéticas parecería ser una metodología simple indirecta para incrementar las tasas de agregación, esta metodología es complicada porque (i) la agregación no específica que puede surgir con concentraciones de partículas magnéticas altas, y (ii) la necesidad de producir un cambio de señal observable (esto es, cambio en la señal de relajación) en respuesta a la agregación en presencia de una concentración baja de analitos. La cinética de reacción puede ser mejorada, por ejemplo, por agregación mecánicamente inducida, por agregación inducida acústicamente, por agregación inducida por vía ultrasónica, por agregación inducida electrostáticamente, o por atrapamiento de las partículas magnéticas en una porción de la muestra líquida.

Agregación inducida mecánicamente

La cinética de la agregación puede ser incrementada haciendo pasar la solución de partícula/analito a través de un

recipiente en el cual hay un estrechamiento de la ruta del flujo de fluido. El estrechamiento potencia las interacciones partícula-partícula.

Agregación inducida por vía acústica

- 5 La agregación de partículas magnéticas puede acelerarse aplicando una onda acústica a la muestra (véase Aboobaker et al., *Journal of Environmental Engineering*, 129:427 (2003) y la Patente de los Estados Unidos No. 4,523,682). Por ejemplo, puede utilizarse una cámara de flujo con dos transductores en extremos opuestos para generar una onda acústica en la muestra que hace que las partículas magnéticas migren (o sean segregadas) de una manera que incrementa la tasa de agregación de las partículas magnéticas.

Agregación inducida por vía ultrasónica

- 10 La agregación de partículas magnéticas puede ser acelerada aplicando una onda ultrasónica a la muestra (véase Masudo et al., *Anal. Chem.* 73:3467 (2001)). En la presencia de una onda de ultrasonido plana constante las partículas pueden moverse hacia el nodo de la onda a lo largo del gradiente de fuerza de ultrasonido. Esta metodología puede ser utilizada para proveer un método confiable para ayudar en la reacción de aglomeración.

Agregación inducida electrostáticamente

- 15 La agregación de partículas magnéticas puede ser acelerada por interacciones electrostáticas. Las separaciones o movimiento electrostático de las partículas magnéticas utilizan diferencias inherentes en las características de las cargas de fricción, conductibilidad eléctrica y constantes dieléctricas. Puesto que las partículas magnéticas se comportan de manera diferente bajo la aplicación de un campo electrostático, pueden ocurrir movimiento y colisiones potenciadas. La fuerza electrostática ejercida sobre las partículas puede ser proporcional al área superficial disponible para la carga de superficie, de tal manera que las nanopartículas se moverán típicamente en la presencia del campo electrostático cuando se recubren con materiales variables, tales como dextrano u otros recubrimientos moleculares grandes, y si la nanopartícula ha unido una de las unidades estructurales de enlazamiento un analito. Las nanopartículas se cargarán primero y la carga podría ser pulsada opcionalmente. Véase, por ejemplo, Sinyagin et al., *J. Phys. Chem. B* 110:7500 (2006); Kretschmer et al., *Langmuir* 20:11797 (2004); Bernard et al., *Nanotechnology* 18: 235202 (2007); y Costanzo et al., *Lab Chip* 2005 5:606 (2005).

Atrapamiento

- 30 Las partículas magnéticas derivadas con una unidad estructural de enlazamiento pueden ser mantenidas en posición mediante un campo magnético externo mientras que la muestra que contiene el analito correspondiente circula pasando las partículas magnéticas "atrapadas" permitiendo la captura y/o concentración del analito de interés. La captura y/o agregación puede ser facilitada por exposición a un campo magnético (esto es, MAA o gMAA) como se describe aquí.

- 35 Alternativamente, la cinética de la agregación de partículas magnéticas puede ser incrementada secuestrando las partículas magnéticas en un compartimento definido por una membrana porosa, tal como una bolsa de té, lo que permite el flujo de analitos hacia dentro y hacia afuera del compartimento. El incremento en la concentración local de partículas magnéticas puede incrementar la cinética de reacción entre las partículas magnéticas y los analitos, y la cinética de agregación. Después de mezclar la solución y las partículas magnéticas durante un período predeterminado de tiempo, las partículas magnéticas son liberadas del compartimento y se mide la muestra.

- 40 En ciertos casos, las partículas pueden ser llevadas al lado o parte inferior del recipiente de ensayo, o puede estar presente una malla magnetizable o una espuma metálica magnetizable con tamaño de poro apropiado en el recipiente de reacción, creando gradientes magnéticos locales muy altos. La espuma metálica genera gradientes de campo magnético locales muy altos sobre distancias muy cortas que pueden atraer las partículas magnéticas derivadas y ponerlas en contacto con el asociado de enlazamiento complementario sobre la espuma metálica y mejorar las oportunidades de una interacción productiva específica. Una ventaja de tener la malla/espuma metálica en el recipiente de reacción es que la distancia que cada partícula magnética necesita recorrer para ser "atrapada" o "capturada" puede ser muy corta mejorando la cinética del ensayo. Por ejemplo, a un tubo de reacción puede agregarse una espuma de malla magnetizable que tiene poros de 100 a 1000 micrones, una muestra líquida, y partículas magnéticas para detectar un analito en la muestra líquida. El tubo de reacción es expuesto a un campo magnético para magnetizar la malla. Las partículas magnéticas son atraídas entonces a la malla magnetizada y se atrapan dentro de los poros de la malla. La concentración de las partículas magnéticas dentro de la malla incrementa la cinética de reacción entre las partículas magnéticas y el analito difundiendo hacia dentro y fuera de la malla (el tubo de reacciones es agitado opcionalmente para acelerar la difusión del analito sobre las partículas magnéticas atrapadas). La malla es entonces desmagnetizada (por ejemplo, calentando la malla o exponiendo la malla a un campo magnético o alternativo), permitiendo de esta manera la liberación de las partículas magnéticas complejas al analito. Pueden formarse entonces agregados más grandes de partículas magnéticas, completando la reacción.

En una metodología análoga, las cinéticas de la agregación de partículas magnéticas pueden ser incrementadas llevando mediante centrifugación las partículas magnéticas hacia abajo del fondo del tubo de muestra. El incremento en la concentración local de las partículas magnéticas puede incrementar la cinética de agregación. Para facilitar la separación por centrifugación las partículas son, deseablemente, mayores de aproximadamente 30 nm de diámetro.

5 Unidades de RMN

El sistema para llevar a cabo los métodos de la invención puede incluir una o más unidades de RMN. La figura 1A es un diagrama 100 esquemático de un sistema de RMN para detección de una respuesta de señal de una muestra líquida una secuencia de pulsos de RF apropiada. Un magneto 102 de desviación establece un campo magnético Bb 104 desviado a través de una muestra 106. Las partículas magnéticas están en estado líquido o liofilizado en el cartucho antes de su introducción a un pozo de muestra (el término "pozo" tal como se utiliza aquí incluye cualquier indentación recipiente, contenedor o soporte) 108 hasta la introducción de la muestra 106 líquida en el pozo 108, o las partículas magnéticas pueden ser agregadas a la muestra 106 antes de la introducción de la muestra líquida en el pozo 108. Una bobina 110 de RF y un oscilador 112 de RF provee una excitación de RF a la frecuencia Larmor la cual es una función lineal del campo magnético Bb desviado. En una realización, la bobina 110 de RF es envuelta alrededor del pozo 108 de muestra. La RF de excitación crea una distribución sin equilibrio en la rotación de los protones del agua (o protones libres en un solvente no acuoso). Cuando la excitación de RF es desconectada, los protones "se relajan" a su estado original y emiten una señal RF que puede ser utilizada para extraer información acerca de la presencia y concentración del analito. La bobina 110 actúa como una antena de RF y detecta una señal, la cual basada sobre la secuencia de pulsos de Rf aplicada, sondea diferentes propiedades del material, por ejemplo una relajación T₂. La señal de interés para algunos casos de la tecnología es la relajación rotación-rotación (en general 10-2000 milisegundos) y se denomina la relajación T₂. La señal de RF desde la bobina 110 es amplificada 114 y procesada para determinar la respuesta a T₂ (tiempo de caída) a la excitación en el campo Bb desviado. El pozo 108 puede ser un pequeño capilar u otro tubo con nanolitros hasta microlitros de la muestra, incluyendo el analito y una bobina de tamaño apropiado enrollada alrededor del mismo (véase figura 1B). La bobina es envuelta típicamente alrededor de la muestra y dimensionada de acuerdo con el volumen de muestra. Por ejemplo, para muestra que tiene un volumen de aproximadamente 10 ml, podría usarse una bobina solenoide de aproximadamente 50 mm de longitud y 10 a 20 mm de diámetro; para una muestra que tiene un volumen de aproximadamente 40 µl, podría usarse una bobina solenoide de aproximadamente 6 a 7 mm de longitud y 3.5 a 4 mm de diámetro; y para una muestra que tiene un volumen de aproximadamente 0.1 nl podría usarse una bobina solenoide de aproximadamente 20 µm de longitud y aproximadamente 10 µm de diámetro. Alternativamente, la bobina puede ser configurada como se muestra en cualquiera de las figuras 2A-2E aproximadamente o en la proximidad al pozo. Un sistema de RMN también puede contener múltiples bobinas de RF para la detección de propósitos multiplex. En ciertas realizaciones, la bobina de RF tiene una forma cónica con las dimensiones de 6 mm x 6 mm x 2 mm.

Las figuras 2A-2E ilustran diseños de microbobina de RMN (bobina RF). La figura 2A muestra una microbobina 200 solenoide envuelta de alrededor de 100 µm de longitud, sin embargo se podría prever una bobina que tenga 200 µm, 500 µm o hasta 1000 µm de longitud. La figura 2B muestra una bobina 202 "plana" (la bobina no es realmente plana, puesto que la bobina tiene espesor finito), alrededor de 1000 µm de diámetro. La figura 2C muestra una bobina 204 solenoide MEMS que define un volumen de aproximadamente 0.02 µL. La figura 2D muestra una configuración de bobina 206 de MEMS de Helmholtz esquemática y la figura 2E muestra un esquema de una configuración de bobina 220 en montura.

Una microbobina 200 solenoide envuelta usada para la detección por RMN tradicional se describe en Seeber et al., "Design and testing of high sensitivity micro-receiver coil apparatus for nuclear magnetic resonance and imaging," Ohio State University, Columbus, Ohio. Una microbobina 202 plana usada para detección por RMN tradicional esta descrita en Massin et al., "High Q factor RF planar microcoil for micro-scale NMR spectroscopy," Sensors and Actuators A 97-98, 280-288 (2002). Una configuración 206 de bobina de Helmholtz presenta un pozo 208 para contener una muestra, una capa 210 superior de Si, una capa 212 inferior de Si, y bobinas 214 metálicas depositadas. Un ejemplo de una configuración 206 de bobina de Helmholtz usada para la detección tradicional por RMN está descrita en Syms et al, "MEMS Helmholtz Coils for Magnetic Resonance Spectroscopy," Journal of Micromechanics and Micromachining 15 (2005) S1-S9.

La unidad RMN incluye un magneto (esto es, un magneto superconductor, un electromagneto o un magneto permanente). El diseño del magneto puede ser abierto o parcialmente cerrado, variando desde magnetos en forma de U o C, hasta magnetos con tres o cuatro postes, hasta magnetos completamente encerrados con pequeñas aberturas para colocación de la muestra. La clave es la accesibilidad al "punto dulce" del magneto y la estabilidad mecánica (la estabilidad mecánica puede ser un problema cuando se desea una homogeneidad alta de campo). Por ejemplo, la unidad de RMN puede incluir uno o más magnetos permanentes, conformados cilíndricamente y hechos a partir de SmCo, NdFeB, u otros magnetos permanentes de campo bajo que proveen un campo magnético en el rango de aproximadamente 0.5 hasta aproximadamente 1.5 T (por ejemplo, magnetos permanentes adecuados de SmCo y NdFeB están disponibles en Neomax, Osaka, Japón). Para propósitos de ilustración, tales magnetos permanentes pueden ser un ensamblaje de magneto permanente (PM) dipolo/caja, o un diseño *hallbach* (véase

5 Demas et al., Concepts Magn Reson Part A 34A:48 (2009)). Las unidades de RMN pueden incluir un magneto permanente de aproximadamente 0.5 T de fuerza con una homogeneidad de campo de aproximadamente 20-30 ppm y un punto dulce de 40 μL centrado. Esta homogeneidad de campo permite usar un magneto menos costoso (menos tiempo para la sintonización fina del ensamblaje/acuñamiento) en un sistema menos proclive a fluctuaciones (por ejemplo desplazamiento de temperatura, estabilidad mecánica con el tiempo, prácticamente cualquier impacto es demasiado pequeño para ser visto), movimiento tolerante de objetos ferromagnéticos o conductores en el campo de alejamiento (tienen menos de un impacto, por lo tanto se requieren menos escudos), sin comprometer las mediciones del ensayo (las mediciones de relajación y las mediciones de correlación no requieren un campo altamente homogéneo).

10 La configuración de la bobina puede ser escogida o adaptada para la implementación específica de la tecnología de micro RMN-MRS, puesto que diferentes configuraciones de bobina ofrecen diferentes características de rendimiento. Por ejemplo, cada una de estas geometrías de bobina tiene un rendimiento y alineamiento de campos diferentes. La bobina 202 plana tiene un campo RF perpendicular al plano de la bobina. La bobina 200 solenoide tiene un campo de RF por debajo del eje de la bobina, y la bobina 206 de Helmholtz tiene un campo de RF transversal a las dos bobinas 214 rectangulares. Las bobinas 206 de Helmholtz y 220 de montura pueden ser las más efectivas para el diseño del chip, mientras que la bobina 200 solenoide puede ser la más efectiva cuando la muestra y las partículas magnéticas MRS son mantenidas en un microtubo.

20 Los dispositivos de micro RMN pueden ser fabricados enrollando o imprimiendo las bobinas o por técnicas de fabricación de semiconductores por sistemas micro electromecánicos (MEMS). Por ejemplo, un módulo de bobina enrollada o impresa/pozo para muestra pueden tener aproximadamente 100 μm de diámetro, o ser tan grandes como un centímetro o más. Una unidad o chip MEMS (llamado así porque es fabricado en un proceso de semiconductor como un molde sobre un gofre) puede tener una bobina que va desde aproximadamente 10 μm hasta aproximadamente 1000 μm en dimensión característica, por ejemplo. La configuración de bobina enrollada o impresa/pozo para muestra es denominada aquí como un módulo y la versión MEMS es denominada aquí como un chip. Por ejemplo, la muestra 108 líquida puede ser mantenida en un tubo (por ejemplo, un capilar, pipeta o microtubo) con la bobina enrollada alrededor del mismo, o puede ser mantenida en pozos sobre el chip con la bobina de RF circundando el pozo. Alternativamente, la muestra es posicionada para fluir a través de un tubo, capilar o cavidad de la proximidad de la bobina de RF.

30 Los componentes básicos de una unidad de RMN incluyen componentes eléctricos, tales como un circuito de RF sintonizado dentro de un campo magnético, incluyendo un sensor de RM, electrónica recepción y transmisión que podría incluir preamplificadores, amplificadores y circuitos de protección, componentes de adquisición de datos, programadores de pulsos y generadores de pulsos.

35 Los sistemas que contienen unidades de RMN con bobinas de RF y micropozos que contienen sensores de partículas magnéticas descritas aquí pueden ser diseñados para la detección y/o medición de la concentración de analitos específicos de interés mediante el desarrollo de un modelo para los fenómenos de agregación de partículas y por el desarrollo de un modelo de cadena de señal RF-RMN. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo experimentos para los sistemas de analito/partícula magnética de interés caracterizando la física de la agregación de partículas, incluyendo, por ejemplo, los efectos de afinidades, dimensiones relevantes y concentraciones. También, pueden llevarse a cabo experimentos para caracterizar las señales de RMN (T_2 , T_1 , T_2^* , $T_2\rho$, $T_1\rho$ y/o otras características de señales, tales como señales híbridas T_1/T_2 y pueden también incluir pero no se limitan a difusión, susceptibilidad, frecuencia) como funciones de posible agregación o eliminación y características de partículas magnéticas. Tales características específicas para el fenómeno de RMS (conmutación de resonancia magnética) en un sistema dado pueden ser utilizadas para potenciar la sensibilidad de la detección y/o de otra manera mejorar el rendimiento.

45 El sistema de RMN puede incluir un chip con bobinas de RF y electrónica micromaquinadas sobre el mismo. Por ejemplo, el chip puede ser micromaquinado en superficie, de tal manera que las estructuras son construidas sobre la parte superior de un sustrato. Cuando las estructuras se construyen sobre la parte superior de un sustrato y no dentro de él, las propiedades del sustrato no son tan importantes como el micromaquinado en volumen, y los gofres de silicios costosos utilizados en el micromaquinado en volumen pueden ser reemplazados por materiales menos costosos tales como vidrio o plástico. Realizaciones alternativas, sin embargo, pueden incluir chips que son micromaquinados en volumen. El micromaquinado en superficie generalmente comienza con un gofre u otro sustrato y crecen en capas en la parte superior. Estas capas son grabadas selectivamente por fotolitografía y un grabado en húmedo que involucra un ácido o un grabado en seco que involucra un gas ionizado, o plasma. El grabado en seco puede combinar grabado químico con grabado físico, o bombardeo con iones del material. El micromaquinado en superficie puede involucrar tantas capas como sean necesarias.

En algunos casos la bobina de RF no costosa puede ser integrada en un cartucho desechable y puede ser un componente desechable. La bobina podría ser colocada de manera tal que permita un contacto eléctrico con los circuitos sobre la configuración del RMN fijado o el acoplamiento podría hacerse inductivamente a un circuito.

5 Cuando la medición de relajación T2, la exactitud y repetibilidad (precisión) serán una función de la estabilidad de la temperatura de la muestra según sea relevante para la calibración, estabilidad del ensayo, la relación señal a ruido (S/N), la secuencia de pulsos para reenfoque (por ejemplo, CPMG, BIRD, Tango y similares), así como factores de procesamiento de señal, tales como acondicionamiento de señales (por ejemplo, amplificación, rectificación y/o digitalización de las señales de eco), transformación del dominio tiempo/frecuencia, y algoritmos de procesamiento de señal utilizados. La relación señal a ruido es una función del campo magnético polarizado (B₀), volumen de muestra, factor de llenado, geometría de la bobina, factor Q de la bobina, ancho de banda de la electrónica, ruido del amplificador y temperatura.

10 Con el fin de entender la precisión requerida para la medición T2, se debe observar una curva de respuesta del ensayo que este a la mano y correlacionar la precisión deseada para determinar la concentración de analito y la precisión del por ejemplo T2 medible para algunos casos. Luego puede formarse una predicción de error apropiada.

15 Por ejemplo, pretender una mejora de 10 veces en el límite de detección de 0.02 ng/mL para troponina (incremento de 10 veces en la sensibilidad) sería necesario discernir un delta-T2 menor de aproximadamente 5.6 milisegundo frente a un T2 tradicional (medido sin MRS) de aproximadamente 100 milisegundos. La relación señal a ruido mínimo (S/N) necesitaría ser de alrededor 20 para detectar esta diferencia.

Las unidades de RMN para uso en los métodos de la invención pueden ser las descritas en la Patente de los Estados Unidos No. 7,564,245.

Las unidades de RMN pueden incluir una cabeza de sonda pequeña para uso en un relaxómetro de resonancia magnética portátil como se describe en la Publicación PCT No. WO09/06148.

20 Los sistemas pueden ser implantables o parcialmente implantables en un sujeto. Por ejemplo, las unidades de RMN de la invención pueden incluir bobinas de radiofrecuencia implantables y opcionalmente magnetos implantables como se describe en las Publicaciones PCT Nos. WO09/085214 y WO08/057578.

25 Los sistemas pueden incluir un contenedor de muestras polimérico para reducir, parcial o completamente, la contribución de la señal de RMN asociada con el contenedor de muestra al parámetro de resonancia magnética nuclear de la muestra líquida como se describe en la Publicación PCT No. WO09/045354.

30 Los sistemas pueden incluir un portador de muestras desechable para uso con el lector MR que está configurado para permitir un número predeterminado de mediciones (esto es, está diseñado para un número limitado de usos). El portador de muestras desechables puede incluir ninguno, parte, o todos los elementos de la bobina de detección de RF (esto es, tal que el lector de MR carezca de una bobina de detección). Por ejemplo, el portador de muestras desechable puede incluir una bobina "leída" para la detección RF que esta acoplada inductivamente una bobina "de levantamiento" presente en el lector MR. Cuando el contenedor de muestra está dentro del lector MR está en proximidad cercana con la bobina de levantamiento y puede ser utilizado para medir la señal de RMN. Alternativamente, el portador de muestra desechable incluye una bobina de RF para la detección de RF que está conectada eléctricamente al lector MR por inserción del contenedor de muestra. Así, cuando el contenedor de muestra está insertado en el lector MR se establece la conexión eléctrica apropiada para permitir la detección. El número de usos disponibles para cada portador de muestras desechable puede ser controlado deshabilitando un fusible de enlace incluido bien sea en el circuito eléctrico dentro del portador de muestras desechable, o entre el portador de muestras desechable y el lector MR. Después de que el portador de muestras desechable se utiliza para detectar una relajación por MRN en una muestra, el instrumento puede configurarse para aplicar corriente en exceso al fusible de conexión, haciendo que el fusible se rompa y haga la bobina inoperable. Opcionalmente, pueden utilizarse múltiples fusibles de conexión, trabajando en paralelo, cada uno conectando a un levantamiento en el sistema, y cada uno rompiéndose individualmente en cada uso hasta que todos estén rotos y el portador de muestras desechables se haga inoperable.

Unidades de cartucho

45 Los sistemas para llevar a cabo los métodos de la invención pueden incluir una o más unidades de cartucho para proveer un método conveniente para colocar todos los reactivos de ensayo y consumibles en el sistema. Por ejemplo, el sistema puede ser personalizado para llevar a cabo una función específica, o adaptado para llevar a cabo más de una función, por ejemplo, a través de unidades de cartucho cambiables que contienen arreglos de micropozos con partículas magnéticas personalizadas contenidas en los mismos. El sistema puede incluir un cartucho reemplazable y/o intercambiable que contiene un arreglo de pozos precargados con partículas magnéticas y diseñados para la detección y/o medición de concentración de un analito particular. Alternativamente, el sistema puede ser utilizable con diferentes cartuchos, diseñado cada uno para la detección y/o mediciones de concentración de diferentes analitos, o configurado con módulos de cartucho separados para reactivos y detección para un ensayo dado. El cartucho puede ser dimensionado para facilitar la inserción en y la eyección desde un alojamiento para la preparación de una muestra líquida la cual es transferida a otras unidades en el sistema (esto es, una unidad de

aglomeración asistida magnética, o una unidad RMN). La unidad de cartucho misma podría hacer interfaz potencialmente de manera directa con las estaciones de manipulación así como con los lectores MR. La unidad de cartucho puede ser un cartucho modular que tiene un módulo de entrada que puede ser esterilizado independiente del módulo de reactivos.

5 Para manipular las muestras biológicas, tales como muestras de sangre, hay numerosos requerimientos competentes para el diseño del cartucho, incluyendo la necesidad de esterilizar el módulo de entrada para evitar contaminación cruzada y resultados de prueba de falsos positivos, y la necesidad de incluir reactivos en el paquete que no puede ser esterilizados fácilmente utilizando técnicas de esterilización terminales estándar como la irradiación. Un módulo de entrada para separar alícuotas de muestras puede diseñarse para hacer interfaz con
10 tubos vacutainer sin tapa, y para tomar en dos alícuotas un volumen de muestra que puede ser utilizado para llevar a cabo, por ejemplo, un ensayo de Candida (véase figura 7D-7F). El vacutainer permite un llenado parcial o completo. El módulo de entrada tiene dos partes plásticas duras, que se sueldan por ultrasonido entre sí y lámina sellada para formar una red de canales para permitir un camino de flujo para formar en el primer pozo sobreflujo hacia el segundo pozo de muestra. Se utiliza una parte de sellamiento de vacutainer suave para un sello con el
15 vacutainer, e incluye un cuerpo de flujo de muestra, y un puerto de ventilación. Para superar la resistencia del flujo una vez que el vacutainer está cargado e invertido, se necesita alguna presión hidrostática. Cada vez que una muestra es retirada del pozo de muestra, el pozo será rellenado por flujo desde el vacutainer.

Un cartucho modular puede proveer un medio simple para controlar la contaminación cruzada durante ciertos ensayos, incluyendo pero no limitándose a la distribución de productos PCR en alícuotas de detección múltiples.
20 Además, un cartucho modular puede ser compatible con dispensación de fluido automatizada y provee una manera de contener reactivos en muy pequeños volúmenes para largos períodos de tiempo (más allá de un año). Finalmente, la predispensación de estos reactivos permite fijar la concentración y exactitud volumétrica mediante el proceso de manufactura y provee en un punto de cuidado el uso del instrumento que es más conveniente puesto que puede requerir el uso de pipeta mucho menos preciso.

25 El cartucho modular divulgado aquí es un cartucho que separado en módulos que puede ser empacados y si es necesario esterilizados separadamente. También pueden ser manejados y almacenados separadamente, así por ejemplo el módulo de reactivo requiere refrigeración pero el módulo de detección no. La figura 6 muestra un cartucho representativo con un módulo de entrada, un módulo reactivo y un módulo de detección que se cierran entre sí. En esta realización, el módulo de entrada sería empacado separadamente en un paquete estéril y los
30 módulos de reactivo y detección serían preensamblados y empacados juntos.

Durante el almacenamiento, el módulo de reactivo podría ser almacenado en refrigerador mientras que el módulo de entrada podría ser almacenado en almacenamiento seco. Esto provee la ventaja adicional de que solamente una cantidad muy pequeña de espacio en refrigerador o congelador se requiere para almacenar muchos ensayos. En el momento del uso, el operador retirará un módulo de detección y abrirá el paquete, utilizando potencialmente
35 técnicas estériles para prevenir la contaminación con flora de la piel si se requiere para el ensayo. El tubo vacutainer es destapado entonces y el módulo de entrada invertido es colocado sobre el tubo como se muestra en la figura 7A. Este modulo ha sido diseñado para ser fácilmente moldeable utilizando herramientas sencillas como se muestra en las figuras 7B y 7C y el tope y el fondo del cartucho son sellados con lámina para prevenir la contaminación y también para cerrar los canales. Una vez que el tubo ha sido resellado utilizando el módulo de entrada, el
40 ensamblaje es girado hacia arriba y cerrado sobre el resto del cartucho. La sección de entrada incluye un pozo con un sobreflujo que permite usar tubos de muestra con entre 2 y 6 ml de sangre y todavía provee una interfaz profunda constante a la automatización del sistema. Se logra esto mediante el sobreflujo mostrado en la figura 8, donde la sangre que fluye por encima del pozo de muestra simplemente cae en el cuerpo del cartucho, evitando la contaminación.

45 Las figuras 9A-9C muestran el medio de almacenar con precisión reactivos de volúmenes pipeteados pequeños. Los reactivos se mantienen en puntas de pipeta que se muestran en la figura 9C. Estas se llenan por automatización de manufactura y luego son colocadas en el cartucho para sellar sus puntas en los pozos de ajuste apretado que se muestran en una vista en corte en la figura 9B. Finalmente, se colocan sellos de lámina sobre la parte posterior de las puntas para proveer un sello completo a prueba de vapor de agua. También es posible sellar el módulo completo con un sello que será retirado por el operador, bien en lugar de o además de las láminas antes mencionadas. Este
50 módulo también provee almacenamiento para recipientes de reacción y puntas de pipetas vacíos para uso con el instrumento mientras que el módulo de detección provee almacenamiento para viales de PCR tapados de 200 µl utilizados por el instrumento para hacer mediciones finales a partir de los mismos.

Las figuras 10-13C muestran una realización alternativa del módulo de detección del cartucho el cual está diseñado para proveer control de contaminación, por ejemplo, durante el pipeteo de productos post-PCR (reacción en cadena de polimerasa). Esto se requiere porque la amplificación de billones de veces por PCR representa un gran riesgo de contaminación cruzada y falsos positivos. Sin embargo, es deseable ser capaz de tomar alícuotas de esta mezcla con seguridad, puesto que los analitos de frecuencia baja habrán sido amplificados y habrán sido distribuidos para
55 detección o identificación separadas. Hay tres maneras en las cuales esta porción de cartucho ayuda en el control

de contaminación durante la operación de toma de alícuotas.

Primero, el cartucho contiene un pozo en concavidad para llevar a cabo las operaciones de transferencia como se muestra en las figuras 10A y 10B. En segundo lugar, la máquina provee flujo de aire a través de este pozo y hacia abajo dentro del cartucho a través de orificios en el fondo del pozo, como se muestra en la figura 11. La profundidad del pozo es tal que una punta de pipeta permanecerá en el flujo de aire y evitará que escape cualquiera aerosol. La figura 12 representa una vista inferior del módulo de detección, mostrando el fondo de los tubos de detección y los dos orificios utilizados para asegurar el aire de flujo. Puede insertarse un filtro opcional aquí para capturar cualquier aerosol líquido y evitar que entre a la máquina. Este filtro también podría ser una lámina de un material hidrófobo tal como Gore-tex que permitirá que el aire pero no los líquidos escapen. Finalmente, hay una tapa de sello especial sobre cada tubo de 200 μ l para proveer un sello rompible para cada punta de pipeta a medida que entra al recipiente, como se muestra en las figuras 13A-13. Se contempla la punta de pipeta utilizada para tomar alícuotas es almacenada en este pozo del todo, haciendo así posible que la punta nunca deje la región de flujo de aire controlado.

Alternativamente, el cartucho modular está diseñado para un ensayo multiplex. El reto en los ensayos multiplex es combinar ensayos múltiples que tengan requerimientos de ensayo incompatibles (esto es, diferentes tiempos y/o temperaturas de incubación) en un cartucho. El formato de cartucho representado en las figuras 14A-14C permite la combinación de diferentes ensayos con requerimientos de ensayo dramáticamente diferentes. El cartucho presenta dos componentes principales: (i) un módulo de reactivo (esto es, la porción de tira de reactivo) que contiene todos los reactivos individuales para el panel de ensayo completo, y (ii) el módulo de detección. El módulo de detección contiene solamente las partes del cartucho que transportan a través de la incubación, y puede portar ensayos sencillos o varios ensayos, según se requiera. El módulo de detección representado en la figura 14B incluye dos cámaras de detección para un ensayo sencillo, la primera cámara de detección como control y la segunda cámara de detección para la muestra. El formato de cartucho es expandible puesto que pueden agregarse ensayos adicionales incluyendo reactivos y un módulo de detección adicional.

La operación del módulo comienza con la inserción por parte del usuario del cartucho entero o una porción del mismo en el instrumento. El instrumento lleva a cabo el accionamiento del ensayo, tomando alícuotas de los ensayos en las cámaras de detección separadas. Estas cámaras de detección individuales son desconectadas entonces de la banda de reactivos y una de otra, y avanzan a través del sistema separadamente. Puesto que el módulo de reactivos es separado y descartado, la unidad de muestra más pequeña posible viaja a través del instrumento, conservando el espacio del instrumento interno. Viviendo cada ensayo en su propia unidad, son posibles diferentes tiempos y temperaturas de incubación a medida que cada ensayo multiplex está retirado físicamente de los otros y cada muestra es manipulada individualmente.

Estas unidades de cartucho descritas aquí pueden incluir una o más poblaciones de partículas magnéticas, bien sea como una suspensión líquida o partículas magnéticas secas que son reconstituidas antes del uso. Por ejemplo, las unidades de cartucho pueden incluir un compartimiento que incluye desde 1×10^6 a 1×10^{13} partículas magnéticas (por ejemplo, desde 1×10^6 a 1×10^8 , 1×10^7 a 1×10^9 , 1×10^8 a 1×10^{10} , 1×10^9 a 1×10^{11} , 1×10^{10} a 1×10^{12} , 1×10^{11} a 1×10^{13} , o desde 1×10^7 a 5×10^8 partículas magnéticas) para probar una muestra líquida sencilla.

Unidades MAA

Los sistemas para llevar a cabo los métodos de la invención pueden incluir una o más unidades de aglomeración asistida magnéticas (MAA) para acelerar la aglomeración de las partículas magnéticas, permitiendo que las reacciones del ensayo alcancen su terminación (esto es, una lectura estable) más rápidamente. Los métodos de la invención utilizan partículas magnéticas funcionalizadas para interactuar con analitos o agentes de enlazamiento multivalentes (con múltiples sitios de enlace). La aglomeración de las partículas magnéticas altera la tasa de relajación rotación-rotación de la muestra cuando se exponen a un campo magnético con un cambio subsecuente en el tiempo de relajación T_2 .

Por ejemplo, puede utilizarse un gradiente de campo para barrer partículas magnéticas (MPs) a través de la muestra líquida, permitiendo que las partículas magnéticas se unan a un anticuerpo específico (partículas magnéticas recubiertas con analito) o a un analito (partículas magnéticas recubiertas con anticuerpos), y luego concentrar las partículas magnéticas en una porción de la cámara de reacción de tal manera que se faciliten las interacciones partícula-partícula que llevan a aglomeración inducida específica, ligando/analito. Las partículas magnéticas pueden dejarse difundir opcionalmente en la ausencia de un campo magnético, por sonicación, vórtex, agitación o por sometimiento a mezcla por ultrasonido para separar las interacciones de partículas magnéticas no específicas y redistribuir las partículas magnéticas de regreso hacia la muestra líquida. El proceso puede ser repetido para promover aglomeración específica adicional. Esta ciclización de partículas magnéticas entre estar dispersadas en la muestra líquida y luego concentradas en el lado o fondo del recipiente de reacción puede repetirse tantas veces como sea necesario para maximizar la aglomeración específica, y consecuentemente maximizar la señal de ensayo. El estado de aglomeración de las partículas magnéticas puede determinarse utilizando una medición de relajación por RMN.

El método MAA de la invención puede emplear un campo magnético gradiente con el fin de promover interacciones magnéticas partícula-partícula rápidas. En un ejemplo, se agregan partículas magnéticas recubiertas de analito una solución con un ligando específico multimérico-analito y se colocan en un campo magnético gradiente. El campo magnético hace que las partículas se concentren en el lado o parte inferior de un recipiente en reacción (fuerza de campo magnético más alta) dando como resultado una interacción partícula-partícula potenciada y la subsecuente agregación. La agregación se mide observando un cambio, por ejemplo, en la señal T_2 . Pueden observarse mejoras de 10 a 1000 por ciento en el cambio de señal (por ejemplo desde 10 a 30%, desde 20% a 50%, desde 40% a 80%, desde 50% a 200%, desde 100% a 500%, o desde 500% a 1000% en el cambio de señales).

La MAA homogénea tradicional tiene la ventaja de las fuerzas dipolo-dipolo para ayudar en las interacciones partícula-partícula mientras que las dipolo de partículas están alineadas con el campo magnético de la unidad hMAA a través de la muestra líquida. En contraste, el MAA en gradiente concentra rápidamente las partículas magnéticas a un locus, facilitando por lo tanto grandemente las interacciones partícula-partícula.

La metodología MAA de ciclización descrita aquí puede acelerar la cinética de la aglomeración partícula magnética-analito (i) reduciendo la entropía espacial de la etapa de interacción de enlazamiento manteniendo la concentración local de las partículas magnéticas, (ii) introduciendo mezcla localizada por transporte mediado por magneto de la pella de posición a posición, (iii) reduciendo la ruptura de los aglomerados enlazados específicos reduciendo la necesidad de métodos de dispersión más energéticos tales como vórtex y/o (iv) cambiando la dirección del campo magnético, produciendo por lo tanto una dispersión y reagregación local de partículas magnéticamente aglomeradas a medida que realinean sus dipolos con la nueva dirección de campo magnético, y permitiendo que las partículas magnéticas dispersadas localmente formen interacciones de enlazamiento específicas que involucren el analito diana.

En un ejemplo, los ensambles de magneto que producen un gradiente de campo magnético se colocan en dos posiciones con respecto al tubo de ensayo, una en el lado del tubo y otra en el fondo del tubo (configuración lado-fondo). Alternativamente, la posición del segundo magneto puede ser localizada en un lado diferente del tubo (configuración lado-lado). El tubo es movido entonces para asegurar exposición a un magneto seguida por exposición al otro magneto (véase figura 15). Se ha observado que esto también produce una potenciación similar en la aglomeración.

Una metodología alternativa es hacer rotar la muestra líquida en un campo magnético gradiente (o hacer rotar el gradiente de campo magnético alrededor de la muestra) para efectuar simultáneamente una reorientación de partículas dentro de la pella (con respecto al resto de la muestra líquida) y para barrer la pella a través de la muestra líquida. La rata de rotación puede ser lenta para impedir que la pella de partículas magnéticas permanezca largamente sostenida en proximidad del magneto de gradiente (en vez de moverse en concierto con el solvente y los analitos en la muestra líquida). Por ejemplo, la rotación es típicamente más lenta que 0.0333 Hz (e.g., desde 0.000833 Hz a 0.0333 Hz, desde 0.00166 Hz a 0.0333 Hz, o desde 0.00333 Hz a 0.0333 Hz), de tal manera que las partículas se retienen adyacentes a la fuente de campo magnético, mientras que el contenido restante en el tubo rota.

Puede utilizarse un magneto de gradiente sencillo, en donde la muestra puede ser movida alrededor del magneto (o utilizar la misma localización cercana al magneto y alternar con una posición retirada del campo del magneto sencillo. El magneto podría ser movido a la proximidad o alejado de la muestra.

La muestra puede ser colocada dentro de magnetos de la misma orientación de campo para un efecto de "promediación de campo" en forma alternante, con el fin de simplificar la fabricación del sistema de gMAA (esto es, eliminar la necesidad de magnetos seleccionados cuidadosamente que generen los mismos perfiles de campo). Por ejemplo una pluralidad de tales magnetos podría ser colocada en una configuración circular, y las muestras hacerse rotar a través de una configuración de carrusel, desde el primer magneto hasta una nula (exposición de campo magnética pequeña) al segundo magneto etc. El dispositivo gMAA rotatorio puede incluir una placa de base fija a la cual se une un motor eléctrico, con un cierto número de magnetos montados alrededor del mismo en un patrón circular. Los magnetos están espaciados de tal manera que hay una interferencia magnética mínima entre las posiciones. Un carrusel capaz de mantener los viales de muestra es unido al árbol del motor de tal manera que rota con el motor, exponiendo las muestras a diferentes orientaciones de campo magnético de una posición a la siguiente. Cualquier combinación de magnetos orientados al lado, magnetos orientados al fondo y posiciones con muy poco campo residual (nulo) pueden ser usadas. Véase la figura 56 A.

En otro ejemplo, se utiliza un campo homogéneo para acelerar la aglomeración de partículas magnéticas en un ensayo de la invención. Hemos observado que el hMAA no es efectivo debido a la exposición a los gradientes de campo en términos de partículas que se concentran y el barrido de láminas a través de la muestra, para escalas de tiempo relevantes para las aplicaciones. Sin embargo el hMAA tiene ventajas sobre el método de aglomeración asistida por gradiente de campo. Utilizando hMAA las partículas magnéticas no son forzadas a moverse a través de una localización específica en el tubo (véase figura 16), minimizando el atrapamiento no específico de partículas dentro de fragmentos de aglomeración específico. La agitación después de hMAA parece minimizar el enlazamiento

no específico. El tratamiento con hMAA parece potenciar la aglomeración inducida por analito incrementando la frecuencia de colisión (es un posible resultado de disminuir las entropías de posición de partícula y rotacional debido a la localización en un estado ordenado). Las partículas magnéticas pueden ser sometidas subsecuentemente a sonicación, vórtex, agitación (esto es, adiciones de energía) para interrumpir cualquier interacción de partículas no específicas y redistribuir las partículas de regreso a la muestra. Una mezcla o agitación suave adicional durante este proceso incrementaría potencialmente de manera adicional los eventos de enlazamiento específicos del analito potenciando la señal de ensayo general. El estado de aglomeración/aglomerado de las partículas magnéticas puede ser determinado monitorizando cambios en una rata de relajación por RMN. También es posible hacer rotar la muestra líquida dentro de un campo magnético homogéneo (o hacer rotar un campo magnético homogéneo alrededor de la muestra) para acelerar la agregación de partículas magnéticas en una muestra líquida.

Hemos observado que tiempos más largos de MAA llevan a cambios incrementados en T₂, presumiblemente a partir de una fracción incrementada de partículas aglomeradas. Hemos encontrado que la separación magnética y resuspensión ciclizada llevan a cambios incrementados en T₂ e incrementos en la aglomeración. Todas estas observaciones apuntan hacia un sistema que debe ser llevado a un estado de equilibrio o terminación (por ejemplo, aglomerado al máximo).

Los sistemas divulgados aquí pueden incluir una o más unidades MAA. Por ejemplo, la unidad MAA puede ser uno o más magnetos configurados para aplicar un campo magnético gradiente en una primera dirección con respecto a la muestra líquida, y, después de repositionar la cámara de muestras, aplicar un campo magnético gradiente en una segunda dirección con respecto a la muestra líquida (véase figura 17). Alternativamente, la unidad MAA puede ser un arreglo de magnetos configurado para aplicar un campo magnético gradiente, por ejemplo, al lado de una muestra líquida, y, después de repositionar la cámara de muestra, a, por ejemplo el fondo de la muestra líquida (véanse figuras 18A-18C). Los sistemas divulgados aquí pueden incluir una unidad MAA configurada para aplicar un campo magnético homogéneo una o más muestras líquidas (véanse figuras 19A y 19B).

Unidades de agitación

Los sistemas para llevar a cabo los métodos de la invención pueden incluir una o más unidades de agitación para interrumpir interacciones de partículas magnéticas no específicas y redistribuir las partículas magnéticas de regreso a la muestra líquida, o para simplemente agitar el tubo de muestras para mezclar completamente los reactivos del ensayo. Por ejemplo, las unidades de agitación pueden incluir una estación de sonicación, vórtex, agitación o ultrasonido para mezclar una o más mezclas líquidas. La mezcla puede lograrse por dispensación por aspiración u otro movimiento de fluido (por ejemplo, flujo dentro de un canal). También, la mezcla puede ser provista mediante una pipeta vibradora o una pipeta que se mueve a lado y lado dentro del tubo de muestra.

0320 La unión de agitación puede ser un vórtex o un vórtex compacto cada uno de los cuales puede ser diseñado para proveer un movimiento estable a la mezcla de muestra deseada.

El vórtex incluye los siguientes componentes: (i) un soporte de muestra, (ii) una placa principal, (iii) cuatro conexiones, (iv) un riel lineal y un sistema de transporte (x2), (v) un soporte para eje y rieles, (vi) acoplamiento y eje, (vii) una placa de montaje, y (viii) un motor de impulso (véase figura 20).

El vórtex compacto incluye los siguientes componentes: (i) un soporte de muestra, (ii) una placa principal, (iii) dos conexiones, (iv) riel lineal y sistema de transporte (x1), (v) un soporte para riel lineal, (vi) soporte para eje, (vii) acoplamiento y eje, (viii) una placa de montaje y (ix) un motor de impulso (véase figura 21).

El principio básico de movimiento para un vórtex es como sigue: el eje que incluye un eje coaxial al árbol del motor y uno segundo que está desplazado y paralelo al eje del motor. Cuando el árbol del motor está unido al eje (típicamente a través de un acoplamiento helicoidal) y se hacen rotar, el eje desplazado del eje es impulsado en un camino orbital. El desplazamiento típico es 1/4 de pulgada para producir un vórtex en un tubo de muestra sencillo de 0.2 mL pero esto puede modificarse fácilmente para mezclar efectivamente diferentes volúmenes de muestra en otras geometrías de tubo.

Alternativamente, el vórtex puede ser de tipo que utiliza un impulso por cinta planetaria (véanse figuras 23A-23C). La figura 23A es una vista global que muestra el vórtex configurado para un tubo grande. La figura 23B es una vista en sección que muestra dos soportes para tubo para tubos pequeños. La figura 23C es una vista global de un vórtex que muestra tubos y una vista cercana de un mecanismo de impulso por cinta planetaria.

El motor de impulso es típicamente un motor servo o por etapas con un codificador. Estos motores tienen una marca "índice" que permite que el motor encuentre un punto específico en su rotación. Estas marcas de índice se utilizan para hacer regresar el sistema a su punto de partida, y asegurar que las muestras pueden ser regresadas una posición conocida después de la mezcla. Conociendo la posición exacta de la muestra en la estación vórtex se permite que estos vórtex tengan acceso fácil por parte de accionadores robóticos y así ser integrados en un sistema

automatizado. En lugar de marcas de índice, podrían emplearse dispositivos externos de detección (véase figura 22A). Estos podrían ser sensores mecánicos, magnéticos, ópticos o de otra clase que sean capaces de resolver la posición de la muestra en cualquier punto a lo largo de la ruta del sistema o en una posición "inicial" fija. Con el fin de tener acceso a vórtex o centrifugas a través de un soporte/posicionado de muestra robótico, el sistema puede incluir una marca de índice o un conmutador externo para "hacer regresar a su punto inicial" el sistema una posición fijada después del recorrido, utilizando un sensor que hace seguimiento al movimiento de la muestra en todo momento, de tal manera que cuando el sistema se detiene el robot sabe la posición, y utilizando un método de "búsqueda" que incluye encontrar una muestra después del recorrido emplearía un sistema de división que sigue la muestra. El mecanismo de guía esta representado en la figura 22B. La placa principal esta conectada al eje desplazado del árbol y esta libre para rotar. La placa sigue la ruta orbital alrededor tal como es dictada por el árbol del motor. Un extremo de una conexión está conectada a la placa principal, y esta libre para rotar. Por lo tanto de esta manera, la conexión conectada es conectada entonces a la rotación orbital del árbol. El otro extremo de la conexión está conectado a un carro del sistema de riel lineal y es libre de rotar. Así este extremo de la conexión sigue la ruta lineal del riel. Teniendo dos conexiones conectadas tanto al carro y a la placa principal se evita de esta manera que la placa principal rote alrededor de su propio centro. En el vórtex, se utilizan dos conexiones en dos lados de la placa principal (4 en total) para balancear y estabilizar el sistema completo.

Dos vórtex difieren porque sus requerimientos de uso y diseño. La versión compacta está diseñada para ocupar menos espacio y requiere menos durabilidad que esta versión porque se trabaja una velocidad menor, limitada por su motor más pequeño. Por estas razones se utilizan solamente dos conexiones para conectar a un sistema de riel lineal sencillo en el vórtex compacto. Esta versión necesita ser capaz de velocidades más altas, y de una utilización casi continua debido a la capacidad grande de rendimiento de este sistema. Por estas razones se agrega un segundo carro y conjunto de conexiones para balancear el sistema e incrementar su durabilidad.

Sistemas

Los sistemas para llevar a cabo los métodos de la invención pueden incluir una o más unidades RMN, unidades MAA, unidades de cartucho y unidades de agitación. Tales sistemas pueden incluir adicionalmente otros componentes para llevar a cabo un ensayo automatizado de la invención, tal como una unidad PCR para la detección de oligonucleótidos; una centrifuga, un brazo robótico para suministrar una muestra líquida de unidad a unidad dentro del sistema; una o más unidades de incubación; una unidad de transferencia de fluidos (esto es, dispositivos de pipetas) para combinar reactivos de ensayo de una muestra biológica para formar la muestra líquida; un ordenador con un procesador programable para almacenar datos, procesamiento de datos, y para controlar la activación y desactivación de las diversas unidades de acuerdo con uno o más protocolos prefijados; y un sistema de inserción de cartucho para suministrar cartucho prellenados al sistema, opcionalmente con instrucciones al ordenador para identificar los reactivos y el protocolo que se va a utilizar en conjunción con el cartucho. Véase figura 42.

Los sistemas divulgados aquí pueden proveer un medio efectivo para un alto rendimiento y detección en tiempo real de analitos presentes en un ruido corporal de un sujeto. Los métodos de detección pueden ser utilizados en una amplia variedad de circunstancias incluyendo identificación y/o cuantificación de analitos que están asociados con procesos biológicos, condiciones fisiológicas, trastornos o estados de trastornos específicos. Como tales, los sistemas tienen un amplio espectro de utilidad, por ejemplo, en criba de fármacos, diagnósticos de enfermedades, clasificación filogenética, identificación de paternidad y forense, aparición y recurrencia de enfermedades, respuestas individuales a tratamientos versus bases de población, y monitorización de terapias. Los dispositivos y sistemas en materia son también particularmente útiles para avanzar estados preclínicos y clínicos de desarrollo de agentes terapéuticos, mejorar el cumplimiento de los pacientes, monitorizar los ADR asociados con un fármaco prescrito, desarrollar medicina individualizada, externalizar pruebas de sangre del laboratorio central al hogar o sobre una base de prescripción o monitorizar agentes terapéuticos después de una aprobación regulatoria. Los dispositivos y sistemas pueden proveer un sistema flexible para medicina personalizada. El sistema puede ser cambiado o intercambiado junto con un protocolo o instrucciones a un procesador programable del sistema para llevar a cabo una amplia variedad de ensayos tal como se describen aquí. Los sistemas de la invención ofrecen muchas ventajas de una instalación de laboratorio contenida en un instrumento automatizado de mesa o de tamaño más pequeño.

Los sistemas pueden ser utilizados para probar simultáneamente analitos que están presentes en la misma muestra líquida a lo largo de un amplio rango de concentración, y pueden ser utilizados para monitorizar la rata de cambio de concentración de un analito y/o concentración de marcadores PD o PK a lo largo de un periodo de tiempo en un sujeto individual, utilizados para llevar a cabo análisis de tendencia sobre la concentración, o marcadores de PD, o PK, sean concentraciones de fármacos a sus metabolitos. Por ejemplo, si la glucosa fuera el analito de interés, la concentración de glucosa en una muestra en un momento dado así como la rata de cambio de la concentración de glucosa durante un periodo dado de tiempo podría ser altamente útil en la previsión y prevención, por ejemplo, de eventos hipoglucémicos. Así, los datos generados con el uso de los dispositivos y sistemas de fluidos objeto pueden ser utilizados para llevar a cabo un análisis de tendencia sobre la concentración de un analito en un sujeto.

Por ejemplo, un paciente puede ser provisto con una pluralidad de unidades de cartucho para ser usadas para detectar una variedad de analitos en tiempos predeterminados. Un sujeto, por ejemplo, puede utilizar diferentes unidades de cartucho en diferentes días de la semana. En algunas realizaciones el software en el sistema está diseñado para reconocer un identificador sobre el cartucho que instruye al ordenador del sistema para llevar a cabo un protocolo particular para ejecutar el ensayo y/o procesar los datos. Los protocolos en el sistema pueden ser actualizados a través de una interfaz externa, tal como una conexión USB o una conexión Ethernet, o en algunas realizaciones el protocolo completo puede ser registrado en el código de barras unido al cartucho. El protocolo puede ser optimizado según sea necesario anunciando al usuario con varios avisos (por ejemplo, cambiar la dilución de la muestra, la cantidad de reactivo provisto en la muestra líquida, alterar un tiempo de incubación o tiempo de MAA, o alterar los parámetros de recolección de relajación por RMN).

Puede llevarse a cabo un ensayo multiplex utilizando una variedad de diseños de sistema. Por ejemplo, un ensayo multiplex puede llevarse a cabo utilizando cualquiera de las siguientes configuraciones: (i) un arreglo de detección con base espacial puede ser utilizado para dirigir las partículas magnéticas una región particular de un tubo (esto es, sin agregación) e inmovilizar las partículas en diferentes localizaciones de acuerdo con el analito particular que está siendo detectado. Las partículas inmovilizadas son detectadas monitorizando su efecto local sobre el efecto de relajación en el sitio de inmovilización. Las partículas pueden ser separadas espacialmente por separación gravimétrica en flujo (esto es, las partículas grandes se depositan más rápidamente junto con un flujo lento perpendicular a la gravedad para proveer separación espacial con base en el tamaño de partícula con diferentes poblaciones de tamaño de partículas magnéticas marcadas con diferentes dianas). Alternativamente, pueden utilizarse sondas de captura para localizar partículas magnéticas en una región particular de un tubo (esto es, sin agregación) e inmovilizar las partículas en diferentes localizaciones (esto es, sobre una superficie, espuma o gel funcionalizados). Opcionalmente, el arreglo fluye a través del sistema con múltiples bobinas y magnetos, siendo cada bobina un detector separado que tiene las partículas apropiadas inmovilizadas dentro de sí, y la presencia del analito detectada con cambios de señal que surgen de la aglomeración en la presencia del analito. Opcionalmente, una vez que las partículas están separadas espacialmente, cada analito individual en el ensayo multiplex puede ser detectado deslizando una bobina a través de la muestra para leer las partículas ahora espacialmente separadas. (ii) un tubo de microfluído donde la muestra es dividida físicamente entre varias ramificaciones y una señal separada se detecta en cada ramificación, configurada cada ramificación para la detección de un analito separado en el ensayo multiplex. (iii) Un arreglo de 96 pozos (o menos o más) donde cada pozo tiene su propia bobina y magneto, y cada pozo está configurado para detección de un analito separado en el ensayo multiplex. (iv) Una aspirador o dispositivo de paso de flujo con múltiples bobinas direccionables independientemente dentro de un magneto o dentro de múltiples minimagnetos que puede ser utilizado para lecturas secuenciales, siendo cada lectura una reacción separada para la detección de un analito separado en el ensayo multiplex. (v) Un aspirador o dispositivo de paso de flujo con múltiples pozos independientemente direccionables en una placa dentro de un magneto o dentro de múltiples minimagnetos que pueden ser utilizados para lecturas secuenciales utilizando una bobina lateral sencilla que puede atravesar a lo largo de la placa, siendo cada lectura una reacción separada para la detección de un analito separado en el ensayo multiplex. (vi) Un tubo que contiene dos compartimientos leídos simultáneamente, dando como resultado una curva de relajación que es ajustada entonces utilizando ajuste biexponencial para producir las lecturas separadas para el arreglo multiplex. (vii) Un sistema de microfluído donde cada gotita de líquido se mueve alrededor individualmente, para producir lecturas para el arreglo multiplex. (viii) Mediciones secuenciales que utilizan separación y resuspensión magnética requieren sondas de enlazamiento novedosas o la capacidad de encenderlas y apagarlas. Este método sería usado para analitos de ácido nucleico en los cuales el mecanismo de encendido/apagado se basa principalmente en la temperatura de fusión (a temperaturas más altas los bucles de horquilla se relajan, con desnaturalización del enlazamiento de cadena doble), y ocurrirá hibridación a diferentes temperaturas. (ix) Capilares individuales, equipados cada uno con partículas secas dentro de ellos, permiten una multiplexión rápida de volúmenes pequeños para una alícuota pequeña. Las partículas secas son separadas especialmente, y esta separación espacial permite que el lector MR lea cada tubo capilar independientemente. (x) unidades estructurales de enlazamiento conjugadas a nanopartículas se colocan en un gel u otro material viscoso que forma una región y una solución viscosa específica para el analito. El gel o solución viscosa potencia la separación espacial de más de un analito en la muestra de partida porque después de que la muestra se deja interactuar con el gel, el analito diana puede ser difundido fácilmente a través del gel y enlazarse específicamente una unidad estructural conjugada sobre la nanopartícula sostenida en el gel o solución viscosa. La agrupación o agregación del analito específico, potenciado opcionalmente a través de uno de los métodos de aglomeración asistidos magnéticos ya descritos, y la detección de agrupaciones específicas de analitos puede llevarse a cabo utilizando un lector de RMN de localización específica. De esta manera, un arreglo espacial de nanopartículas puede ser diseñado, por ejemplo, como un arreglo 2d. (xi) Las partículas magnéticas pueden ser sembradas y secadas en localizaciones múltiples en un tubo y luego cada localización puede ser medida separadamente. Por ejemplo, un tipo de partícula puede ser enlazada una superficie y una segunda partícula suspendida en solución, hibridando ambas al analito que va a ser detectado. Pueden formarse agrupaciones en la superficie donde ocurre la reacción de hibridación, siendo cada superficie detectable separadamente, (xii) Un arreglo sembrado de ácidos nucleicos puede crearse dentro de un tubo de muestra, configurado cada uno para hibridar una primera porción de un arreglo de ácidos nucleicos diana. Pueden diseñarse partículas magnéticas con sondas para hibridar una segunda porción del ácido nucleico diana. Cada localización puede ser medida separadamente. Alternativamente, puede utilizarse un método genérico o de detección para producir un resultado del arreglo de ácidos nucleicos. (xiii) Un arreglo de partículas magnéticas para detectar un arreglo de dianas puede ser incluido en una muestra sencilla, configurado

cada uno (por ejemplo, por tamaño o propiedades de relajación) para proveer una señal de relajación de RMN distinta con formación de agregados. Por ejemplo, cada una de las partículas puede ser seleccionada para producir tiempo de relajación T₂ distintos (por ejemplo, un conjunto de partículas cubre 10-200 ms, un segundo conjunto de 250-500, un tercer conjunto de 550-1100, y así sucesivamente). Cada uno puede ser medido como una banda separada de ratas de relajación. (xiv) Para la detección de analitos de diversos tamaños o partículas magnéticas, o agregados de diversos tamaños, una muestra sencilla con múltiples analitos y partículas magnéticas puede experimentar separación en la presencia de un campo magnético o eléctrico (esto es, separación electroforética de partículas magnéticas recubiertas con analitos), alcanzando las partículas magnéticas y/o agregados separados el sitio de un detector en diferentes momentos, de acuerdo con lo anterior. (xv) El tubo de detección podría estar separado en dos (o más) cámaras que contienen cada una diferente nanopartícula para detección. El tubo podría ser leído utilizando el lector y a través del ajuste de una curva exponencial múltiple tal como $A \cdot \exp(T2_1) + B \cdot \exp(T2_2)$, la respuesta de cada analito podría ser determinada observando el tamaño relativo de las constantes A y B y T_{2_1} y T_{2_2}. (xvi) Campos magnéticos gradientes podrían ser acuñados para formar campos estrechos. Los pulsos de cuña u otros acuñamientos basados en RF con un campo específico pueden llevarse a cabo para pulsar y recibir señales dentro de una región específica. De esta forma se podría prever una estratificación de los pulsos de RF dentro de un cuña y las señales de resonancia magnética específica podrían ser recibidas desde la cuña específico. Mientras que este método se basa en el acuñamiento del campo magnético gradiente, la multiplexión incluiría entonces, basarse en uno de los otros métodos descritos para obtener diferentes nanopartículas y para que los aglomerados residan en estas diferentes cuñas. Así habría dos dimensiones, una provista por cuñas de campo magnético y una segunda dimensión provista por enlazamiento variable a nanopartículas para más de un analito. Las nanopartículas que tienen dos señales de relajación de RMN distintas por aglomeración con un analito pueden ser empleadas en un ensayo multiplex. En estos métodos, la observación de que partículas pequeñas (30-200 nm) producen un descenso en T₂ con partículas de aglomeración entre tanto grandes (>800 nm) produce un incremento con la aglomeración. El ensayo de reacción está diseñado como una reacción competitiva, de tal manera que con la adición de la diana cambia la señal de relajación de equilibrio. Por ejemplo, si el tiempo de relajación T₂ es más corto, se están formando formaciones de aglomerados de analito con partículas pequeñas. Por otro lado, la relación T₂ se hace más larga, se están formando aglomerados de analito con partículas más grande. Es probablemente útil cambiar la densidad/viscosidad de la solución con aditivos tales como trehalosa o glucosa o glicerol para asegurarse de que las partículas grandes permanezcan en solución. Una nanopartícula que tiene unidades estructurales de enlazamiento para un analito específico cuya señal T₂ disminuye por aglomeración puede ser combinada con una segunda nanopartícula que tenga una segunda unidad estructural de enlazamiento a un segundo analito para cuya señal T₂ hay incremento por aglomeración. En el caso para el cual se sospeche que la muestra tiene ambos analitos y la reacción de aglomeración pueda cancelar uno con otro (la aglomeración incrementada cancela la aglomeración disminuida), se podría prever un ordenamiento del análisis, esto es, la adición de agentes de enlazamiento competitivos para detectar un enlazamiento competitivo y así la señal T₂ que estaría relacionada con la presencia/ausencia del analito de interés en la muestra. Alternativamente, si la aglomeración incrementada cancela la aglomeración disminuida en este formato multiplex, se podría prever el uso de secuencia de pulso de relajación o determinantes de relajación diferentes para identificar la presencia/ausencia o concentración del analito en la muestra. (xvii) Medición de la precipitación de partículas. En este método, se diseñan múltiples tipos de partículas diseñadas para capturar diferentes secuencias diana de ácido nucleico de tal manera que el tamaño de partículas sea lo suficientemente pequeño que las partículas enlazadas con analito permanezcan suspendidas en solución. La adición secuencial de una secuencia "iniciadora" que es complementaria a una secuencia de ácidos nucleicos conjugada a un segundo conjunto de partículas (una partícula más grande, que no necesariamente tiene propiedades magnéticas) y contiene una secuencia complementaria a la secuencia de ADN diana capturada. Después de la hibridación, se formarán aglomerados si la secuencia de ADN diana está presente, por ejemplo, las nanopartículas magnética conjugada con sonda se fusiona una secuencia específica sobre el analito diana y la otra partícula se enlaza a otras secuencias sobre la secuencia de ácidos nucleicos diana. Estos aglomerados serán lo suficientemente grandes para precipitar (esta etapa puede requerir una etapa de centrifugación). En la misma reacción, y simultáneamente, se podría diseñar una partícula magnética adicional, una segunda partícula determinada para la fusión con una segunda secuencia de ácidos nucleico para el cual la formación de los aglomerados de nanopartícula magnética-analito-segunda partícula no precipita. De esta manera la adición secuencial de partículas puede dar como resultado una señalización diferencial. (xvii) Una posible técnica de detección diferente incluye señales separadas en fase, las cuales podrían partir de diferentes secuencias de pulso de bobina RF que están optimizadas para la interacción nanopartícula-analito conjugada. De forma óptima, esto podría lograrse con múltiples bobinas en un arreglo que optimizaría la capacidad de los diferentes pulsos de RF y la detección de la señal de relajación para ser mapeada y diferenciada con el fin de establecer la presencia/ausencia de más de un analito. La multiplexión también puede emplear la característica única de la reacción de aglomeración nanopartícula-analito y la subsecuente detección de solvente agua en la muestra, la capacidad de los aglomerados para formar diversos "bolsillos" y estos aglomerados coordinados para tener porosidad variable. Por ejemplo, los enlazantes que tienen longitud o estructuras conformacionales variables pueden ser empleados para conjugar la unidad estructural de enlazamiento a la nanopartícula magnética. De esta manera, más de un tipo de aglomerado formado en la presencia de un analito podría ser diseñado con la capacidad de tener diferente flujo de agua solvente, y así diferencias en la señal de relajación, a lo largo de la formación del agregado de nanopartícula-analito-nanopartícula. De esta manera, dos o más diseños de enlazante/unidad estructural de enlazamiento permitirían la detección de más de un analito en la misma muestra. (xviii) Los métodos de la invención pueden incluir una mezcla fluorada oleosa/acuosa para capturar partículas en una emulsión. En este diseño se usan un conjunto de partículas

de captura hidrófoba y un conjunto de captura acuosa, el conjunto de partículas de captura hidrófoba está diseñado para enlazarse y agregarse más rápidamente en un ambiente hidrófobo, mientras que un conjunto de partículas de captura acuosa está diseñado para enlazarse y agregarse en un ambiente acuoso. La introducción de una muestra que contiene analito que tiene analitos específicos que se enlazaran bien a las partículas hidrófobas o acuosa, y el mezclado subsecuente en el tubo de detección que tiene solventes tanto hidrófobos como acuosos, enlazamiento y aglomeración dará como resultado una separación física de los analitos a la fase bien sea acuosa o hidrófoba. La señal de relajación podría ser detectada en fase de solución. En el caso de que los analitos y nanopartículas diseñados de esta manera se encuentren físicamente en una emulsión creada por la mezcla de las fases hidrófoba/acuosa, las curvas de relajación serían distinguibles en la fase de emulsión. El tubo de detección puede tener un diseño capsular para potenciar la capacidad de mover la cápsula a través de un detector de RM para leer la señal. Adicionalmente, el uso adicional de una etiqueta fluorescente para leer la intensidad de la sonda puede emplearse, esto es, en el caso de dos analitos diferentes en la misma fase acuosa o hidrófoba, la adición de una etiqueta fluorescente puede ayudar en la determinación de la identidad del analito. Este método es adecuado en muestras para las cuales hay aislamiento o purificación limitados del analito diana del otro material en la muestra porque las señales de resonancia descritas son independientes de la calidad de la muestra. Adicionalmente, la adición de la etiqueta fluorescente puede ser agregada en concentraciones mucho más altas que las agregadas usualmente en estudios de fluorescencia típicos porque estas etiquetas nunca interferirán con las mediciones de relajación. En este método, las sondas de captura de oligonucleótidos que están conjugadas a las nanopartículas magnéticas están diseñadas de tal manera que los sitios de endonucleasa de restricción están localizados dentro de la sección fusionada. Después de la hibridación los aglomerados de nanopartículas-analito que forman la muestra, una medición de relajación provee una señal de base. La introducción de una endonucleasa de restricción específica en el tubo de detección de la incubación dará como resultado una reducción específica de la aglomeración nanopartícula/analito después de que la digestión de restricción haya ocurrido. Después de una medición de relajación subsecuente, el patrón de señal y la digestión de la enzima por la enzima de restricción, se puede deducir la diana. (xix) En un método combinado, una nanopartícula magnética es conjugada con dos unidades estructurales de enlazamiento separadas y distintas, esto es, un oligonucleótido y un anticuerpo. Esta nanopartícula cuando se incubaba con una muestra que tiene ambos tipos de analitos en la muestra formará complejos nanopartícula-analito, y una señal de relajación T2 de línea base será detectable. La adición subsecuente de una concentración conocida de uno de los analitos puede agregarse para reducir la aglomeración formada por ese analito específico desde la muestra. Después de la adición del analito conocido se detecta una señal de relajación T2 subsecuente y la presencia/ausencia del analito de la muestra puede ser conjeturada. Adicionalmente, un segundo analito puede ser agregado para competir con el analito en la muestra de los aglomerados. De nuevo, después de la detección de la señal de relajación T2 subsecuente la presencia/ausencia del segundo analito de la muestra puede ser conjeturada. Esto puede repetirse.

En general un ensayo multiplex que emplea los métodos de esta invención puede ser diseñado de tal manera que el uso de una nanopartícula no superparamagnética para generar aglomerados con analitos de una muestra, reducirá el Fe2 + global en el recipiente de detección del ensayo y extenderá el rango dinámico de tal manera que pueden medirse reacciones múltiples en el mismo recipiente de reacción.

La detección de ácidos nucleicos multiplex puede hacer uso de calidades de hibridación diferentes de las nanopartículas magnéticas conjugadas y el analito de ácido nucleico diana. Por ejemplo, sondas de captura conjugadas a nanopartículas magnéticas pueden ser diseñadas de tal manera que la fusión de la nanopartícula magnética a la secuencia de ácidos nucleicos diana es diferente para más de una secuencia diana de ácidos nucleicos. Los factores para el diseño de estas secuencias sonda-diana diferentes incluye contenido de G-C (tiempo para formar híbrido), concentración de sal variable, temperaturas de hibridación, y/o combinaciones de estos factores. Este método conllevaría entonces que diversas nanopartículas magnéticas conjugadas con ácidos nucleicos interactúen con una muestra de la que se sospecha contiene más de un analito de ácido nucleico diana. Los tiempos de relajación detectados después de diversos tratamientos, esto es, calentamiento, adición de sal, tiempo de hibridación, permitirían tener la capacidad de conjetura con una secuencia de ácidos nucleicos de que se sospecha está presente o ausente en la muestra.

Uso de amplicones complementarios para bloquear una reacción y permitir hibridaciones en serie. En este método, se utilizan cebadores de amplificación universales para amplificar más de una secuencia de ácidos nucleicos específica en la muestra de estargina, formando una reserva de amplicón. El oligonucleótido específico conjugado a nanopartículas magnéticas se agrega a la muestra y se toma una medición de relajación. La muestra es expuesta entonces una temperatura para fundir la interacción oligonucleótido-analito y la adición de un oligonucleótido que no está unido una nanopartícula magnética se agrega para competir con cualquier analito que se enlace a la nanopartícula magnética. Se agrega entonces una segunda nanopartícula magnética que tiene un segundo oligonucleótido conjugado a ella para formar aglomerados con un segundo analito de ácido nucleico diana específico. Alternativamente, el método podría tener una etapa previa a la adición de la segunda nanopartícula magnética que secuestraría de manera efectiva la primera nanopartícula magnética del recipiente de reacción, esto es, exponiendo el recipiente de reacción a un campo magnético para mover las partículas a un área que no estaría disponible a la segunda, o subsecuente reacción.

Cada uno de los métodos de multiplexión anteriores puede emplear una etapa de congelación de la muestra para hacer más lenta la difusión y el tiempo de aglomeración y alterar así la medición del tiempo de relajación. La disminución de la difusión y aglomeración del método puede potenciar la capacidad de separar y detectar más de un tiempo de relajación. Cada uno de los métodos de multiplexión anteriores puede hacer uso de la adición secuencial de nanopartículas conjugadas seguida por la detección de relajación después de cada adición. Después de cada adición secuencial, la línea base de relajación subsecuente se convierte en la nueva línea base para la última adición y puede ser utilizada para ayudar en la correlación del tiempo de relajación con presencia/ausencia del analito o concentración del analito en la muestra.

Sondas de captura ocultas. En este método de multiplexión, los oligonucleótidos conjugados a las nanopartículas magnéticas están diseñados de tal manera que la estructura secundaria o una sonda secundaria sobre la superficie de la partícula oculta o cubre la secuencia para hibridación inicialmente en el recipiente de reacción. Estas secuencias de hibridación ocultas son expuestas o reveladas luego en el recipiente de muestra espacial o temporalmente durante el ensayo. Por ejemplo, como se mencionó más arriba, la hibridación puede ser afectada por sal, temperatura y tiempo para hibridar. Así, en una forma de este método, pueden reducirse o relajarse estructuras secundarias o complementarias sobre la sonda de oligonucleótido conjugada a la nanopartícula magnética para luego exponer o revelar la secuencia para hibridar a la muestra de ácido nucleico diana. Adicionalmente, podrían reducirse o relajarse estructuras secundarias utilizando un compuesto químico, por ejemplo, DMSO. Otro método para revelar o exponer selectivamente una secuencia prehibridación de la nanopartícula conjugada de oligonucleótido con el analito diana es diseñar estructuras de tallo-bucle que tienen un sitio para una endonucleasa de restricción; la digestión subsecuente con una endonucleasa de restricción relajaría la estructura de tallo-bucle para permitir que ocurra la hibridación. Alternativamente, un corte químico de la estructura tallo-bucle, liberando un extremo podría hacer que la secuencia quedara libre para luego hibridar a la secuencia de ácido nucleico diana.

Cuando el arreglo multiplex está configurado para detectar un ácido nucleico diana, el ensayo puede incluir un PCR multiplex para generar diferentes amplicones y luego detectar en serie las diferentes reacciones.

El ensayo multiplex opcionalmente incluye un arreglo lógico en el cual las dianas son fijadas por búsqueda binaria para reducir el número de ensayos requeridos (por ejemplo, gram positivos o negativos lleva a pruebas basadas en diferentes especies que solamente serían llevada a cabo para un grupo o el otro).

Los sistemas pueden adelantar una variedad de ensayos, independientemente del analito que esta siendo detectado a partir de una muestra corporal fluida. Un protocolo dependiente de la identidad de la unidad de cartucho que está siendo usada puede ser almacenado en el ordenador del sistema. En algunas realizaciones, la unidad de cartucho tiene un identificador (ID) que es detectado o leído por el ordenador de sistema, o un código de barras (1D o 2D) sobre una tarjeta y que suministra entonces información específica sobre el ensayo o específica sobre el paciente o sujeto que necesita ser seguida o comprobada con la información del análisis (por ejemplo, curvas de calibración, protocolos, concentraciones o niveles previos del analito). Cuando se desea, el identificador de la unidad de cartucho se utiliza para seleccionar un protocolo almacenado en el ordenador del sistema, o para identificar la localización de diversos reactivos de ensayo en la unidad de cartucho. El protocolo que va a ser seguido en el sistema puede incluir instrucciones al controlador del sistema para llevar a cabo el protocolo, incluyendo pero no limitándose a un ensayo particular que va a ser ejecutado y a un método de detección que va a ser llevado a cabo. Una vez que el ensayo se lleva a cabo por parte del sistema, los datos indicativos de un analito en la muestra biológica son generados y comunicados a un ensamblaje de comunicaciones, en donde puede ser transmitido a el dispositivo externo para procesamiento, incluyendo sin limitación, el cálculo de la concentración del analito en la muestra, o procesado por el ordenador del sistema y el resultado presentado en una lectura de pantalla.

Por ejemplo, el identificador puede ser un identificador de código de barras con una serie de líneas negras y blancas, las cuales pueden ser leídas por un lector de código de barras (u otro tipo de detector) por inserción de la unidad de cartucho. Podrían usarse otros identificadores, tales como una serie de valores alfanuméricos, colores, protuberancias sobresalientes, RFID, o cualquier otro identificador que pueda ser localizado sobre una unidad de cartucho o detectado o leído por el ordenador del sistema. El detector también puede ser un LED que emita luz que puede interactuar con un identificador que refleje la luz y es medido por el ordenador del sistema para determinar la identidad de una unidad de cartucho particular. En algunas realizaciones, el sistema incluye un dispositivo de almacenamiento o memoria con la unidad de cartucho o el detector para transmitir información al ordenador del sistema.

Así, los sistemas pueden incluir un programa de operación para llevar a cabo diferentes ensayos y cartuchos codificados para: (i) reportar al programa de operación cual ensayo preprogramado ha sido empleado; (ii) reportar al programa operador la configuración de los cartucho; (iii) informar al sistema operador el orden de etapas para llevar a cabo el ensayo; (iv) informar al sistema cual rutina preprogramada emplear; (v) introducir información para el usuario con respecto a ciertas variables del ensayo; (vi) registrar un número de identificación del paciente (el número de identificación del paciente también puede ser incluido en el soporte de vacutainer de la muestra de sangre); (vii) registrar cierta información del cartucho (esto es, número de lote, datos de calibración, ensayos sobre el cartucho, rango de datos analíticos, fecha de expiración, requerimientos de almacenamiento, muestras específicas

aceptables); o (viii) reportar al programa operador cualquier actualización o revisión (esto es, de tal manera que se presenten nuevas versiones del ensayo sobre actualizaciones del cartucho solamente y no el sistema más grande, más costoso).

5 Los sistemas pueden incluir una o más unidades de transferencia de fluidos configuradas para adherirse a un brazo robótico (véanse figuras 43A-43C). La unidad de transferencia de fluidos puede ser una pipeta, tal como una pipeta por desplazamiento de aire, con respaldo líquido o de jeringa. Por ejemplo, una unidad de transferencia de fluidos puede incluir un motor en comunicación con un procesador programable del ordenador del sistema y el motor puede mover la pluralidad de cabezas con base en un protocolo desde el procesador programable. Así, el procesador programable de un sistema puede incluir instrucciones o comandos y puede operar una unidad de transferencia de fluidos de acuerdo con instrucciones para transferir muestras líquidas bien sea por extracción (para extraer líquido que esta dentro) o extensión (o expeler líquidos) de un pistón en un espacio de aire cerrado. Tanto el volumen de aire movido como la velocidad del movimiento pueden ser controlados con precisión, por ejemplo, mediante el procesador programable. La mezcla de muestras (o reactivos) con diluyentes (u otros reactivos) puede ser alcanzada aspirando componentes que se van a mezclar en un tubo común y luego aspirar repetidamente una fracción significativa del volumen de líquidos combinado hacia arriba y hacia abajo en una punta. La disolución de los reactivos secos en un tubo puede ser hecha de manera similar.

Un sistema puede incluir una o más unidades de incubación para calentar la muestra líquida y/o para controlar la temperatura del ensayo. Puede utilizarse calor en la etapa de incubación de una reacción de ensayo para promover la reacción y acortar la duración necesaria para la etapa de incubación. Un sistema puede incluir un bloque de calentamiento configurado para recibir de una muestra líquida por un tiempo predeterminado una temperatura predeterminada. El bloque de calentamiento puede ser configurado para recibir una pluralidad de muestras.

La temperatura del sistema puede ser regulada cuidadosamente. Por ejemplo, el sistema incluye una carcasa mantenida a una temperatura predeterminada (esto es, 37°C) utilizando aire controlado en temperatura con agitación. El calor residual de cada una de las unidades excederá el que puede ser disipado de manera pasiva por simple cierre por conducción y convección al aire. Para eliminar el calor residual, el sistema puede incluir dos compartimientos separados por un piso aislante. El compartimiento superior incluye aquellas porciones de los componentes necesarios para la manipulación y medición de las muestras líquidas, mientras que el compartimiento inferior incluye los elementos generadores de calor de las unidades individuales (por ejemplo, el motor para la centrifuga, los motores para las unidades de agitación, la electrónica para cada una de las unidades separadas, y los bloques de calentamiento para las unidades de incubación. El piso inferior es ventilado entonces y se utiliza enfriamiento por aire forzado para retirar el calor del sistema. Véanse las figuras 44A y 44B.

La unidad de MR puede requerir una temperatura controlada con mayor precisión (por ejemplo, $\pm 0.1^\circ\text{C}$), y así puede incluir opcionalmente una carcasa separada en la cual se sople aire calentado a una temperatura predeterminada. La carcasa puede incluir una abertura a través de la cual se inserta y retira la muestra líquida, y hacia afuera de la cual se deja escapar el aire calentado. Véanse figuras 45A y 45B. Pueden utilizarse también otras metodologías de control de temperatura.

Ejemplo 1. Preparación de partículas recubiertas

En resumen, se lavó 1 mg de partículas magnéticas carboxiladas sustancialmente no dispersas y se resuspendió en 100 μl de regulador de activación, MES 10 mM. Se agregaron 30 μl de aminodextrano 10 mg/ml de 10 kDa (Invitrogen) al regulador de activación y se incubaron sobre un rotador durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para el acoplamiento de los grupos carboxilo a aminos en el dextrano, se agregaron 30 μl de 1-Polietil-3-[3-dimpolietilaminopropil]carbodiimida Clorhidrato (EDC) 10 mg/ml y se incubó en rotación durante 2 horas a temperatura ambiente. Las partículas fueron lavadas del dextrano libre 3x en 1 ml de PBS utilizando separación magnética, luego resuspendidas en 1 ml de PBS. Se utilizaron 100 μl de una solución 100 mM de sulfo-NHS-biotina (Invitrogen) para decorar los grupos amino sobre la superficie del dextrano con biotina. Después de 30 minutos de incubación, las partículas fueron lavadas 3x en 1 ml de regulador de activación. A continuación, se introdujo un bloque de proteína de 100 μl de 0.5 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma) y se introdujeron 30 μl de EDC 10 mg/ml y se incubó durante la noche (Sigma). Las partículas preparadas fueron lavadas 3x en 1 ml de PBS y resuspendidas hasta la concentración deseada.

Se ha demostrado que las partículas preparadas sintetizadas con este protocolo dan resultados similares en los ensayos de T_2 para la detección de un analito, si las muestras incluyen un regulador o sangre lisada al 20% (véase figura 37). Las variaciones de las preparaciones en donde el aminodextrano prebiotinilado fue conjugado directamente a las partículas en una etapa también han dado como resultado un rendimiento similar en los ensayos de T_2 en muestras tanto de sangre como de regulador.

Ejemplo 2. Establecimiento de partículas preparadas con y sin un bloque de proteína

En resumen, las partículas magnéticas de aminodextrano cubiertas con biotina, preparadas de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 1 fueron probadas en PBS y en muestras de sangre lisada al 20% en un ensayo de T_2 de titulación con antibiotina.

5 El ensayo fue llevado a cabo con el siguiente procedimiento. 50 μL de matriz, bien sea PBS o muestra de sangre lisada al 20%, 50 μL de concentraciones variables de anticuerpo antibiotina, y 50 μL de un anticuerpo secundario de 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fueron agregados a un tubo de RMN de 5 mm. Se agregaron entonces 150 μL de partículas de Fe 0.02 mM a cada tubo (esto es, 2.7×10^8 partículas por tubo). Las muestras fueron entonces sometidas entonces a vórtex durante 4 segundos e incubadas en un bloque de calentamiento a 37°C durante 2 minutos. Cada muestra fue sometida de nuevo a vórtex durante 4 segundos, e incubada durante un minuto adicional en el bloque de calentamiento a 37°C . Después de la incubación, cada muestra fue colocada en un Bruker Minispec durante 10 minutos, bajo un campo magnético. Después de 10 minutos, la muestra fue retirada del magneto, sometida a vórtex durante 4 segundos, e incubada en un bloque de calentamiento a 37°C durante 5 minutos. Después de 5 minutos, cada muestra fue sometida de nuevo a vórtex e incubada en un bloque de calentamiento a 37°C durante 1 minuto adicional. Los valores de T_2 fueron tomados utilizando el programa Bruker Minispec con los siguientes parámetros:

15 Barridos: 1

Ganancia: 75

Tau: 0.25

Tren de eco: 3500

Tren de eco total: 4500

20 Ecos imitación: 2

Se calcularon los valores de $\Delta T_2: T_2 - (T_2)_0$, y los resultados se representan en la Figura 37.

25 Las partículas sintetizadas con un bloque de proteína AXN4, dieron rendimiento igual en sangre y regulador (figura 37). La gráfica representada en la figura 38 compara las partículas preparadas con (círculo abierto) y sin (círculo relleno) una etapa de bloqueo de proteína. Se ha encontrado así que el bloque de proteína puede ser necesario para alcanzar similar funcionalidad en matrices de sangre.

30 Los bloques de proteína adicionales que incluyen pero no se limitan a gelatina de piel de pez también han sido exitosos. Las partículas fueron preparadas de acuerdo con el método descrito más arriba, con la excepción de que en lugar de utilizar BSA como bloque de proteína, se sustituyó por gelatina de piel de pez (FSG). La gráfica representada en la figura 39 muestra los resultados de un ensayo de T_2 (como se describe más arriba) utilizando la titulación con anticuerpos para partículas bloqueadas con BSA y comparadas con FSG. Los datos indican que hay poca o ninguna diferencia entre los dos métodos de bloqueo de proteínas (véase figura 39). Sin embargo la BSA mostró ser un bloque más confiable.

Ejemplo 3. Determinación de la cantidad de recubrimiento de dextrano

35 Los intentos para incrementar la densidad del recubrimiento de dextrano sobre las partículas han demostrado reducir la funcionalidad de las partículas preparadas en sangre. La preparación de partículas descritas en Ejemplo 1 más arriba que demuestran un rendimiento regulador/sangre casi equivalente utilizó un 10x de exceso de base de dextrano sobre un modelo de llenado de espacio para determinar la cantidad de dextrano para incluir en los experimentos de recubrimiento. En un intento por funcionalizar las partículas con una fidelidad mayor, el incremento del recubrimiento con dextrano a un exceso de 1000-10000x de dextrano en experimentos de recubrimiento generó 40 partículas con un recubrimiento de dextrano más grueso que produjo una respuesta reducida en sangre en comparación con un regulador. Se concluye que una densidad moderada de dextrano con un bloque de proteína puede ser deseable para producir un recubrimiento de partícula que funcione bien en ensayos de T_2 en la presencia de muestras de sangre (véanse figura 40A y 40 B).

Ejemplo 4. Detección de un analito de molécula pequeña en muestras de sangre entera

45 Materiales y métodos:

Anticuerpo monoclonal antibiotina de ratón de Jackson Immuno Research Labs (200-002-211)

Antirratón de oveja Jackson Immuno Research Labs (515-005-071)

ES 2 576 927 T3

Tween 20

Albúmina de suero bovino (Sigma Product #: B4287-256)

1xPBS Tabletas (Sigma P4417)

Analito de biotina PEG FITC

5 Tris HCl 100 mM en dH₂O

Tween[®] al 0.1%

EDTA sangre entera lisada 1:5 con regulador 1X Trax

Óxido de hierro superparamagnético, partículas recubiertas con COOH

Equipo:

10 Bruker Minispec

Sistema de vórtex de velocidad variable (VWR)

Tubos para RMN de 5 mm

Bloque de calentamiento a 37°C con ranuras para tubos de RMN personalizadas

15 Preparación de regulador/analito: BSA al 0.1%, Tween[®] al 0.1% en 1x PBS: Se preparó una solución de Tween[®] 20 al 10% en peso. En resumen, se preparó Tween[®] en 1x PBS. Se prepararon 500 mL de solución de Tween[®] al 0.2% en peso agregando 10 mL de Tween[®] al 10% a 490 mL de 1x PBS. Se preparó una solución al 2% de BSA en solución de 1x PBS en peso. Se preparó una solución de BSA al 0.2% agregando 50 mL de BSA al 2% en PBS a 450 mL de 1x PBS. Las diluciones fueron combinadas para hacer un volumen final de 1 L y una concentración de regulador final de 0.1% de BSA, 0.1% de Tween[®] en 1x PBS.

20 Analito PEG-FITC-Biotina: Se prepararon 100 µl de una solución 0.5 mM a partir de Tris HCl 1mM. Se mezclaron 40 µl de PEG FITC biotina con 40 µl de Tris HCl 0.5 mM, y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, se agregaron 70 µl de PEG-FITC-Biotina en Tris HCl 0.5 mM a 630 µl de Tween[®] 0.1% para hacer una solución madre de 100 µM. La solución madre fue mezclada vigorosamente por vórtex. Se agregaron 200 µl de solución 100 µM a 900 µl de Tween[®] al 0.1% para hacer un analito 20,000 nM. Se prepararon 10 diluciones en serie hasta 0.02 nM

25 Procedimiento:

Se transfirieron por pipeta 25 µl de analito apropiado y 50 µl de matriz de sangre lisada 1:5 directamente en un tubo de RMN de 5 mm. Las muestras fueron sometidas a vórtex durante 4 segundos. Se agregaron 25 µl de anticuerpo anti-biotina (0.18 µg/ml diluidos en Tween[®] 20 al 0.1%, 0.1% de BSA, 1xPBS), seguidos por una incubación a 37°C durante 15 minutos. Después de 15 minutos, se agregaron 50 µl de anticuerpo anti-ratón secundario de 3.0 µg/ml (diluido en Tween al 0.1%, BSA al 0.1%, 1xPBS) y 150 µl de partículas de Fe de 0.02 mM (2.7×10^8 partículas por tubo) al tubo de RMN. La muestra fue sometida a vórtex entonces durante 4 segundos e incubado durante 5 segundos a 37°C. La muestra fue colocada en un Bruker Minispec durante 10 minutos, bajo campo magnético. Después de 10 minutos, la muestra fue retirada del magneto e incubada durante 5 minutos adicionales. La muestra fue sometida a vórtex de nuevo durante 4 segundos e incubada durante 1 minuto adicional. Los valores T₂ fueron tomados utilizando el programa de Bruker Minispec con los siguientes parámetros:

Barridos: 1

Ganancia: 75

Tau: 0.25

40 Tren de eco: 3500

Tren de eco total: 4500

Ecos imitación: 2

Ejemplo 5: Síntesis de partículas cubiertas con anticuerpos

Partículas magnéticas recubiertas con aminodextrano preparadas como se describió en el Ejemplo 1 pueden ser funcionalizadas adicionalmente con anticuerpo a través de un enlace SMCC-SATA (SMCC=succinimidil 4-[N-maleimidompolietil]ciclohexano-1-carboxilato; SATA = N-succinimidil-S-acetiltioacetato). Las partículas magnéticas carboxiladas son conjugadas primero con un aminodextrano de 10 kDa a través de química de EDC como se describió más arriba. Las partículas cubiertas con dextrano son modificadas posteriormente con un exceso de sulfato-SMCC para proveer un grupo funcional maleimida. Los anticuerpos son modificados con el enlazante SATA el cual se enlaza primariamente a las aminas en el anticuerpo. El enlace SATA es controlado para minimizar la sobrefuncionalización del anticuerpo la cual puede llevar a entrecruzamiento de las partículas o afinidad reducida del anticuerpo. Después de la desacetilación, el enlazante SATA expone un grupo funcional tiol el cual puede ser utilizado para unirse directamente a las partículas funcionalizadas con maleimida formando un enlace tioéter. El número de anticuerpos conjugados a cada partícula puede ser medido utilizando un ensayo con proteína BCA (Pierce). Los enlazantes que proveen funcionalidad similar al SATA han sido usados exitosamente, tales como SPDP (N-Succinimidil 3-[2-piridilditiol]-propionato).

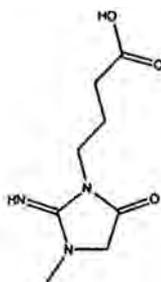
También pueden prepararse partículas magnéticas recubiertas con anticuerpos utilizando las químicas descritas más arriba, pero con enlace covalente directo a la partícula carboxilada base. En algunos casos, puede ser necesario agregar recubrimiento adicional a la superficie de la partícula, tal como dextrano, o un agente bloqueador. Pueden utilizarse químicas similares con recubrimientos alternos al aminodextrano, tales como PEG o BSA.

20 Ejemplo 6. Ensayo de creatinina

En resumen, el ensayo incluye lo siguiente: Una muestra diana se incuba en la presencia de una partícula magnética que ha sido cubierta con creatinina, la cual está enlazada a la superficie de las partículas magnéticas. Las partículas magnéticas cubiertas con creatinina están diseñadas para agregarse en la presencia del anticuerpo de creatinina. Cada una de las partículas magnéticas cubiertas con creatinina y el anticuerpo de creatinina se agrega a la muestra líquida que contiene creatinina, la cual compete con las partículas magnéticas por el anticuerpo de creatinina. Así, el enlazamiento de la creatinina al anticuerpo bloquea la aglomeración de las partículas magnéticas, y se marcan niveles bajos de creatinina por la formación de aglomerados. Estos aglomerados alteran las tasas de relajación rotación-rotación de la muestra cuando se exponen a un campo magnético y el cambio en los tiempos de relajación T_2 (midiendo un cambio en la señal de resonancia magnética a partir de las moléculas de agua circundante) puede correlacionarse directamente con la presencia y/o concentración del analito en la muestra diana.

Anticuerpo de creatinina

Al establecer el programa de generación de anticuerpo para creatinina, se diseñó una molécula de creatinina modificada (COOH-creatinina) y se conjugó a transferrina para inmunización en ratones BALB-C y AJ.



35 COOH-creatinina

Se generaron treinta y cuatro clones estables que producían anticuerpo. Estos clones surgieron bien de BALB-C (células de bazo) (n=17) o ratones AJ (n=17). Las dos líneas de ratones genéticamente diferentes fueron seleccionadas a partir de las diferencias genéticas conocidas en sus sistemas inmunes. Los criterios y procesos de selección fueron desarrollados para criba e identificación de un anticuerpo monoclonal óptimo para uso en el ensayo. El proceso de selección de anticuerpos incluyó criba para enlazamiento a BSA-creatinina por ELISA, afinidad/sensibilidad/especificidad en anticuerpos por ensayos competitivos por ELISA utilizando creatinina e interferentes potenciales, determinación de la capacidad del anticuerpo para ser conjugado a la partícula magnética y funcionalidad en un ensayo de conmutación de relajación magnética T_2 .

Usando los criterios para selección de anticuerpos establecidos delineados más arriba, se identificaron siete

anticuerpos monoclonales y seleccionaron como candidatos potenciales en el ensayo.

Partículas magnéticas recubiertas con creatinina

- 5 Se lavaron partículas magnéticas carboxiladas sustancialmente monodispersas y se resuspendieron en 100 μ l de regulador de acoplamiento (MES 50 mM, pH = 4.75). Se agregó sulfo-NHS (55 μ mol en 200 μ l de regulador MES) y la mezcla se sometió a vórtex. A la mezcla se agregó EDC (33.5 μ mol en 200 μ l de regulador MES). La solución fue sometida a vórtex brevemente y colocada sobre un mezclador de extremo a extremo durante 1 hora a temperatura ambiente, se dejó depositar y se retiró el sobrenadante. A los sólidos resultantes se agregó 1 ml de BSA al 1% en PBS, y de nuevo la mezcla fue sometida a vórtex y colocada sobre un mezclador de extremo a extremo durante 15-18 horas a temperatura ambiente. Las partículas se dejaron depositar y se retiró el sobrenadante.
- 10 Las partículas recubiertas con BSA fueron suspendidas en 0.5 mL de PBS-T20 al 0.01% (regulador de fosfato 10 mM, pH = 7.4, NaCl 150 mM, con Tween[®] 20 al 0.01%). Los grupos carboxilo sin reaccionar fueron sometidos a metil-PEG4-amina (20 μ l de 10% v/v en DMSO) como agente bloqueador. La mezcla se sometió a vórtex y se colocó sobre un mezclador de extremo a extremo durante 8 horas a temperatura ambiente. Las partículas resultantes recubiertas con BSA fueron lavadas repetidamente con 0.5 mL de PBS-T20 al 0.01%.
- 15 Se combinaron COOH-creatinina (66 μ mol), EDC (140 μ mol), y NHS (260 μ mol) con 300 μ l de DMSO seco para formar una pasta, la cual se aclaró a medida que la reacción se acercaba a su terminación. Las partículas recubiertas con BSA fueron suspendidas en 0.5 mL de PBS-T20 al 0.01% (pH = 8), seguido por la adición de la solución de COOH-creatinina activada. La mezcla resultante fue sometida a vórtex y colocada en un mezclador de extremo a extremo durante 4 horas a temperatura ambiente. Las partículas resultantes fueron lavadas 3x cada vez por sonicación utilizando DMSO:PBS-T20 al 0.01% 1:15 y 1:30 (vol/vol). Las partículas fueron lavadas entonces 3x cada vez por sonicación utilizando PBS-T20 al 0.01%. Las partículas fueron resuspendidas en PBS-T20 al 0.01% (pH = 8), y se agregaron 2 mg de NHSPEG 2K en 200 μ l de PBS-T20 al 0.01%. La mezcla fue colocada sobre un mezclador de extremo a extremo durante 12-20 horas a temperatura ambiente. Las partículas fueron lavadas entonces 3x cada una con sonicación utilizando PBS-T20 al 0.01% para producir partículas magnéticas conjugadas con creatinina con BSA secuencial, recubrimiento con creatinina, cubierta con PEG y bloque.
- 20 25 Las partículas recubiertas con creatinina fueron resuspendidas en regulador de ensayo (glicina 100 mM (pH=9.0), NaCl 150 mM, BSA al 1%, ProClin[®] al 0.05%, y Tween[®] al 0.05%).
- 30 El protocolo de ensayo de creatinina fue llevado a cabo utilizando partículas conjugadas con creatinina y se generó/completó el anticuerpo de creatinina soluble con detección utilizando la señal de T₂. La arquitectura del ensayo competitivo de creatinina se representa en la figura 24.
- Las soluciones de partículas magnéticas, anticuerpo y muestra líquida, cuando se indica, fueron sometidas a dilución con un regulador de ensayo que incluye Tris 100 mM pH 7.0, NaCl 800 mM, BSA al 1%, Tween[®] al 0.1% y ProClin[®] al 0.05%.
- 35 Las partículas magnéticas recubiertas con creatinina fueron diluidas a Fe 0.4 mM (5.48x10⁹ partículas/ml) en regulador de ensayo, sometidas a vórtex exhaustivamente y se dejaron equilibrar durante 24 horas a 4-8°C.
- El anticuerpo monoclonal de ratón anticreatinina (descrito más arriba) fue empleado como un agente de enlazamiento multivalente a las partículas magnéticas conjugadas con creatinina. El anticuerpo fue diluido hasta una concentración de 0.8 μ g/ml en regulador de ensayo y sometido a vórtex exhaustivamente.
- 40 Las muestras y los calibradores fueron diluidos a 1 parte de muestra contra 3 partes de regulador de ensayo. El rango de ensayo superior es cerca de 4 mg/dL de creatinina. Para muestras con niveles de creatinina esperados de > 4 mg/dL se llevó a cabo una dilución de muestra adicional utilizando 1 parte de muestra diluida inicial a 4 partes de regulador de ensayo.
- 45 La muestra prediluida, el regulador de ensayo, la partícula magnética, y las soluciones de anticuerpos fueron sometidas a vórtex cada una. Se agregaron 10 μ L de cada solución a un tubo, y el tubo fue sometido a vórtex durante 5 segundos.
- 50 El tubo fue sometido entonces a 12 minutos de gMAA, se incubó durante 5 minutos a 37°C, se colocó en el lector MR (T₂ MR, Reader con 2200 Fluke Temperature Controller, con software NDxlient 0.9.14.1/ hardware Version 0.4.13 Build 2, Firmware Version 0.4.13 Build 0) para medir la tasa de relajación T₂ de la muestra, y la tasa de relajación T₂ de la muestra fue comparada con una curva estándar (véase Figura 25A) para determinar la concentración de creatinina en la muestra líquida.

Comportamiento de los anticuerpos de creatinina modificados

Se probaron diferentes anticuerpos de creatinina en el ensayo para establecer el efecto del anticuerpo sobre la aglomeración. Se observó que el comportamiento de los anticuerpos de creatinina varió en sus características de rendimiento cuando se combina con partículas magnéticas recubiertas con creatinina (véase figura 25B). El análisis en gel de SDS-PAGE de las dos preparaciones reveló una agregación significativamente potenciada en la preparación 1, la que se cree surge de un incremento en la valencia de enlazamiento de la creatinina por este anticuerpo, el cual es agregado debido a su proceso de purificación. Para comparación, se multimerizaron otros anticuerpos monoclonales de creatinina (14HO3) biotinilando el anticuerpo y multimerizando el anticuerpo en la presencia de estreptavidina. Fueron probadas entonces las formas monomérica, biotinilada monomérica y multimerizada con partículas magnéticas recubiertas con creatinina para establecer el efecto de la valencia incrementada sobre el tiempo T_2 . Los resultados se representan en la figura 25C, mostrando que los anticuerpos multimerizados forman aglomerados a concentraciones mucho más bajas que los anticuerpos no multimerizados. Este potenciamiento de la valencia para la aglomeración de partículas también ha sido observado utilizando anticuerpos IgM.

Ejemplo 7. Partícula magnética recubierta con anticuerpo de creatinina

Utilizando una arquitectura de ensayo alternativa, el ensayo incluye lo siguiente: una muestra diana es incubada en la presencia de (i) una partícula magnética que ha sido cubierta con anticuerpo de creatinina; y (ii) un agente de enlazamiento multivalente que incluye múltiples conjugados de creatinina. Las partículas magnéticas están diseñadas para agregarse en la presencia de la unidad estructural de enlazamiento multivalente pero la agregación es inhibida por la competición con creatinina en la muestra líquida. Así, el enlazamiento de la creatinina a la partícula recubierta con el anticuerpo bloquea la aglomeración de las partículas magnéticas en la presencia del agente de enlazamiento multivalente, y se marcan bajos niveles de creatinina por la formación de aglomerados. Estos aglomerados alteran las ratas de relajación rotación-rotación de la muestra cuando se expone a un campo magnético y el cambio en los tiempos de relajación T_2 (medición de un cambio en la señal de resonancia magnética de las moléculas de agua circundante) puede correlacionarse directamente con la presencia y/o concentración del analito en la muestra objetivo.

Partículas magnéticas carboxiladas sustancialmente monodispersas fueron lavadas y resuspendidas en 300 μ l de regulador de acoplamiento (MES 50 mM, pH=4.75), y sulfo-NHS (46 μ mol) EDC (25 μ mol) se agregaron a las partículas. La solución fue sometida a vórtex rápidamente colocada sobre un mezclador de extremo a extremo durante 1 hora a temperatura ambiente. Las partículas activadas fueron lavadas con PBS-T20 0.01%, en 1 mL de solución al 10% p/v de amina-PEG-amina en PBS-T20 al 0.01%. La mezcla fue sometida a vórtex y colocada en un mezclador de extremo a extremo durante 2 horas a temperatura ambiente, y luego lavada a 3x con PBS-T20 al 0.01%.

El BSA puede ser sustituido por amina-PEG-amina como química alternativa. Las partículas magnéticas recubiertas con BSA fueron preparadas como se describe en el Ejemplo 6, en la sección que describe partículas magnéticas recubiertas con creatinina.

Las partículas fueron resuspendidas en 260 μ l de PBS-T20 al 0.01% y se hizo reaccionar con 198 μ l de sulfo SMCC (5 mg/mL en PBS-T20 al 0.01%). La solución fue sometida a vórtex rápidamente y colocada sobre un mezclador de extremo a extremo durante 1 hora a temperatura ambiente, y luego se lavo 3x con PBS-T20 al 0.01% con EDTA 10 mM para producir partículas recubiertas con SMCC.

El anticuerpo marcado con SATA fue preparado combinando SATA (30 nmol en DMSO) con anticuerpo (2 nmol en PBS, pH=7.4). La solución fue colocada sobre un mezclador de extremo a extremo durante 1 hora a temperatura ambiente. Los grupos sulfhidrilo bloqueados sobre el anticuerpo marcado con SATA fueron desprotegidos por tratamiento con regulador de desacetilación (clorhidrato de hidroxilamina 0.5 M en pH 7.4, fosfato 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, EDTA 10 mM) durante 1 hora y purificado a través de una columna de desalinización usando PBS que contenía EDTA 10 mM antes del uso.

Como una alternativa a SATA, puede utilizarse anticuerpo marcado con SPDP. El anticuerpo marcado con SPDP fue preparado agregando SPDP (10 mmol en DMSO) con anticuerpo (2 nmol en PBS, pH 7.4). La solución fue incubada durante 1 hora a temperatura ambiente y purificada a través de una columna de desalinización. El puente disulfuro de SPDP sobre el anticuerpo marcado con SPDP fue escindido en una reacción con mercaptoetilamina 5 mM e incubado durante 10 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo marcado con SPDP con el puente de disulfuro escindido fue purificado a través de una columna de desalinización antes del uso.

Las partículas funcionalizadas con SMCC con recubrimiento de PEG o BSA y el anticuerpo modificado con SATA desacetilado fueron combinados y colocados en un mezclador de extremo a extremo durante la noche a temperatura ambiente, lavados con 3x PBS-Tween[®] 80 al 0.05%, y resuspendidos en PBS-T20 al 0.01% con EDTA al 10 mM. Se agregó un agente bloqueador (m-PEG-SH 2K), la solución fue colocada en un mezclador de extremo a extremo durante 2 horas, lavada 2x con PBS-Tween[®] 80 al 0.05%, y resuspendida en PBS-Tween[®] 80 al 0.05%, BSA al 1% y ProClin[®] al 0.05% para producir partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo.

Las partículas recubiertas con BSA funcionalizadas con SMCC y el anticuerpo marcado con SPDP con puente de disulfuro escindido fueron combinados y colocados sobre un mezclador de extremo a extremo durante 2 horas a temperatura ambiente, lavado 2 veces con PBS-Tween® 20 al 0.01%, EDTA 10 mM EDTA y resuspendidos en PBS-T20 al 0.01%, y EDTA a 10 mM. Se agregó un agente bloqueador, m-PEG-SH 2K (1 µmol), y la solución fue colocada sobre un mezclador de extremo a extremo durante 2 horas. Se agregó un segundo agente bloqueador, n-etil maleimida (5 µmol). Las partículas fueron mezcladas durante 15 minutos, lavadas 2 veces con PBS-Tween® 20 al 0.01%, y resuspendidas en pH 9, Tris 100 mM, Tween® 80 al 0.05%, BSA al 1% y ProClin® al 0.05% para producir partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo.

El procedimiento delineado más arriba puede ser utilizado con anticuerpos de creatinina, o los anticuerpos de creatinina pueden ser acoplados directamente a la superficie de las partículas magnéticas carboxiladas a través de acoplamiento con EDC.

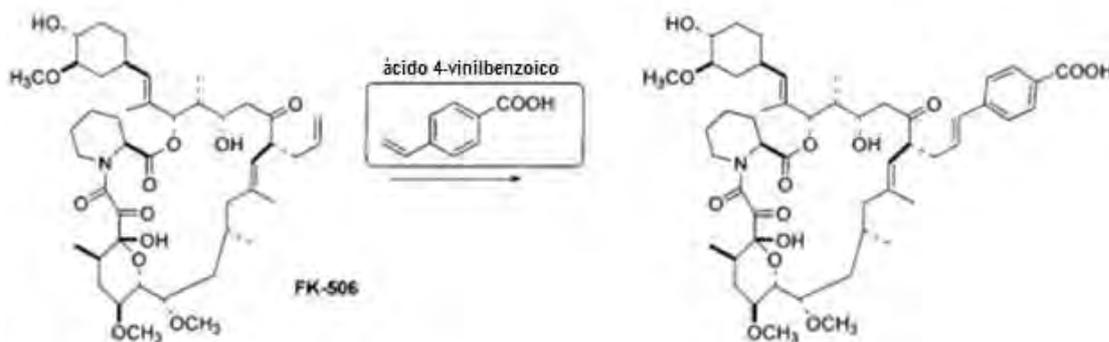
Agentes de enlazamiento multivalentes de creatinina

La COOH creatinina fue conjugada a 3 compuestos de aminodextrano (Invitrogen; PM 10k, 40k, 70k con 6.5, 12, y 24 grupos amino por molécula de dextrano respectivamente) y BSA a través de acoplamiento con EDC. Los agentes de enlazamiento multivalentes resultantes de BSA-creatinina y amino-dextrano-creatinina pueden ser utilizados en el ensayo de inhibición competitiva como se describe más arriba. Se alcanzaron grados de sustitución entre 2-30 creatininas por unidad estructural de dextrano. Una curva de inhibición de creatinina de ejemplo se muestra en la figura 33. El agente de enlazamiento usado es dextrano de 40 kDa con ~10 creatininas por moléculas de dextrano.

Ejemplo 8. Preparación de agentes de enlazamiento multivalentes de tacrolimus.

Los conjugados de tacrolimus fueron preparados utilizando dextrano y BSA. El FK-506 fue sometido a la reacción de metátesis con olefina utilizando catalizador de segunda generación de Grubbs en la presencia de ácido 4-vinilbenzoico como se representa más abajo en el esquema 1. La mezcla de producto crudo fue purificada por cromatografía en sílica gel en fase normal.

Esquema 1



25

Conjugados de dextrano

Los conjugados dextrano-tacrolimus fueron preparados utilizando amino-dextranos de tres pesos moleculares diferentes, cada uno con una sustitución diferente de grupos amino.

Se combinaron con agitación 2.78 mL de solución de EDC (40 mg/mL de clorhidrato de EDC) y 2.78 mL de solución de sulfo-NHS (64 mg/mL de sulfo-NHS). A esta mezcla se agregaron 0.96 mL de solución de derivado ácido de tacrolimus (C21) (28.8 mg/mL en DMSO) y el contenido se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente para formar el derivado ácido de tacrolimus (solución Tac activada 4.6 mM). El tacrolimus activado fue utilizado inmediatamente.

Se disolvieron diversos polímeros de amino-dextrano en regulador de fosfato de sodio 100 mM (pH 8.0) para hacer una solución de reserva de 9.5 mg/mL.

ES 2 576 927 T3

La solución de Tac activada fue agregada gota a gota con agitación a temperatura ambiente a la solución de reserva de aminodextrano en las relaciones tabuladas a continuación. Cada reacción fue agitada vigorosamente durante al menos 2 horas.

Tabla 6

Reacción	Aminodextrano p.m.	Relación de amina:Tac	Aminodextrano (μL)	Volumen Tac (μL)	Relación molar Tac:dextrano estimada
1	70K	1:0.2	1000	70.8	No probada
2	70K	1:0.4	1000	141.6	No probada
3	70K	1:0.8	1000	283.2	4.1
4	70K	1:1.6	1000	566.4	No probada
5	70K	1:3.2	1000	1132.8	No probada
6	70K	1:5	1000	1770	15.8
7	10K	1:0.8	1000	283	1.0
8	10K	1:5	1000	1766	2.2
9	40K	1:0.8	1000	287	2.0
10	40K	1:5	1000	1793	8.2

5

Los conjugados resultantes de Tac-dextrano fueron purificados usando una diálisis seriada de 5 etapas de cada producto de reacción (1^o - 15% (v/v) DMSO acuoso; 2^o - 10% (v/v) metanol acuoso; 3^o a 5^o - agua de alta pureza; al menos 2 horas para cada etapa; utilizando una membrana de diálisis de 3,500 MWCO para el aminodextrano de 10K PM y una membrana de diálisis 7K MWCO para el aminodextrano de 40K y 70K).

10 Después de la purificación, cada una de las muestras fue liofilizada y se determinó el peso seco. Los agentes de enlazamiento multivalentes fueron reconstituidos antes del uso.

Después de la reconstitución, las relaciones de sustitución de tacrolimus fueron estimadas con base en la absorbancia a 254 nm.

15 Los experimentos fueron llevados a cabo para determinar que tamaño de dextrano proveía el rendimiento de aglomeración más óptimo. En resumen 10 μL de MeOH al 10%, BSA al 1% en PBS, regulador pH 6.3, 20 μL de aglomerante de Tac de dextrano, 10K, 40K, 70K, a concentraciones variables, y 10 μL de partículas recubiertas con anti-tacrolimus en Fe 0.2 mM fueron agregados a un tubo de PCR de 200 μL (2.7×10^9 partículas por tubo). La muestra fue sometida a vórtex utilizando un mezclador de placa a 2000 rpm durante 2 minutos, precalentada durante 15 minutos a 37°C en una estación de incubación, expuesta a un magneto lateral e inferior durante 1 minuto cada vez, repetida por 6 ciclos, sometida a vórtex de nuevo durante 2 minutos a 2000 rpm, incubada por 5 minutos en una incubadora a 37°C que contiene el bloque de calentamiento diseñado para tubos de PCR, y se leyó el T₂ sobre el lector de MR. Los datos indican que las relaciones de peso molecular/sustitución variada de Tac dextrano puede dar como resultado una señal de T₂ mejorada (véase figura 34). Además, una sustitución más alta también dio como resultado una respuesta mejorada (véase figura 35).

25 Conjugados de BSA

Los conjugados BSA-tacrolimus fueron preparados con grados variables de sustitución con tacrolimus.

Se combinaron con agitación 34.5 μL de solución de NHS (66.664 mg/mL en acetonitrilo) y 552 μL de EDC (6.481 mg/mL en MES 50 mM pH 4.7). Se agregaron 515.2 μL de esta mezcla de EDC NHS gota a gota a 220.8 μL de derivado ácido de tacrolimus (C21) en solución (33.33 mg/mL en acetonitrilo) y el contenido se agitó durante 1 hora

a temperatura ambiente para formar el derivado ácido de tacrolimus activado. El tacrolimus activado fue usado inmediatamente.

Se disolvió BSA en solución salina regulada con fosfato y acetonitrilo para formar una solución que contenía 5 mg/mL de BSA en acetonitrilo al 40%.

- 5 La solución de Tac activada fue agregada gota a gota con agitación a temperatura ambiente a la solución de BSA en las relaciones tabuladas a continuación. Cada reacción fue agitada vigorosamente durante al menos 2 horas.

Tabla 7

Reacción	Relación de Tac:BSA	BSA (µL)	Volumen de Tac (µL)
1	5:1	1000	35
2	10:1	1000	70
3	20:1	1000	140
4	30:1	1000	210
5	50:1	1000	350

- 10 Los conjugados de Tac-BSA resultantes fueron purificados utilizando una columna de exclusión por tamaño PD10 preequilibrada con acetonitrilo al 50%. El eluyente fue recolectado en fracciones de 1 mL y monitorizado por absorbancia a 280 nm para identificar las fracciones que contenían BSA.

Las fracciones que contenían BSA fueron combinadas y el acetonitrilo fue retirado bajo vacío.

- 15 Los conjugados de Tac-BSA fueron evaluados en cuanto a la capacidad de aglomeración llevando a cabo una titulación similar a la usada para los conjugados de dextrano-tacrolimus. Como se observa el rendimiento de aglomeración difiere con la relación de sustitución con Tac (véase figura 36).

Ejemplo 9. Protocolo de ensayo competitivo de tacrolimus (anticuerpo sobre arquitectura de partícula)

- 20 Se desarrollo un ensayo con tacrolimus utilizando partículas conjugadas con anticuerpo anti-tacrolimus y agente de enlazamiento multivalente de BSA-tacrolimus con detección utilizando un lector MR (véase Ejemplo 6). Este ensayo fue diseñado para probar muestras de sangre entera que habían sido extraídas para liberar tacrolimus a partir de los glóbulos rojos y proteínas de enlazamiento (la extracción de analito hidrófobo de una muestra puede lograrse, por ejemplo, utilizando la metodología descrita en la Patente de los Estados Unidos No. 5,135,875). La arquitectura del ensayo competitivo de tacrolimus se representa en la figura 28.

- 25 Soluciones de partículas magnéticas y agente de enlazamiento multivalente fueron sometidos a dilución, cuando se indica, con un regulador de ensayo que incluía glicina 100 mM pH 9, Tween® 80 al 0.05%, BSA al 1%, NaCl 150 mM, CHAPS al 0.1%.

Una partícula base con funcionalidad COOH fue modificada por recubrimiento aminado secuencial (PEG o BSA), unión covalente de anticuerpo, cubierta de PEG y bloque PEG/proteína (como se describió en los ejemplos anteriores). Las partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo fueron diluidas a Fe 0.4 mM (5.48×10^9 partículas/ml) en regulador de ensayo, y sometidas exhaustivamente a vórtex.

- 30 El agente de enlazamiento multivalente fue formado a partir de tacrolimus modificado con COOH conjugado a BSA (como se describió en el Ejemplo 8). El agente de enlazamiento multivalente fue diluido a 0.02 µg/ml en regulador de ensayo, y sometido exhaustivamente a vórtex.

- 35 La solución de muestra extraída (10 µL) y la solución de partículas magnéticas (10 µL) fueron combinadas y sometidas a vórtex durante 5 segundos e incubadas a 37°C durante 15 minutos. A esta mezcla se agregaron 20 µL del agente de enlazamiento multivalente y la mezcla resultante fue sometida a vórtex durante 5 segundos e incubada a 37°C durante 5 minutos.

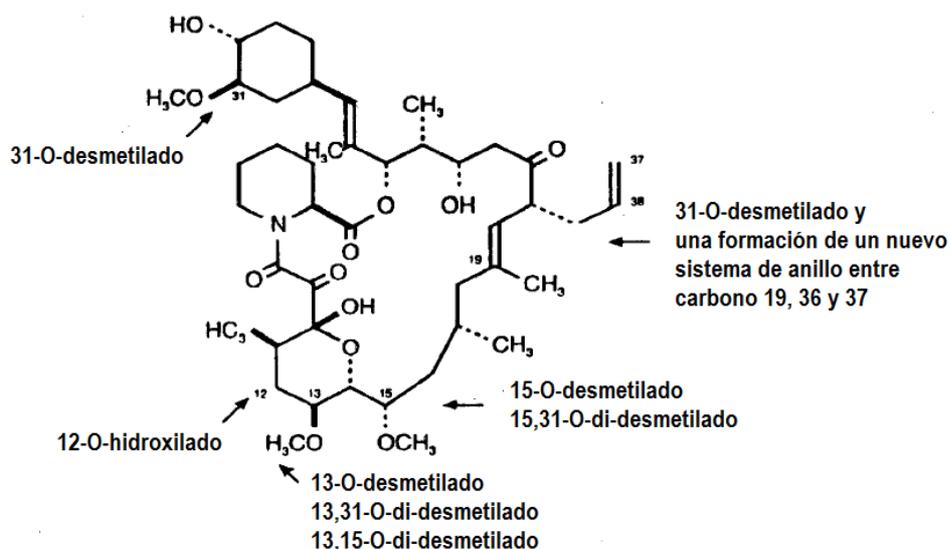
Se prepararon varias muestras como se describió más arriba. Todas las muestras fueron colocadas en la unidad gMAA durante 1 minuto. Todas las muestras fueron colocadas entonces en una bandeja retirada del campo magnético. Cada muestra fue sometida a vórtex durante al menos 5 segundos y regresada a la bandeja. Todas las muestras fueron colocadas de nuevo en la unidad gMAA durante 1 minuto, seguido por vórtex. Este proceso fue remitido 12 veces para cada muestra.

La muestra fue incubada durante 5 minutos a 37°C, colocada en el lector MR (véase Ejemplo 6) para medir la rata de relajación T_2 de la muestra, y la rata de relajación T_2 de la muestra fue comparada con una curva estándar (véase figura 29) para determinar la concentración de tacrolimus en la muestra líquida.

Anticuerpo de tacrolimus

Se han adelantado diversos programas de desarrollo de anticuerpos para crear un anticuerpo de tacrolimus de alta afinidad que incluye modelos monoclonales de ratón tradicionales, estrategias de despliegue de fagos *in vitro* y modelo de conejo. Se utilizaron derivados C21 de tacrolimus como haptenos para los conjugados inmunógenos y de criba usados en estos programas. Se desarrollo un conjunto de criterios para cribar e identificar un anticuerpo óptimo para el uso del ensayo. Los criterios incluyen la capacidad para enlazar conjugados tacrolimus-proteína, la inhibición de ese enlazamiento en la presencia de niveles nanomolares de tacrolimus libre, exhibiendo todos poca o ninguna afinidad por los metabolitos de tacrolimus (representado más adelante).

Utilizando los criterios de selección de anticuerpos establecidos delineados más arriba, han sido identificados varios anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y fragmentos Fab que han sido seleccionados como candidatos potenciales en un ensayo de tacrolimus.



Ejemplo 10. Aglomeración asistida por gradiente magnético lado a lado (gMAA).

Se llevó a cabo una evaluación de los métodos alternativos y de gMAA utilizando el inmunoensayo de creatinina descrito en el Ejemplo 6 con una muestra que no contenía analito para competir con la aglomeración específica partícula-anticuerpo.

Se prepararon varias mezclas idénticas como se describe en el Ejemplo 6. Todas las muestras fueron colocadas en la unida gMAA durante 1 minuto. Todas las muestras fueron colocadas entonces en una bandeja retirada del campo magnético. Cada muestra fue sometida a vórtex durante al menos 5 segundos y retornada a la bandeja. Todas las muestras fueron colocadas en la unidad gMAA durante 1 minuto. Este proceso fue repetido 12 veces para cada muestra, para obtener mediciones replicadas.

Después del último ciclo de gMAA, la muestra fue sometida a vórtex durante 5 segundos, incubada durante 5 minutos a 37°C, y colocada en el lector MR para medir la rata de relajación T_2 de la muestra.

La agregación específica alcanzada con diversos métodos de gMAA está representada en la figura 26, en donde (i) "control" es gMAA (exposición a magneto + vórtex, repetido) en la cual la posición relativa de la muestra y la dirección del campo magnético no cambian con cada ciclo; (ii) "torsión" es gMAA (exposición a magneto + rotación dentro de magneto, repetición) con tubo rotatorio cerca de 90° con respecto al magneto gradiente con cada ciclo; (iii)

“giro de 180” es gMAA (exposición a magneto + retiro de tubo de magneto, rotación, regresar a magneto, repetir) con tubo rotatorio cerca de 180° con respecto al magneto gradiente con cada ciclo: y (iv) “retirar 5 veces” es = retiro del tubo de magneto, 5 segundos de descanso (sin rotación), repetir.

- 5 En la aglomeración asistida magnética pulsada (cíclica), la muestra líquida es expuesta a campos magnéticos de diferentes direcciones en una forma alternante. Como se muestra en la figura 26, la rata a la cual un grado de estado de equilibrio de aglomeración, y lecturas estables de T_2 se alcanzan es acelerada por la ciclización entre dos o más posiciones a lo largo de una serie de tratamientos de gMAA.

Ejemplo 11. Aglomeración asistida por gradiente magnético de lado-fondo (gMAA)

- 10 Se llevó a cabo una evaluación de gMAA “lado-fondo” utilizando el inmunoensayo básico de creatinina descrito en el Ejemplo 6. Para esta evaluación, se diluyó anticuerpo de creatinina a 1 µg/ml y se diluyeron calibradores de suero 1:5 antes del ensayo. Se transfirieron con pipeta 10 µl de calibrador diluido, 10 µl de reactivo de partículas y 20 µl de reactivo de anticuerpo al pozo de reacción. El tubo fue precalentado a 37°C durante 5 minutos y luego procesado a través de gMAA con una exposición de 60 segundos en el magneto lateral, seguido por 60 segundos en el magneto del fondo. Esto se completo durante un total de 6 ciclos o 12 minutos en total. Se llevó a cabo una mezcla final
15 utilizando un vórtex durante 60 segundos antes de la operación de lectura.

En la figura 27 se muestra una curva estándar para el ensayo competitivo creatinina-creatinina con gMAA alternante lateral-fondo demostrando buena respuesta con la configuración gMAA lateral-fondo.

Ejemplo 12. Efecto de variar el tiempo de residencia y temperatura en gMAA.

Se llevó a cabo una evaluación del tiempo de residencia y temperatura en gMAA sobre la aglomeración asistida.

- 20 Se probaron las siguientes condiciones para determinar la temperatura y tiempo de residencia más óptimos para el rendimiento de T_2 . Alteraciones - 6, 12, 24, 48; para cada número de alteraciones se evaluaron los siguientes tiempos de residencia: 30, 60, 120 segundos. Se evaluó también un tiempo de magneto fijo de 6 minutos con los siguientes tiempos de residencia: 30, 60, 120 segundos. Las muestras fueron preparadas agregando 20 µL de concentraciones variadas de proteína A (una proteína diana) y 20 µL de anticuerpo A antiproteína como recubrimiento en partículas magnéticas a Fe 0.08 mM a un tubo de PCR (1.2×10^9 partículas por tubo). Las muestras
25 fueron colocadas en una bandeja de 32 posiciones, sometidas a vórtex en un agitador de placa durante 2 minutos a 2000 rpm e incubadas en una estación de incubación a 37°C durante 15 minutos. Las muestras fueron expuestas entonces a la residencia antes mencionada y a condiciones de alteración entre campos magnéticos alternantes. Después del tratamiento de gMAA, las muestras fueron sometidas manualmente durante 5 minutos, incubadas a 37°C en un bloque de calentamiento compatible con tubos de PCR, y el T_2 fue leído utilizando el lector MR (véase Ejemplo 6). Los datos en las figuras 30A y 30B muestran que la respuesta T_2 es directamente proporcional a la temperatura y tiempo de residencia. Por lo tanto, la temperatura incrementada y el tiempo de residencia/tiempo total dan como resultado una respuesta T_2 mejorada.
30

Ejemplo 13. Efecto de variar el número de ciclos gMAA

- 35 Se llevó a cabo una evaluación de la variación del número de ciclos gMAA usando el sistema y procedimiento del Ejemplo 12.

- Se probaron las siguientes condiciones para efectos sobre el comportamiento de T_2 : Ciclos – 3, 6, 12, 24; para cada ciclo se evaluó el siguiente tiempo de residencia: 30, 60, 120 segundos. Un ciclo consiste de residencia en el lado, seguido por el fondo. 6 ciclos = 12 alteraciones totales. Las muestras fueron preparadas como se describe en el
40 Ejemplo 12. Como se muestra en la Figura 31, el grado de agregación es directamente proporcional al número de ciclos gMAA. También se encontró que cuando el tiempo de exposición al magneto alcanza o excede de 24 minutos, hay un incremento en la agregación no específica que no puede ser dispersada con vórtex (no mostrada aquí).

Ejemplo 14. Ensayo con Candida

- 45 En el ensayo utilizado para Candida se utilizaron dos grupos de partículas magnéticas para la detección de cada especie de Candida. En el primer grupo, se conjugó una sonda de oligonucleótidos de captura de Candida específico para la especie a las partículas magnéticas. En el segundo grupo, se conjugó una sonda de oligonucleótidos de captura específica para la especie adicional a las partículas magnéticas. Por hibridación, las dos partículas hibridarán a dos distintas secuencias específicas de la especie con la cadena en sentido del ácido nucleico diana separado por aproximadamente 10 a 100 nucleótidos. (Alternativamente, los dos oligonucleótidos de
50 captura pueden ser conjugados a un grupo individual de partículas, dando como resultado partículas individuales que tienen especificidad tanto por la primera como por la segunda regiones). Las partículas magnéticas cubiertas con oligonucleótidos están diseñadas para agregarse en la presencia de moléculas de ácido nucleico de una

especie particular de *Candida*. Así, a diferencia de los ensayos de inhibición usados para creatinina y tacrolimus, el ensayo para *Candida* presenta un incremento en la aglomeración en la presencia de moléculas de ácidos nucleicos de *Candida* diana. La arquitectura del ensayo de aglomeración mediado por hibridación se representa en la figura 32.

5 Se utilizan partículas magnéticas carboxiladas en los ensayos de *Candida*. Las partículas magnéticas fueron conjugadas a sondas de captura de oligonucleótidos para crear conjugados oligonucleótidos-partícula. Para cada amplificación diana, se prepararon dos poblaciones de conjugados oligonucleótidos-partícula. Los conjugados oligonucleótidos-partícula fueron preparados usando química EDC estándar entre oligonucleótidos aminados y partículas carboxiladas, o, opcionalmente, acoplado oligonucleótidos biotina-TEG modificados a partículas de estreptavidina. Las reacciones de acoplamiento fueron llevadas a cabo típicamente en una concentración de partícula de 1% de sólidos.

15 Las densidades de oligonucleótidos funcionales postconjugación fueron medidas por hibridación de complementos marcados con Cy5 a las partículas, lavando las partículas tres veces para retirar el oligo no hibridado; y eluyendo por calentamiento a 95°C durante 5 minutos. La cantidad de oligonucleótido marcado con Cy5 cuantificada a través de espectroscopía de fluorescencia.

20 Las reacciones de acoplamiento fueron llevadas a cabo a 37°C durante la noche con mezcla continua utilizando un oscilador o un agitador de rodillos. Los conjugados de partícula resultantes fueron lavados dos veces con un volumen de reacción 1x de agua Millipore; dos veces con un volumen de reacción 1x de imidazol 0.1 (pH 6.0) a 37°C durante 5 minutos; tres veces con volumen 1x de reacción de bicarbonato de sodio 0.1 M a 37°C durante 5 minutos; luego dos veces con volumen de reacción 1x de bicarbonato de sodio 0.1 M a 65°C durante 30 minutos. Los conjugados de partículas resultantes fueron almacenados en sólidos al 1% en TE (pH 8), Tween®20 al 0.1%.

25 El panel de especies de *Candida* detectado incluye *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, y *C. parapsilosis*. Las secuencias son amplificadas utilizando cebadores universales que reconocen secuencias altamente conservadas dentro del género *Candida*. Los oligonucleótidos de captura fueron diseñados para reconocer e hibridar a regiones específicas para la especie dentro del amplificación.

Una alícuota de la muestra de sangre fue sometida primero a lisis como sigue:

30 (i) Una muestra de sangre entera fue mezclada con un volumen en exceso (1.25x, 1.5x, o 2x) de solución de lisis hipotónica de cloruro de amonio. La adición de la solución de lisis destruye todos los RBC, pero no destruye las células de WBC, levadura o bacterias. El material celular fue centrifugado a 9000 rpm durante 5 minutos y se retiró el lisado. Las células intactas fueron reconstituidas con 100 µl de TE (tris EDTA, pH=8) hasta un volumen final de aproximadamente 100 µl; y

(ii) A la muestra de aproximadamente 100 µl, se agregaron 120 mg de perlas de 0.5 mm. La muestra fue agitada durante 3 minutos a aproximadamente 3K rpm, formando por lo tanto un lisado.

35 Una alícuota de cerca de 50 µl del lisado fue sometida entonces a amplificación por PCR por adición del lisado una mezcla maestra de PCR que incluye nucleótidos; regulador ((NH₄)SO₄ 5 mM, MgCl₂ 3.5 mM, glicerol al 6%, Tricina 60 mM, pH=8.7 a 25°C; cebadores (cebador de avance en exceso de 4x (de avance 300 mM; de reverso 0.75 mM) para permitir una producción de cadena sencilla asimétrica en el producto final; y polimerasa termoestable (HemoKlenTaq (New England Biolabs)). Después de una incubación inicial a 95°C durante 3 minutos, la mezcla es sometida a ciclos de PCR: fusión a 62°C; elongación a 68°C; 95°C para 40 ciclos. Nota: hay una diferencia de 6°C en las temperaturas de fusión y elongación; la fusión y la elongación pueden ser combinadas en una etapa sencilla para reducir el tiempo de terminación de la amplificación total.

40 El amplificación de PCR, ahora listo para la detección, es combinado con dos poblaciones de partículas en un ensayo en sándwich.

45 Los cebadores de PCR y las sondas de captura que pueden ser utilizados en los ensayos con *Candida* se proveen a continuación en la Tabla 8.

ES 2 576 927 T3

Tabla 8

Cebadores PCR	
Pan Candida-PCR cebador de avance	GGC ATG CCT GTT TGA GCG TC (SEQ ID NO. 1)
Pan Candida-PCR cebador reverso	GCT TAT TGA TAT GCT TAA GTT CAG CGG GT (SEQ ID NO. 2)
Sondas de captura	
Candida albicans Sonda #1	ACC CAG CGG TTT GAG GGA GAA AC (SEQ ID NO. 3)
Candida albicans Sonda #2	AAA GTT TGA AGA TAT ACG TGG TGG ACG TTA (SEQ ID NO. 4)
Candida krusei Sonda #1	CGC ACG CGC AAG ATG GAA ACG (SEQ ID NO. 5)
Candida krusei Sonda #2	AAG TTC AGC GGG TAT TCC TAC CT (SEQ ID NO. 6)
Candida krusei Sonda	AGC TTT TTG TTG TCT CGC AAC ACT CGC (SEQ ID NO. 32)
Candida glabrata Sonda #1	CTA CCA AAC ACA ATG TGT TTG AGA AG (SEQ ID NO. 7)
Candida glabrata Sonda #2	CCT GAT TTG AGG TCA AAC TTA AAG ACG TCT G (SEQ ID NO. 8)
Candida parapsilosis/tropicalis Sonda #1	AGT CCT ACC TGA TTT GAG GTC NitInd ¹ AA (SEQ ID NO. 9)
Candida parapsilosis/tropicalis Sonda #2	CCG NitInd ¹ GG GTT TGA GGG AGA AAT (SEQ ID NO. 10)
Candida tropicalis	AAA GTT ATG AAATAA ATT GTG GTG GCC ACT AGC (SEQ ID NO. 33)
Candida tropicalis	ACC CGG GGGTTT GAG GGA GAA A (SEQ ID NO. 34)
Candida parapsilosis	AGT CCT ACC TGA TTT GAG GTC GAA (SEQ ID NO. 35)
Candida parapsilosis	CCG AGG GTT TGA GGG AGA AAT (SEQ ID NO. 36)
Control de inhibición 5´	GG AAT AAT ACG CCG ACC AGC TTG CAC TA (SEQ ID NO. 37)

Cebadores PCR	
Control de inhibición 3'	GGT TGT CGA AGG ATC TAT TTC AGT ATG ATG CAG (SEQ ID NO. 38)
<p>1. NitInd es 5' 5-nitroindol, una base que es capaz de fusionarse con cualquiera de las cuatro bases de ADN.</p> <p>2. Nótese que se agregan oligos Ts como espaciadores</p>	

Opcionalmente, el ensayo se lleva a cabo en la presencia de una secuencia de control, junto con partículas magnéticas cubiertas con sondas para confirmar la presencia de la secuencia de control.

Ejemplo 15. Métodos no aglomerantes

Este proceso ha sido demostrado utilizando espuma metálica de níquel tratada con aminosilano con poros de 400 μm cubierta con anticuerpos anticreatinina y que demuestra enlazar específicamente partículas magnéticas derivadas con creatinina. Una pieza cuadrada de 1 cm de espuma metálica de níquel (Recemant RCM-Ni-4753.016) fue lavada por incubación a temperatura ambiente durante 1 hora en HCl 2M, enjuagada exhaustivamente en agua desionizada, y secada a 100°C durante 2 horas. La espuma de níquel fue tratada entonces con 3-aminopropiltriethoxisilano al 2% en acetona a temperatura ambiente durante la noche. La espuma metálica de níquel fue lavada entonces extensamente con agua desionizada y secada durante 2 horas a 100°C. La espuma metálica de níquel tratada con aminosilano fue tratada entonces con glutaraldehído al 2% en agua durante 2 horas a temperatura ambiente y lavada extensamente con agua desionizada. A continuación, la espuma metálica fue expuesta a 100 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo anticreatinina (14H03) (véase ejemplo 6) en PBS durante la noche, lavada extensamente con PBS y tratada con Surmodics Stabilguard para estabilizar y bloquear enlazamiento no específico. Se cortaron piezas cuadradas de dos mm de espuma de metal derivado usando una cuchilla de afeitar nueva teniendo cuidado para no dañar la estructura de la espuma. Se colocó una pieza de la espuma de metal derivada en un tubo de PCR en 20 μl de regulador de ensayo (glicina 100 mM (pH=9.0), NaCl 150 mM, BSA al 1%, ProClin® al 0.05% y Tween® al 0.05%). Se agregaron 20 microlitros de partículas de control (que no deberían enlazarse a la espuma metálica ABX1-11) a Fe 0.2 mM al tubo para llevar el volumen final a 40 μl y la concentración final de partículas a Fe 0.1 mM (1×10^6 - 1×10^8 partículas/tubo). Se preparó también un tubo de PCR separado con las mismas partículas y regulador, sin la espuma metálica. El tubo de PCR que contenía la espuma metálica derivada de las partículas de control fue colocado en una disposición gMAA (posición de halado 6 lateral) durante 1 minuto y retirada tocándola con un desmagnetizador de mano, y colocada de nuevo en la disposición gMAA por otro minuto, se retiró tocando con un desmagnetizador de mano y se colocó de nuevo en la disposición gMAA durante otro minuto y se sometió a vórtex (tres exposiciones magnéticas de 1 minuto). Se retiraron treinta μl de muestra de ambos tubos de PCR, se calentaron a 37°C en un calentador de bloque durante 5 minutos y se leyó el T₂ utilizando el lector MR (véase Ejemplo 6). El T₂ de la muestra sin espuma dio 39.2, y las muestras del tubo de PCR que contenían la espuma dieron una lectura de 45.1, demostrando un bajo nivel de pérdida de partículas debida a NSB. La espuma de metal derivada fue desmagnetizada, sometida a vórtex y enjuagada en regulador de ensayo. Se colocó en un nuevo tubo de PCR con 20 μl de regulador de ensayo 20 μl de partículas AACr2-3-4 derivadas con creatinina con una concentración final de partícula de Fe 0.1 mM. Un tubo de PCR duplicado sin la espuma de metal derivada también fue dispuesto como en el experimento de control. El tubo de PCR con la espuma metálica fue ciclizado dos veces a través del dispositivo gMAA exactamente como en el experimento de control (3 exposiciones de un minuto con desmagnetización después de cada exposición, y vórtex final). Muestras de treinta μl de ambos tubos fueron retiradas y calentadas a 37°C durante 5 minutos y luego leídas en el lector RM. La muestra del tubo de PCR con la espuma metálica derivada dio lectura de 41.5 y la muestra de tubo de PCR con la espuma metálica derivada con el anticuerpo anticreatinina dio lectura de 324.2, demostrando así un enlazamiento/pérdida específica de las partículas magnéticas apropiadas derivadas con creatinina del volumen acuoso leído por el lector MR.

Ejemplo 16. Detección de polimorfismos de nucleótidos sencillos

Hay numerosos métodos mediante los cuales las mediciones de T₂ podrían detectar polimorfismo de nucleótidos sencillos.

La aplicación más simple involucraría la discriminación de no coincidencias a través de una ADN ligasa termofílica (Tth ligasa). Este ensayo requeriría la lisis del material de muestra seguida por corte de ADN. Podrían ligarse adaptadores sobre las sondas de captura de unión a partículas superparamagnéticas que flanquean el SNP de tal manera que el extremo 5' de la sonda de captura aminada en 3' sería perfectamente complementario con un alelo SNP particular y el tratamiento subsecuente con Tth ligasa daría como resultado la unión de las dos sondas de

captura unidas a partículas. La unión por lo tanto aseguraría las partículas en un estado aglomerado. Ciclos de hibridación con fusión repetida darían como resultado la amplificación de señal en casos en donde la amplificación de ADN genómico no es deseada debido al riesgo de desviación de la amplificación. La misma sonda de captura aminada en 5' podría ser utilizada en todos los casos en donde la sonda aminada en 3' podría ser generada para producir 4 grupos distintos (un A, G, C o T) en el extremo 5'. La detección requeriría división de la muestra en los 4 grupos para determinar cuáles nucleótidos estaban presentes en el sitio polimórfico dentro de un individuo particular. Por ejemplo una conmutación de T₂ fuerte en el tubo de detección de G solo indicaría que el individuo era homocigótico para G en esa localización de secuencia particular, mientras que una conmutación en G y A indicaría que el individuo es un heterocigoto para G y A en ese sitio SNP particular. La ventaja de este método es que la Tth polimerasa ha demostrado tener capacidad de discriminación superior incluso discriminando falta de coincidencias G-T (una falta de coincidencia permisiva particular y también la más común) de 1:200 veces contra el complemento correcto. Mientras que las reacciones de detección de ligasa así como los ensayos de ligasa con oligonucleótidos se han empleado en el pasado para definir secuencias de nucleótidos en sitios polimórficos conocidos, toda la amplificación es requerida bien antes o después de la unión. En este ejemplo particular la señal podría ser amplificada a través de un incremento inducido por la unión en el tamaño del complejo de partículas aglomeradas resultante y por lo tanto un incremento en los tiempos de relajación (T₂) medidos.

Una modificación de este procedimiento podría incluir la hibridación de una sonda de captura de unión a partícula que flanquea la hibridación de una sonda biotinilada. Cuando se forma un dúplex perfectamente complementario a través de la hibridación de la sonda de unión a partícula, la ligasa en la salida covalentemente la sonda de biotina a la partícula magnética. De nuevo las rondas repetidas de desnaturalización por calor seguidas por fusión y ligación producirían una alta proporción de oligos largos biotinilados sobre la superficie de la partícula magnética. Un lavado para retirar cualquier sonda libre se llevaría a cabo seguido por la adición de una segunda partícula superparamagnética marcada con estreptavidina. La aglomeración procedería solamente si las sondas biotiniladas estuvieran ligadas sobre la superficie de la primera partícula.

Una metodología de discriminación de hibridación podría ser empleada también. En este ejemplo, los complementos de oligonucleótidos aminados adyacentes a los SNP conocidos serían generados. Estos oligonucleótidos aminados serían usados para derivar la superficie de una placa de 96 pozos con reacción de detección de 1 SNP llevado a cabo por pozo. El ADN genómico sería entonces cortado, ligado a adaptadores y amplificado asimétricamente. Este ADN genómico amplificado sería aplicado entonces a la disposición así como una sonda de detección de SNP biotinilada corta. El ADN genómico amplificado hibridaría a la sonda de captura unida al pozo y la sonda de detección de SNP se uniría entonces al ADN genómico atado. El lavado sería llevado a cabo para retirar la sonda de detección de SNP. Una partícula magnética de estreptavidina (SA) sería agregada entonces a cada pozo. El lavado de nuevo requeriría retirar partículas de SA libres. La detección de T₂ sería llevada a cabo directamente dentro de los pozos mediante partículas superparamagnéticas biotiniladas agregadas para producir partículas aglomeradas atadas a la superficie, o las partículas magnéticas SA podrían ser eluidas de cada pozo sobre la disposición e incubadas en reacciones de detección con partículas magnéticas biotiniladas.

Finalmente podría acoplarse una primera reacción de extensión de cebador a la detección de T₂ para discriminar cuál nucleótido está presente en un sitio polimórfico. En este ensayo, un grupo de didesoxinucleótidos sería empleado con un nucleótido por grupo procesando una biotina (esto es ddA, ddT, dbiotin-C y/o ddG). Se emplearía una partícula superparamagnética que porta una sonda de captura cuya última base por hibridación cae adyacente a un SNP.

El ADN genómico cortado sería dividido e incubado en cuatro reacciones de extensión de cebador separadas. Una exoADN polimerasa catalizaría entonces la adición de un didesoxi complementario al nucleótido presente en el SNP. De nuevo esta reacción podría ser ciclizada si se emplea una polimerasa termofílica para asegurar que la mayor parte de las sondas de captura sobre la partícula serán extendidas. Se llevaría a cabo una separación magnética seguida por un lavado de las partículas seguido por incubación con partículas superparamagnéticas de estreptavidina. La aglomeración sería proporcional al grado de sonda de captura biotinilada sobre la superficie de la primera partícula. Si dos de los grupos didesoxi generaron una ganancia en T₂ (esto es, facilitan la aglomeración de partículas), el paciente sería un heterocigoto. Si solamente un grupo produjo un incremento en T₂, el paciente sería un homocigoto.

Un método final para detectar SNP emplea cebadores de PCR específicos para el alelo, en los cuales el extremo 3' del primero abarca el SNP. Puesto que se emplean condiciones de amplificación restrictivas, si la secuencia diana no es perfectamente complementaria al cebador, la amplificación por PCR estaría comprometida con poco o ningún producto generado. En general, se diseñarían cebadores de avance múltiple (uno perfectamente complementario a cada alelo) junto con un cebador reverso sencillo. El amplicón sería detectado usando dos o más partículas superparamagnéticas enlazadas a sondas de captura para inducir la hibridación con base en reacciones de aglomeración. Una ventaja de esta metodología es que utiliza parte del trabajo ya llevado a cabo en T₂ sobre PCR dentro de muestras crudas, y solamente implicaría cebadores diseñados para abarcar SNPs conocidos. Una desventaja de esta metodología es que no puede determinar localizaciones SNP de novo.

Un método adicional que puede ser utilizado es basarse simplemente en las capacidades de discriminación del entrecruzamiento partícula-partícula debido a la hibridación una diana de ácido nucleico corto. Las no coincidencias en pares de bases para oligonucleótidos han demostrado desplazar dramáticamente el estado de aglomeración de las partículas, y la señal T₂ medida, debido a las eficiencias en hibridación reducida que surgen de la presencia de una falta de coincidencia en una base individual.

Ejemplo 17. Panel de diagnóstico de Candida

La prueba fue llevada a cabo durante el transcurso de 45 días. Se cultivaron cepas de referencia de *C. albicans* y *C. krusei* así como de *C. albicans* y se mantuvieron durante la duración del estudio.

Materiales:

10 Nanopartículas con *C. albicans* y *C. krusei*: Se generaron dos poblaciones en partículas para cada especie, portando las partículas covalentemente conjugadas a oligos complementarios a secuencias específicas para la especie dentro de la región ITS2 (véase Ejemplo 14). Las partículas fueron almacenadas a 4-8°C en TE (pH 8), Tween al 0.1% y fueron diluidas a Fe 0.097 mM en regulador de hibridación de ADN inmediatamente antes del uso.

15 Cepas de *Candida*: Los paneles fueron llevados a cabo utilizando cepa de referencia de *C. albicans* MYA 286 (GenBank FN652297.1), cepa de referencia de *C. krusei* 23210 (GenBank AY939808.1) y aislados clínicos de *C. albicans*. Los cinco aislados de *C. albicans* usados fueron cultivados en YPD a temperatura ambiente. Se seleccionaron colonias individuales, se lavaron 3 veces con PBS, y luego se cuantificaron a través de hemocitometría para la preparación de siembras en sangre entera. Las muestras fueron almacenadas como reservas en glicerol congeladas a -80°C.

20 Sangre humana entera: La sangre humana fue recolectada de donantes saludables e hidratada con K₂EDTA y sembrada con células de *Candida* diluidas lavadas en serie a concentraciones que variaban de 1E5 a 5 células/mL. Las siembras de células preparadas en sangre entera fueron almacenadas en -20°C.

25 Regulador de lisis de eritrocitos: Un regulador de lisis hipotónico que contenía bicarbonato de potasio 10 mM, cloruro de amonio 155 mM y EDTA 0.1 mM fue esterilizado por filtración y almacenado a temperatura ambiente antes del uso. Alternativamente puede utilizarse un agente de lisis de eritrocitos, tal como un detergente no iónico (por ejemplo, una muestra de triton-X 100 e igePAL, o Rrij-58).

30 Mezcla maestra para PCR: Se preparó una mezcla maestra que contenía regulador, nucleótidos, cebadores y enzima (20 µl de regulador de reacción 5x, 22 µL de agua, 2 µL de dNTP 10 mM, 3 µL de cebador de avance 10 µL, 3 µL de cebador reverso 2.5 µM, 10 µL de HemoKlen Taq y 40 µL de lisado agitado con perlas) y se almaceno a temperatura ambiente.

Mezcla maestra de hibridación de partículas: Se preparó una mezcla maestra consistente de conjugados de nanopartículas, sales, surfactantes y formamida (78 µL de formamida, 78 µL 20x SSC, 88.3 µL 1xTE + 0.1% Tween, 7.5 µL CP 1 - 3', y 8.2 µL CP 3 - 5') inmediatamente antes del uso.

35 Perlas de vidrio (0.5 mm), usadas en la lisis mecánica de *Candida*, fueron lavadas en ácido y sometidas a autoclave y almacenadas a temperatura ambiente antes del uso.

Protocolo de PCR:

En la figura 47 se muestra un esquema general del flujo de trabajo para la detección de un patógeno (por ejemplo *Candida*) en una muestra de sangre entera. El protocolo fue como sigue: (i) muestras sembradas de sangre entera humana fueron dejadas en calentamiento a temperatura ambiente (~30 minutos); (ii) se colocaron en cada tubo alícuotas de 1 mL de regulador de lisis de eritrocitos; (iii) cada tubo fue sometido a centrifugación a 9000 g durante 5 minutos y luego se descartó la sangre lisada; (iv) se colocaron alícuotas de 100 µL de TE filtrado a 0.2 micrones en cada tubo; (v) se agregaron 120 mg de perlas de vidrio lavadas con ácido a cada tubo; (vi) cada tubo fue sometido a vórtex durante 3 minutos a velocidad máxima (~3000 rpm); (vii) se colocaron alícuotas de 50 µL de muestra lisada en un tubo que contenía mezcla maestra para PCR; (viii) reacciones de ciclos de PCR como sigue: (desnaturalización inicial: 95°C, 3 minutos; 30-40 ciclos a 95°C, 20 segundos; 30-40 ciclos a 62°C, 30 segundos; 30-40 ciclos a 68°C, 20 segundos; extensión final: 68°C, 10 minutos; inmersión final: 4°C; (ix) cada una de las muestras fue centrifugada brevemente después de la termociclización para formar una pella de sangre coagulada; (x) se pusieron alícuotas de 5 µL de mezcla maestra de partículas en el tubo para cada 10 µL de muestra amplificada; (xi) la mezcla resultante fue bien mezclada y la muestra fue desnaturalizada a 95°C durante 3 minutos; (xii) la muestra fue hibridada a 60°C durante 1 hora con agitación suave; (xiii) la muestra fue diluida entonces a 150 µL con regulador para dilución de partículas, y equilibrada a 37°C en un bloque de calentamiento durante 1 minuto; y (xiv) el T₂ de la muestra fue medido utilizando un lector de MR para T₂.

Resultados de la prueba

5 Repetibilidad de la detección de *Candida albicans* en sangre humana entera: Para determinar la repetibilidad de la medición de T₂ en sangre humana entera infectada con *C. albicans*, se llevó a cabo un estudio de ocho días con el mismo donante cuya muestra fue sembrada y amplificada hibridada a las partículas superparamagnéticas (n=3) cada día y se registraron los valores de T₂ resultantes.

10 La precisión del procedimiento se muestra en la figura 46A y en general se ajusta con los CV de todas las mediciones menores de 12%. La repetibilidad observada en el transcurso de los ocho días se muestra en la figura 46B con CVs menores de 10% a través del rango de concentraciones de *Candida* y 6% para el control negativo. De manera importante, se aplicó una población dos de dos colas de la prueba T de Student para determinar si la diferencia en promedios entre la sangre infectada con *Candida* a 10 células/mL y la sangre del donante saludable era significativa. Los resultados se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9. La diferencia en promedio entre sangre infectada con 10 células/mL y control negativo es significativa (valor p <0.0001)

Valor P	<0.0001
¿Son promedios significativamente diferentes? (P <0.05)	Si
¿Valor P de una o dos colas?	Dos colas
Valor P	<0.0001
t, df	t=40.69 df=23
Número de pares	24
Promedio de diferencias	287.7
Intervalo de confianza 95%	273.0 a 302.3
Cuadrado R	0.9863

15 Influencia de la matriz de muestra sobre la detección y reproducibilidad de *Candida albicans* y *Candida krusei*: sangre saludable de 6 donantes fue sembrada con un rango de células de *C. albicans* o *C. krusei* (1E5 células/mL a 0 células/mL). De la sangre sembrada con *Candida albicans*, se llevaron a cabo diez y seis experimentos independientes. Cada experimento consistió de amplificación por PCR de las 1E5 a 0 células/mL sembradas en sangre con cada reacción de amplificación sometida a tres experimentos replicados de detección de T₂; así para *C. albicans* se registró un total de 48 valores de T₂ a cada concentración probada (véase figure 48A). A la
 20 concentración de prueba más baja (10 células/mL) no se detectó *Candida albicans* el 37% del tiempo (6 de 16 experimentos); sin embargo a 100 células/mL se detectó *Candida albicans* el 100% de las veces. Esto sugiere que el LOD para *C. albicans* está por encima de 10 células/mL pero por debajo de 100 células/mL. Se probarán más concentraciones entre 10 CFU a 100 células/mL para definir mejor el LOD; sin embargo no esperamos observar efectos mayores de la matriz sobre el rendimiento del ensayo. Esto está evidenciado por los CVs de las mediciones
 25 de T₂ que son como sigue: 12.6% a 1E5 células/mL en sangre de 6 donantes, 13.7% a 1E4 células/mL, 15% a 1E3 células/mL, 18% a 1E2 células/mL y 6% a 0 células/mL. Esto sugiere que el ensayo puede detectar de manera confiable a concentraciones de *C. albicans* mayores que o igual a 100 células/mL sin inhibición principal del rendimiento introducida a través de la muestras de sangre de los donantes.

Se llevó a cabo el mismo experimento utilizando una cepa de referencia de *C. krusei*. En este caso se llevaron a cabo 7 experimentos independientes puesto que la sangre sembrada remanente estaba reservada para análisis de cultivo de sangre. No hubo detección a 10 células/mL en ninguno de los experimentos pero hubo detección a 100 células/mL para todas las ejecuciones de experimentos. Esto sugiere el LOD entre 10 y 100 células/mL. De nuevo una titulación de concentraciones celulares entre 100 y 10 células/mL será necesaria para una mejor definición del LOD. Las CVs de las mediciones a través del campo de concentraciones fue: 10.5% a 1E5, 9% a 1E4, 12% a 1E3, 20% a 1E2, 6.4% a 10, y 5.2% a 0 células/mL. Los resultados se muestran en la figura 48B.

Determinación preliminar de límite de detección: Se sembraron cinco aislados clínicos de *Candida albicans* en 6 diferentes muestras de sangre de donantes a concentraciones de 1E4, 1 E3, 5E2, 1E2, 50, 10, 5, y 0 células/mL. Cada aislado fue sembrado en un mínimo de dos diferentes muestras de sangre de donantes. Las reacciones de amplificación fueron detectadas a través de una medición de T₂ con los resultados representados gráficamente en la figura 49. Es importante anotar que no se eliminaron datos por causas dentro de este estudio. No se detectó *C. albicans* el 50% de las veces a 5 células/mL o 10 células/mL; sin embargo a 50 células/mL se detectó *C. albicans* en el 95% de las veces. Estos datos fueron generados usando diferentes aislados clínicos. Cada aislado contiene un número diferente de repeticiones de ADN_r y el número de estas repeticiones puede variar tanto como 4 veces de cepa a cepa (esto es ~50 unidades a 200 unidades). Puesto que los números de copias diana introducidos variarán ligeramente de cepa a cepa y ciertamente de especie a especie, habrá diferencias sutiles en los valores T₂ absolutos observados a números celulares muy bajos (esto es 10 células/mL). Con base en este estudio muy preliminar, los datos sugieren un corte de 10 células/mL; sin embargo esta determinación no puede hacerse en ausencia de las formulaciones finales de reactivos así como del instrumento/cartucho. Sugiere que definir el intervalo de C₅-C₉₅ será difícil porque a 10 células/mL cada reacción contiene solo 4 células. La titulación a números de células inferiores a este es un reto con este volumen de introducción de sangre. Utilizando la distribución de Poisson para calcular el número de reacciones que contendrían 0 células a 10 células/mL hay indicación que solamente el 2% de las reacciones no contendrían células; sin embargo a 5 células/mL, el 13% de las reacciones no contendrán células de *Candida*, a 2 células/mL, ~el 37% de las reacciones no contendrían células de *Candida*. Para incrementar la sensibilidad del ensayo a 95% a 10 células/mL, podríamos incrementar la cantidad de lisado agregado a las reacciones de PCR de 40 µL a 50 µL e incrementar la cantidad de sangre del paciente de 400 µL a 800 µL/reacción.

Determinación preliminar de sensibilidad/especificidad: Inicialmente, la cuantificación de las unidades formadoras de colonia de *Candida* introducida fue llevada a cabo utilizando un hemocitómetro; sin embargo en este caso el operador contó células hijas adheridas como células separadas. Puesto que nuestros datos se reportan en unidades formadoras de colonia/mL y no en células/mL, las adhesiones no deberían ser cuantificadas. Debido a este error, hay pocas células/mL de *Candida* presentes en las diversas concentraciones de siembra y nuestra sensibilidad a 10 células/mL fue solamente de 90%, mientras que nuestra especificidad fue del 100%. A 25 células/mL o mayor observamos 100% de sensibilidad y 100% de especificidad. En todos los casos, los viales de cultivo de sangre inoculados con células de *Candida* fueron positivos a cultivo en sangre en el día 8. Debería notarse que los parámetros habituales para cultivos de sangre es incubación durante 5 días; sin embargo necesitamos extender este tiempo de incubación puesto que muchos de nuestros inóculos requirieron >5 días de incubación. Como ejemplo, la Tabla 10 muestra el tiempo desde la inoculación a cultivo positivo registrado para cuatro diferentes aislados clínicos de *C. albicans* inoculados en cultivos de sangre.

Los resultados de las mediciones de T₂ llevados a cabo en alícuotas de 800 µL a partir de estas muestras de sangre entera sembradas se muestran en la Tabla 10B. En todos los casos fuimos capaces de detectar 25 célula/mL, o más, sin embargo fuimos incapaces de detectar el aislado clínico C3 a 12 células/mL. Es importante anotar que las CFU fueron cuantificadas a través de hemocitometría y no un contador Coulter para este experimento de comparación de método particular. En total se inocularon 51 botellas de cultivo de sangre con aislados clínicos de *Candida albicans* cuantificados por hemocitometría y 35 viales de cultivo de sangre negativos fueron incluidos en el experimento. Los resultados para inóculos mayores de 25 células/mL se muestran en la tabla de contingencia de la Tabla 11.

Tabla 10A. Tiempo de resultados positivos en cultivo de sangre para 4 aislados clínicos diferentes de *Candida albicans*

Aislado de <i>C. albicans</i>	100 CFU/mL	25 CFU/mL	12 CFU/mL	0.0	0.0
C1	161 horas+/-12	161 horas+/-12	161 horas+/-12	192 horas	192 horas
C2	40 horas +/- 12	65 horas +/- 12	47.5 horas	192 horas	192 horas

ES 2 576 927 T3

Aislado de C. albicans	100 CFU/mL	25 CFU/mL	12 CFU/mL	0.0	0.0
C3	69.5 horas	161 horas+/-12	161 horas+/-12	192 horas	192 horas
C4	40 horas +/- 12	43 horas	47.5 horas	192 horas	192 horas
*Nota: todos los viales negativos en cultivo de sangre fueron negativos y descartados a t=8 días					

Tabla 10B. Valores T₂ obtenidos siguiendo amplificación por PCR y detección de T₂ sobre el precultivo en muestras de sangre sembradas in vitro mostradas más arriba (tiempo de ensayo ~3 horas).

Aislado de C. albicans	100 CFU/mL	25 CFU/mL	12 CFU/mL	0.0	0.0
C1	739.0	409.0	632.5	112.7	112.8
C2	983.2	1014.5	997.6	117.4	114.8
C3	912.7	510.5	113.3	116.2	112.0
C4	807.6	741.2	665.2	119.1	115.9
Valores T ₂ (en msegundos) son la media n=3 con CV menor de 10% para mediciones de replicados					

Tabla 11. Tabla de contingencia usada para calcular sensibilidad/especificidad a >25 células/mL de C. albicans

Positivo	51 (verdadero positivo)	0 (falso negativo)	51 (TP+FN)
Negativo	0 (falso negativo)	35 (verdadero positivo)	35 (FN+TN)
Total	51 (TP+FN)	35 (FN+TN)	86 (N)
Sensibilidad estimada= $100 \times [TP / (TP + FN)] = 100\%$ (95% de confianza intervalo= 93 a 100%)			
Especificidad estimada= $100 \times [TN / (FP + TN)] = 100\%$ (95% de confianza intervalo= 90 a 100%)			

- 5 La estandarización de la cuantificación de CFU a mejorado la sensibilidad y reproducibilidad del ensayo. Los resultados preliminares de 27 botellas de cultivo de sangre se muestran en la Tabla 12. Estos resultados preliminares indican que se obtiene 100% de sensibilidad y especificidad a 10 células/mL o mayor. Se han empezado adicionalmente comparaciones de método utilizando C. krusei. Los resultados preliminares (de 36 viales) se muestran en la Tabla 13. Los resultados indican que hay una sensibilidad/especificidad de 88%/100% a 10 células/mL, o mayor y 100% de sensibilidad/100% de especificidad a 33 células/mL o mayor para Candida Krusei.

Otro cambio importante que fue instituido antes de las nuevas comparaciones de acuerdo de cultivo en sangre fue el empleo de una partícula de microsonda. En este caso la reacciones de aglomeración T2 para la detección de *C. albicans* fueron llevadas a cabo utilizando partículas multifuncionales de *albicans*/*parapsilosis*/*tropicalis* mientras que se detectó *C. krusei* utilizando las partículas multifuncionales de *glabrata*/*krusei*.

5 Tabla 12. Tabla de contingencia usada para calcular sensibilidad/especificidad a >10 células/mL de *C. albicans*

Positivo	18 (verdadero positivo)	0 (falso positivo)	18 (TP+FP)
Negativo	0 (falso negativo)	6 (verdadero negativo)	6 (FN+TN)
Total	18(tp+fn)	6 (FN+TN)	24 (N)
Sensibilidad estimada= $100 \times [TP / (TP + FN)] = 100\%$ (95% de confianza intervalo= 81.4 a 100%)			
Especificidad estimada= $100 \times [TN / (FP + TN)] = 100\%$ (95% de confianza intervalo= 54 a 100%)			

Tabla 13. Tabla de contingencia para calcular sensibilidad/especificidad a >10 células/mL de *Candida krusei*

Positivo	24 (verdadero positivo)	0 (falso positivo)	24 (TP+FP)
Negativo	3 (falso negativo)	9 (verdadero negativo)	12 (FN+TN)
Total	27 (TP+FN)	9(FP+TN)	36 (N)
Sensibilidad estimada= $100 \times [TP / (TP + FN)] = 89\%$ (95% de confianza intervalo= 71 a 98%)			
Especificidad estimada= $100 \times [TN / (FP + TN)] = 100\%$ (95% de confianza intervalo= 66 a 100%)			

10 Establecimiento preliminar de la exactitud clínica: La exactitud clínica se define como la capacidad de discriminar entre dos o más estados clínicos, por ejemplo Candidemia versus no Candidemia. Las gráficas de característica del operador receptor (ROC) describen el rendimiento de la prueba gráficamente ilustrando la relación entre sensibilidad (fracción de verdadero positivo) y especificidad (fracción de verdadero negativo). La exactitud clínica (pares sensibilidad/especificidad) se representa para el espectro entero de niveles de decisión. Utilizando los datos generados a partir de las muestras de sangre entera sembradas con los aislados clínicos de 10 células/ml y 50 células/mL, se generaron dos gráficas de ROC como se muestra en las figuras 50A y 50B. El área bajo la curva se utiliza frecuentemente para cuantificar la exactitud del diagnóstico; en este caso nuestra habilidad para discriminar entre un paciente candidémico con una infección de 10 células/mL o 50 células/mL versus un paciente sin candidemia. A 10 células/mL el área bajo la curva es 0.72 lo que significa que si el ensayo de T₂ fue llevado a cabo en una persona escogida aleatoriamente con candidemia a un nivel de infección de 10 células/mL, hay una oportunidad de 72% de que su valor T₂ sea más alto que el de una persona sin candidemia. La exactitud clínica de la prueba es mucho más alta a 50 células/mL con el área bajo la curva a 0.98. De nuevo con la indicación de que en una persona con candidemia a este nivel de infección, el ensayo de T₂ daría un valor más alto que una muestra de un paciente sin candidemia al 98% de las veces. Esta es una exactitud clínica excelente para niveles de infección de 50 células/mL. Las gráficas de ROC no fueron preparadas para las muestras de 100 células/mL superiores puesto que el área se trasladaría a 100% de exactitud diagnóstica clínica. La exactitud clínica final se determina a partir de muestras de pacientes reales sobre la plataforma clínica.

25 Tiempo de evolución del ensayo: Las etapas de ensayo primario con tiempos estimados son: (i) lisis hipotónica/centrifugación/agitación con perlas (8 minutos); (ii) PCR (120 minutos); (iii) hibridación de amplicón a partículas (30 minutos); (iv) hMAA (10 minutos); y (v) transferencia y lectura (10 segundos). El tiempo del

procesamiento para el ensayo se estima en ~178 minutos (aproximadamente 3 horas), excluyendo la preparación de reactivos y equipos. Este es el flujo de trabajo utilizado para la cuantificación; sin embargo se ha demostrado que el siguiente flujo de trabajo modificado con etapas de PCR e hibridación más cortas producen la misma sensibilidad de detección (véase figura 51) (si bien con una reducción en la cantidad de amplicón generado a partir de algunas especies de *Candida* (esto es, *glabrata*) y por lo tanto un ΔT_2 más pequeño entre enfermos y normales): (i) lisis hipotónica/centrifugación/agitación con perlas (8 minutos); (ii) PCR (70 minutos); (iii) hibridación de amplicón a partículas (30 minutos); (iv) hMAA (10 minutos); y (v) transferencia y lectura (10 segundos). Este flujo modificado genera un TAT de 133 minutos o 2 horas y 13 minutos (y esto es sin migración a un termociclador más rápido).

Conclusiones

Estas pruebas demuestran un ensayo de diagnóstico molecular basado en T_2 actual para *Candidemia* con la siguiente métrica: (i) detección de *Candida albicans* en sangre entera a un rango que varía de 5-1E5 células/mL (5-log); (ii) detección de *Candida krusei* en sangre entera a un rango que varía de 10 células/mL a 1E5 células/mL; (iii) sensibilidad/especificidad de 100%/100% a >25 células/mL; (iv) exactitud de diagnóstico de más de 98% para concentraciones >50 células/mL; (v) compatibilidad de ensayo con sangre entera (sin efectos mayores de matriz observados usando doce muestras de sangre de donantes diferentes); (vi) repetibilidad de mediciones de T_2 (menos de 12% dentro del mismo día y menos de 13% a lo largo de ocho días); y (vii) tiempo de evolución del ensayo total reducida a 2 horas 3 minutos.

Se han probado volúmenes de entrada más altos de sangre humana y se ha encontrado que la lisis hipotónica eficiente se logra con estos volúmenes de sangre más altos; adicionalmente se ha incrementado la reproducibilidad de la detección a 10 células/mL.

La contaminación fue observada en 2 muestras de las 50 titulaciones. Para reducir los problemas de contaminación, las etapas de PCR pueden ser separadas de las etapas de detección. Adicionalmente, pueden utilizarse métodos químicos/bioquímicos para hacer que los amplicones sean inamplificables. Por ejemplo, pueden incorporarse uracilos en el producto de PCR, y puede llevarse a cabo una incubación pre-PCR con uracil N-glicosilasa.

Las ventajas de los métodos de la invención incluyen la capacidad de probar muestras de sangre entera sin separar proteínas y ácidos nucleicos no diana de la muestra. Puesto que no se incurre en pérdidas de ácidos nucleicos diana a través de la purificación de ADN (por ejemplo, corriendo columnas Qiagen después de la lisis y antes de la amplificación da como resultado >10x de pérdidas en sensibilidad, y el uso de sangre entera interfiere con los métodos de detección óptica a concentraciones por encima de 1%), la variabilidad y las desviaciones de muestra a muestra (que pueden ser introducidas por la purificación de ADN) son minimizadas y se maximiza la sensibilidad.

Más del 10% de los pacientes en choque séptico son portadores de *Candida*; este es el tercer patógeno más prevalente después de *S. aureus* y *E. coli*, y hay una tasa de mortalidad de aproximadamente del 50% para pacientes en choque séptico infectados con *Candida*. La *Candida* es la cuarta causa de infecciones adquiridas en el hospital. La identificación rápida de estos pacientes es crítica para seleccionar regímenes de tratamiento apropiado.

35 Ejemplo 18. Ensayo viral

El ADN genómico de CMV fue sembrado en muestras de sangre de donantes saludables libres de CMV, 40 μ L de esta sangre sembrada fue llevada en alícuota a un volumen total de reacción de PCR de 100 μ L. La amplificación fue llevada a cabo utilizando una ADN polimerasa termofílica compatible con sangre entera (T2 Biosystems, Lexington, MA) y cebadores universales de ejemplo que fueron diseñados como sigue: secuencia específica extremo-enlazante C6-CMV de 24 unidades siendo las secuencias exactas las siguientes:

5'-CAT GAT CTG CTG GAG TCT GAC GTT A-3' (SEQ ID NO. 11, sonda de cola universal #1) 5'-GCA GAT CTC CTC AAT GCG GCG-3' (SEQ ID NO. 12, sonda de cola universal #2) 5'-CGT GCC ACC GCA GAT AGT AAG-3' (SEQ ID NO. 13, CMV US8 cebador de avance) 5'-GAA TAC AGA CAC TTA GAG CTC GGG-3' (SEQ ID NO. 14, CMV US8 cebador de reversa)

Los cebadores fueron diseñados de tal manera que las sondas de captura (esto es, el ácido nucleico que decora la partícula magnética) se fusionaría a la región de la unidad 10 (las unidades 10 son diferentes del extremo 5' o 3'). La concentración de cebador final en el tubo de reacción fue de 300 nM y la mezcla maestra de PCR que incluía $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 mM, MgCl_2 3.5 mM, glicerol al 6%, Tricina a 60 mM (pH 8.7)). Se utilizaron cinco tubos de reacción de muestra separados. Las reacciones del ciclo de PCR siguieron una desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos, y cada ciclo consistió de 95°C, 20 segundos; 55°C, 30 segundos; y 68°C, 20 segundos. A 30, 33, 36, 39, y 42 ciclos los tubos de reacción fueron retirados y mantenidos a 4°C. Una vez que todas las muestras estaban listas, se separaron alícuotas de 5 μ L de mezcla maestra de partículas (6xSSC, formamida al 30%, Tween al 0.1%) en el tubo por cada 10 μ L de la muestra amplificada. La mezcla resultante fue bien mezclada y la mezcla desnaturalizada a 95°C durante 3 minutos; la muestra fue hibridada a 45°C durante 1 hora con agitación suave; la muestra fue

entonces diluida a 150 µL con regulador de dilución de partículas (PBS, Tween al 0.1%, BSA al 0.1%), colocada en un magneto hMAA controlado en temperatura durante 10 minutos, y equilibrado a 37°C en un bloque de calentamiento durante 1 minuto: y el tiempo de relajación T₂ para cada una de las cinco muestras separadas fue medido utilizando un lector de MR de T₂ (véase figura 52).

5 Los cebadores fueron diseñados para permitir que las partículas magnéticas cubiertas con sondas de captura para fusionarse a la región de 10 unidades (10 unidades son diferentes a los extremos 5' o 3'), proveyendo partículas con una arquitectura universal para la agregación con cebadores de amplificación específicos.

10 Los resultados provistos en la figura 52 muestran que los métodos de la invención pueden ser utilizados para llevar a cabo PCR en tiempo real y proveer información cuantitativa acerca de cantidad de ácido nucleico diana presente en una muestra de sangre entera.

Ejemplo 19. PCR en tiempo real

15 Los resultados previos mostraron que cuando hay presentes partículas en la reacción de PCR la producción de amplicón fue inhibida. Se generó la hipótesis de que moviendo las partículas al lado del tubo de reacción durante la termociclización se permitirá la producción de amplicón. Se diseñó un separador magnético simple/inserto de bloque de PCR (figura 53) para mantener las nanopartículas sobre las paredes laterales durante la reacción de PCR, minimizando así la interferencia y la exposición de las partículas a los componentes de reacción de PCR. Al retirar el campo magnético, las partículas pueden ser resuspendidas completamente en la mezcla de reacción.

20 En un experimento, se probó la rata a la cual las partículas serian secuestradas al lado del tubo y retornadas a la solución. En este experimento, 100 µL de la mezcla de partículas de *C. albicans* (3' y 5') en 1x TE (~50 msegundos de línea base T₂ desaglomerada) sufrieron tres veces el proceso de aglomeración/desaglomeración a 95°C. Esto fue seguido por el siguiente protocolo

1. vórtex, incubación a 37°C durante 1 minuto, medición de T₂;
2. calentamiento a 95°C durante 5 minutos sobre el inserto de PCR magnético;
3. incubación a 37°C durante 1 minuto, medición de T₂;
- 25 4. vórtex 15 segundos, incubación a 37°C durante 1 minuto, medición de T₂; y
5. ir a la etapa 2.

Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 14 a continuación.

Ciclo #	1	2	3	4				
Tubo 1	147.1	150.8	154.9	140.9	T2 desaglomerado			
	2198.6	1965.6	2161.4		T2 aglomerado a 95°C			
% incremento T ₂	1494.2	1303.5	1395.1				Promedio %	1397.6

Ciclo #	1	2	3	4				
Tubo 2	143.5	147.4	150.4	144.2	T2 desaglomerado			
	2240.7	2141.3	2086.5		T2 aglomerado a 95°C			
% incremento T2	1561.4	1452.9	1386.9				Promedio %	1467.1

Como se muestra en la Tabla 14, la aglomeración de nanopartículas completamente reversibles se demostró a 95°C al utilizar el separador magnético probado. Las partículas son estables a 95°C durante al menos 3 ciclos de aglomeración/desaglomeración.

5 A continuación se probó la eficiencia de PCR en la presencia de nanopartículas en la solución de reacción. El PCR fue llevado a cabo bajo dos condiciones: (1) las partículas están completamente dispersas en solución; y (2) las nanopartículas están concentradas en las paredes laterales del tubo de prueba de PCR utilizando el inserto magnético.

10 Se diseñaron tres reacciones de PCR (con nanopartículas concentradas en la pared del tubo de prueba; completamente dispersas en solución; y sin nanopartículas) usando ADN genómico de *C. albicans* como material de partida. La amplificación exitosa del ADN diana fue validada utilizando electroforesis en gel. Se utilizaron partículas Seramag cubiertas con sonda de captura.

15 Se diseñaron reacciones de PCR asimétricas (4:1) utilizando mezcla de PCR prehecha y sin copias de ADN genómico de *C. albicans* como material de partida. Se agregó mezcla de partículas de captura de *C. albicans* (3' y 5') en 1x TE a las reacciones (1) y (3) (línea base ~150 msegundos). La reacción de control (2) no tenía nanopartículas agregadas (figura 54).

20 No se observó diferencia en la formación de productos en PCR cuando había nanopartículas presentes en solución (dispersada en solución o concentradas sobre las paredes laterales del tubo mediante campo magnético) durante la reacción de PCR. Sin embargo, las nanopartículas modificadas con zonas de captura no interfieren con el PCR. Se generaron cantidades comparables de producto en las reacciones con y sin nanopartículas presentes en solución como fue evidenciado por la electroforesis en gel. También la concentración magnética de las nanopartículas sobre las paredes laterales del tubo durante el proceso de PCR no tiene efecto sobre el PCR.

Ejemplo 20. Controles internos para *C. albicans*

25 Una variedad de impurezas y componentes de la sangre entera pueden ser inhibidores para la fusión de la polimerasa y el cebador. Estos inhibidores pueden llevar a la generación de falsos positivos y bajas sensibilidades. Para asegurar que los especímenes clínicos son amplificados y detectados exitosamente, el ensayo puede incluir un ácido nucleico de control interno que contiene regiones de enlazamiento al cebador idénticas a los de la secuencia diana. El ácido nucleico diana y el control interno se seleccionan de tal manera que cada uno tiene una región de enlazamiento única a la sonda que diferencia el control interno del ácido nucleico diana. El control interno puede ser un control de inhibición que esta diseñado para coamplificar con el ácido nucleico diana que está siendo detectado. El fallo del control de inhibición interno para ser amplificado se evidencia de un fallo de reactivo o error de proceso. Pueden diseñarse cebadores universales de tal manera que la secuencia diana y la secuencia de control interno son amplificadas en el mismo tubo de reacción. Así, al usar este formato, si el ADN diana es amplificado pero el control interno no lo es se asume entonces que el ADN diana está presente en una cantidad proporcionalmente mayor que el control interno y el resultado positivo es valido puesto que la amplificación del control interno es innecesaria. Si, por el otro lado, ni el control interno ni la diana son amplificados se asume entonces que ha ocurrido inhibición de la reacción de PCR y que la prueba para esa muestra particular no es valida.

40 La secuencia de *Candida albicans* ya amplificada y detectada fue examinada para su uso en la generación de un control interno. Las secuencias de cebador universal fueron retiradas extremo 5' y 3'. La secuencia interna residual fue sometida a un generador de secuencias aleatorio y se generó una secuencia aleatoria. Las secuencias del cebador universal fueron reemplazadas en los extremos y la secuencia de control interno completa fue clonada en pCR2.1-TOPO y se verificó la secuencia.

Al diseñar estos controles internos, los siguientes criterios y características para uso en ensayos de PCR fueron empleados: 1) el ADN diana y de control interno compartieron los mismos cebadores; 2) el ADN de control interno y la diana son fácilmente distinguibles (esto es, diferentes sondas de captura); 3) las eficiencias de amplificación sobre la diana y el control interno han sido probadas y son aceptables; 4) la fuente del control interno es un ADN plásmido que porta la secuencia de control interno clonada; 5) el control interno es detectado por hibridación dependiente de la secuencia; 6) el plásmido de control interno está altamente purificado; 7) la concentración del control interno es determinada por titulación; 8) el plásmido de control interno es agregado a la mezcla de PCR para asegurar una distribución igual a todos los tubos de PCR; 9) se ha determinado la cantidad de control interno en los tubos de reacción de ensayo es de 100-1000 copias/reacción y está concentración ha sido determinada como la cantidad más baja que todavía provoca una amplificación a través de la señal. Véase Hoofar et al., J. Clin. Microbiol. 42:1863 (2004).

El control de inhibición interno para el ensayo de *Candida* fue diseñado para coamplificar con los cebadores de PCR Pan *Candida* y contiene una secuencia de intervención única de longitud y composición en bases similar a la de las especies de *Candida*. La secuencia de intervención fue desarrollada aplicando un algoritmo de aleatorización de secuencia a la secuencia del amplión de *C. albicans*. Cuatro secuencias aleatorizadas fueron entonces caracterizadas termodinámicamente y bioinformáticamente. Se llevó a cabo una búsqueda de nucleótidos megaBLAST para cada secuencia utilizando tanto las bases de datos genómicas humanas + transcripto así como la base de datos nr. No se identificaron alineamientos significativos con las cuatro secuencias de interrogación en ninguna base de datos. Cada secuencia fue sometida entonces a análisis UNAFold para determinar el grado de estructura secundaria presente en la concentración de hibridación de catión monovalente (600 mM) una temperatura de 60 grados centígrados. Se excluyeron dos secuencias en este punto debido a la presencia de tallos extensivos bajo estas condiciones de hibridación. Dos fueron caracterizadas posteriormente para determinar si las sondas de captura podrían ser diseñadas complementarias a los extremos 5' y 3' de la cadena amplificada en exceso lo que sería impedido por tramos poli-G, y tienen bajas probabilidades de formar homo y heterodímeros. Una secuencia satisfizo todos los criterios y fue ordenada como un oligonucleótido sintético purificado PAGE y su respectivo complemento de IDT Technologies (Coralville, IA). La secuencia del control interno que será amplificada en exceso es:

5- GGC ATG CCT GTT TGA GCG TCC TGC ATC ATA CTG AAA TAG ATC CTT CGA
CAA CCT CGG TAC ACT GGG AAC AAG GCC TCA AAC ATT GAT GCT CGA CTA CAC GTA
GGG CAATGC GTC TTG CTA GAA GCG AAA TCT GTG GCT TGC TAG TGC AAG CTG GTC
GGC GTA TTA TTC CAA CCC GCT GAA CTT AAG CAT ATC AAT AAG CA-3 (SEQ ID NO. 15)

La secuencia complementaria fusionada es:

5- GCT TAT TGA TAT GCT TAA GTT CAG CGG GTT GGA ATA ATA CGC CGA CCA
30 GCT TGC ACT AGC AAG CCA CAG ATT TCG CTT CTA GCA AGA CGC ATT GCC CTA CGT
GTA GTC GAG CAT CAA TGT TTG AGG CCT TGT TCC CAGTGT ACC GAG GTT GTC GAA
GGATCT ATT TCA GTA TGA TGC AGG ACG CTC AAA CAG GCATGC CA -3 (SEQ ID NO. 16)

5 µM del dúplex fusionado en 2x SSC fue enviado a SeqWright para subclonar y secuenciar. Los dúplex fusionados contenían sobranes de adenosina 3' para facilitar la clonación a un vector de clonación TA. Este constructo fue clonado en PCR2.1-TOPO. Por transformación, se seleccionaron 5 clones y se secuenciaron para confirmar la presencia del inserto correcto. Por verificación del inserto clonado correcto, el ADN de plásmido minipreparado fue digerido con EcoRV y HindIII y el inserto fue subclonado en pBR322. A partir de esta transformación, se seleccionaron 5 transformantes y el inserto fue verificado a través de secuenciación. Dos huéspedes de *E. coli* que portaban el pBR322-IC fueron congelados en glicerol al 30% + LB amp. Se llevó a cabo una maxipreparación de plásmido utilizando el Qiagen y produjeron ~1 mg de ADN de plásmido purificado.

Las sondas de captura fueron diseñadas para hibridar anidadas a las secuencias de cebador de PCR de Pan *Candida*. Una sonda de captura aminada en 3' con un enlazante T-9 fue diseñada para complementariedad con el extremo 5' de la cadena amplificada en exceso. Una sonda de captura aminada en 5' con un enlazante C12 T-9 fue diseñada complementaria al extremo 3' de la cadena amplificada en exceso. Estas secuencias se muestran a continuación:

45 GGT TGT CGA AGG ATC TAT TTC AGT ATG ATG CAG-TTT TTT TTT-3'Amino (SEQ ID NO. 17)

5'Amino-C12-TTT TTT TTT- TGG AAT AAT ACG CCG ACC AGC TTG CAC TA (SEQ ID NO. 18)

Las temperaturas de fusión predichas (Allawi, 1997) fueron 75 y 78°C, respectivamente.

Ejemplo 21. gMAA rotatorio.

5 Se diseñaron tres configuraciones de gMAA rotatorias prototipo, construidas y probadas con comparación a la gMAA convencional basada en placa (véase la figura 56A). Las tres configuraciones incluían exposiciones a campo magnético variables-lado-fondo; lado-nula y fondo-nula. La gMAA basada en placa utilizada para la comparación es la lado-fondo estándar. Se evaluó el rendimiento funcional del ensayo (enlazamiento y aglomeración no específicos) utilizando el sistema de ensayo de aglomeración de creatinina. Las partículas derivadas con anticuerpo de creatinina fueron mezcladas con suero diluido 1:5 y aglomerante de creatinina dextrano. El aglomerante fue probado a 6 concentraciones para proveer una curva de calibración. Cada nivel de concentración fue probado en triplicado. El T2 de las muestras sin aglomerante fue medido antes y después del gMAA para establecer enlazamiento no específico. Se llevó a cabo gMAA a temperatura ambiente para un total de 12 minutos con 1 minuto de residencia en las estaciones de magneto.

Con respecto al enlazamiento no específico, todas las configuraciones rotatorias produjeron resultados aceptables (<10% diferencia) y fueron comparables a la gMAA de placa convencional.

15 Con respecto a la formación de agregados, todos los dispositivos gMAA rotatorios produjeron agregación. La configuración lado-fondo rotatoria proveyó la señal T2 más alta una concentración de aglomerante dada, seguida por la configuración de placa lado-fondo de comparación. La configuración lado-nula rotatoria provee una señal equivalente a la placa de lado-fondo; y la fondo-nula produce la señal más baja (véase figura 56B).

Ejemplo 22. Ensayo de Candida y datos clínicos

20 Una prueba de diagnóstico molecular rápida, exacta y reproducible fue desarrollada para la detección de cinco especies de Candida directamente en sangre humana con un límite de detección (LOD) de 10 células/mL y un tiempo de resultado de menos de 2 horas. El rendimiento clínico del ensayo fue determinado utilizando 32 especímenes clínicos ciegos y en este estudio se observó una concordancia de 100% positivo y 100% negativo en cultivos de sangre mientras que se identificaba exactamente la especie de Candida causante en un 100% de las muestras de pacientes candidémicos. Aplicamos adicionalmente el ensayo a especímenes de sangre extraídos de pacientes positivos por Candida y se observó un descenso en la detección de Candida concordante con el transcurso del tiempo del tratamiento antifúngico. Este método diagnóstico es rápido, apropiado para la automatización, y ofrece a los médicos la oportunidad de detectar múltiples patógenos humanos con especímenes biológicos complejos.

30 Relaxómetro de resonancia magnética

Se diseñó un sistema de resonancia magnética (MR) compacto y se construyó para mediciones de relajación T2 precisas con el fin de llevar a cabo el ensayo previsto bajo las condiciones descritas. Este sistema se mantuvo a 37°C a través de control de temperatura y contiene un magneto permanente de samario cobalto de aproximadamente 0.5 T, correspondiente una frecuencia de protones de operación de 22-24 MHz. Todos los componentes MR estándar: sonda de radiofrecuencia, preamplificador de ruido bajo y electrónica transmisora, tablero de espectrometría, así como el hardware de control de temperatura están empacados en el sistema. El sistema utiliza entrada de energía AC estándar y se conecta a un ordenador externo a través de Ethernet. Una interfaz de usuario gráfica amigable permite que s usuarios definan los parámetros experimentales.

40 El sistema ha sido diseñado para aceptar muestras en tubos de PCR estándar de 0.2 ml. La electrónica así como la bobina fueron optimizados para mejorar la precisión de la medición de los volúmenes de muestra aplicables, permitiendo alcanzar un rendimiento en barrido simple para ejecutar CVs en T2 de menos de 0.1%. La variabilidad de instrumento a instrumento está por debajo de 2% con requerimientos de tolerancia mínimos sobre los componentes del sistema y sin calibración.

Conjugación y caracterización del sensor de nanopartículas

45 Partículas superparamagnéticas de óxido de hierro carboxiladas de 800 nm, consistentes de numerosos nanocristales de óxido de hierro embebidos en una matriz polimérica que incluye un diámetro de partícula total de 800 nm (véase Demas et al., New J. Phys. 13:1 (2011)), fueron conjugadas a oligonucleótidos de ADN aminados utilizando química de carbodiimida estándar. Las nanopartículas derivadas de ADN fueron almacenadas a 4°C en 1x Tris-EDTA (pH 8), Tween-20 al 0.1%. La concentración en hierro de los conjugados de nanopartículas fue medida resolviendo la partícula con HCl 6 M seguido por la adición de clorhidrato de hidroxilamina y 1,10 O-fenantrolina y detección espectrofotométrica subsecuente como lo describe Owen et al., J. Immunol Methods, 73:41 (1984). Las partículas derivadas con oligonucleótidos fueron sometidas entonces una prueba de comportamiento funcional llevando a cabo reacciones de aglomeración inducidas por hibridación utilizando dianas de oligonucleótidos

sintéticas diluidas idénticas en secuencia a las secuencias ITS2 fúngicas de las cinco diferentes especies de *Candida* dentro de un regulador de hibridación de fosfato de sodio 4xSSPE (NaCl 600 mM, fosfato de sodio 40 mM, EDTA 4 mM). La reversibilidad de la reacción de aglomeración fue confirmada sometiendo las reacciones aglomeradas una etapa de desnaturalización por calor a 95°C, llevando a cabo una medición T2, e hibridación repetida a 60°C seguida por una segunda medición de T2.

Diseño de la sonda de captura de cebador de PCR y nanopartícula

Los cebadores de PCR Pan *Candida* universales fueron diseñados complementarios a secuencias de ARNr 5.8S y 26S que amplifican la región espaciadora 2 transcrita de intervención (ITS2) del genoma de *Candida*. Se diseñó un par de sondas de captura de oligonucleótidos complementarias a las secuencias anidadas en los extremos 5' y 3' respectivamente del producto de PCR amplificado asimétricamente. La sonda de captura que hibrida al extremo 5' del amplicón fue aminada en 3' mientras que la sonda de captura que hibrida al extremo 3' del amplicón fue aminada en 5'. Se agrega un enlazante poli-T (n=9 a 24) entre el grupo amino y la primera base de nucleótidos de la secuencia de sonda de captura. Los cebadores si son los de captura de PCR purificados por HPLC fueron procurados por IDT Technologies (Coraville, IA).

Diseño del control de inhibición

Se diseñó un control de inhibición de PCR para coamplificar con las especies de *Candida* y monitorizar los factores dentro de los especímenes de sangre entera que inhiben la amplificación por PCR. Se diseñó una plantilla sintética que contiene 30 secuencias de flanqueo de nucleótidos idénticas en secuencia a las regiones 5.8S y 26S del operón ARNr de *Candida*. La secuencia interna dentro de esta plantilla consiste de un amplicón de *C. albicans* revuelto aleatoriamente. Las sondas de captura fueron diseñadas complementarias a la cadena amplificada en exceso dentro de las reacciones de PCR asimétricas de *Candida*. Los ultrámeros de oligonucleótidos sintéticos fueron procurados por IDT (Coraville, IA) idénticos en secuencia al control de inhibición. Los oligonucleótidos fueron fusionados una concentración de 5 µM en 2xSSC y clonados en pBR322 digeridos con HindII/EcoRV (NEB, Ipswich, MA) usando métodos estándar. La transformación fue llevada a cabo a través de electroporación de 1 µL de la reacción de ligación en células k12 de *E. coli* electrocompetentes y los transformantes fueron sembrados sobre placas de agar Luria Bertani (LB) que contenían 100 µg/mL de ampicilina. Se seleccionaron dos colonias resistentes a la ampicilina y se cultivaron en 2 mL de medio LB ampicilina. Se llevaron a cabo minipreparaciones de plásmido por mapeo con enzima de restricción para confirmar los clones contenidos en el inserto correcto. La secuenciación dideoxi de Sanger fue llevada a cabo entonces (SeqWright, Houston, TX) para confirmar la clonación del control y se llevaron a cabo maxipreparaciones de ADN sobre clones que portaban insertos correctos. Las titulaciones del control de inhibición en la presencia de concentraciones crecientes de todas las 5 especies de *Candidas* fueron llevadas a cabo para determinar la concentración más baja de control de inhibición que podría ser detectada reproduciblemente. La confirmación de la función del control de inhibición fue demostrada llevando a cabo reacciones de PCR en la presencia de titulaciones de interferentes de PCR conocidos (SDS, heparina, etanol) y demostrando que la amplificación del control estaba inhibida.

Cultivo de *Candida* y preparación de muestras sembradas *in vitro*

MYA-2876, ATCC 2001, ATCC 24210, ATCC 66029, y ATCC 22019 fueron las cepas de referencia de laboratorio *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, y *C. parapsilosis* (ATCC, Manassas, VA) utilizadas para preparar especímenes de sangre entera sembrados *in vitro*. Las levaduras fueron cultivadas sobre placas de agar levadura peptona dextrosa (YPD) e incubadas a 25°C. Se seleccionaron colonias individuales y se suspendieron en solución salina regulada con fosfato (PBS). Las especies fueron verificadas a través de secuenciación ITS2 en Accugenix (Newark, Delaware). Las células fueron sometidas entonces a centrifugación a baja velocidad (3000 g durante 2 minutos) y lavadas tres veces con PBS fresco. Una alícuota de las células lavadas con PBS fue diluida entonces en diluyente ISOTON II (Beckman Coulter, Brea, CA) dentro de una Accuvette de 20 mL y las células fueron cuantificadas sobre un Multisizer 4 Coulter Counter (Beckman Coulter, Brea, CA) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Las células fueron diluidas entonces en serie a concentraciones que variaban de 500 a 5 células/100 µL de regulador de PBS. Se obtuvo sangre humana fresca de donantes saludables por recolección estéril en tubos vacutainer K2EDTA (BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ) de ProMedX. Típicamente se sembraron cinco mililitros de sangre humana con 100 µL de células de *Candida* cuantificadas. Las muestras de sangre entera sembradas son utilizadas inmediatamente en el ensayo.

PCR de sangre entera

Se llevó a cabo la lisis de eritrocitos con 1 mL de la muestra de sangre entera utilizando los métodos descritos previamente (véase Bramley et al., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 241:752 (1971) y Wessels JM, *Biochim Biophys Acta.*, 2:178 (1973)), una centrifugación a baja velocidad se lleva a cabo y el sobrenadante fue retirado y descartado. Cien µL de regulador Tris EDTA (TE) pH 8.0 que contenía 1500 copias del control de inhibición fue agregado entonces a las pellas recolectadas y la suspensión fue sometida a lisis mecánica (véase Garver et al., *Appl. Microbiol.*, 1959. 7:318 (1959); Hamilton et al., *Appl. Microbiol.*, 10: 577 (1962); y Ranhand, J.M.,

Appl. Microbiol., 28:66 (1974)). Cincuenta μ L del lisado fueron agregados entonces a 50 μ L de una mezcla maestra de PCR asimétrica que contenía un desoxinucleótido, cebadores de PCR y una ADN polimerasa termofílica compatible con sangre entera (T2 Biosystems, Lexington, MA). Se llevó a cabo la termociclización utilizando los siguientes parámetros de ciclo: desnaturalización por calor a 95°C durante 5 minutos, 40 ciclos consisten de una etapa de desnaturalización por calor de 30 segundos a 95°C, una segunda etapa de fusión a 62°C durante 20 segundos, y una etapa de elongación a 62°C durante 30 segundos, y una extensión final a 68°C durante 10 minutos.

Ensayos de aglomeración inducida por hibridación

Quince microlitros de la reacción de amplificación resultante fueron separados en alícuotas en tubos de PCR de 0.2 mL de pared delgada e incubados en un regulador de hibridación de fosfato de sodio (4xSSPE) con pares de nanopartículas derivadas con oligonucleótidos una concentración de hierro final de 0.2 mM por reacción. Las reacciones de hibridación fueron incubadas durante 3 minutos a 95°C seguidas por incubación durante 30 minutos a 60°C en un dispositivo de incubación con agitación una velocidad de agitación de 1000 rpm (Vortemp, LabNet International). Las muestras hibridadas fueron colocadas entonces en un bloque de calentamiento a 37°C para equilibrar la temperatura a la del lector de MR durante 3 minutos. Cada muestra es sometida entonces una etapa de vórtex de 5 segundos (3000 rpm) e insertada en el lector MR para la medición de T2.

Protocolo de recolección de muestras de pacientes con Candida

Los descartes de especímenes de sangre que han sido extraídos en vacutainers K2EDTA (BD) el mismo día como especímenes extraídos para cultivo en sangre (T=0) fueron obtenidos del laboratorio de hematología clínica del Massachusetts General Hospital (MGH) o del Houston University Hospital. Los especímenes fueron recolectados y catalogados de pacientes que tenían resultados positivos en cultivos de sangre. Las muestras fueron almacenadas dentro del vacutainer original a -80°C y la recolección de especímenes ciega fue embarcada durante la noche en hielo seco a T2 Biosystems. Los protocolos de recolección de muestras clínicas fueron revisados por los Human Research Committees apropiados.

Análisis estadístico

Para cada especie, el límite de detección fue determinado con el uso de la modelación Probit. Para cada especie, se calcularon el nivel de detección a 90% e intervalos de fiducia al 95%. Cada señal T2 bruta fue transformada en T2_mseg sobre la línea base del ensayo. Se utilizó SAS v. 9.1.3 (Cary, NC) en los cálculos estadísticos para el análisis del límite de detección, concordancia de los especímenes sembrados con cultivo, sensibilidad y especificidad en los especímenes clínicos y ensayos seriados para medir la eliminación de Candida.

Concordancia de la detección por MR de T2 de Candida con cultivo de sangre

El estándar de oro actual para el diagnóstico de Candida es cultivo de sangre. Se prepararon especímenes de sangre entera de donantes saludables sembrado *in vitro* utilizando cepas de referencia de laboratorio para *C. albicans* y *C. krusei* y aislados clínicos de *C. albicans* a concentraciones de 0,33, y 100 células/mL. Se inocularon viales de cultivo de sangre BACTEC pediátricos (BACTEC Peds Plus/F vials, Beckton Dickenson) con una alícuota de los especímenes sembrados *in vitro* evaluados por T2MR. Los viales para cultivo de sangre inoculados con células de *Candida* fueron positivos por cultivo de sangre en el día 8 en todos los casos. En total se inocularon 133 botellas de cultivo de sangre fueron inoculadas con 90 muestras de sangre sembradas con Candida (inoculo de 33 células/mL) o 43 muestras de sangre negativas. Se observó noventa y ocho por ciento de concordancia positiva y 100% de concordancia negativa entre T2MR y los cultivos de sangre.

Datos de especímenes clínicos

Se obtuvieron de pacientes especímenes de sangre entera K2 EDTA para probar el comportamiento clínico del ensayo de Candida T2MR. Los pacientes presentaban síntomas de septicemia y se extrajo sangre para cultivo. Las muestras de sangre fueron almacenadas a 4°C en el laboratorio de hematología y seleccionadas para T2MR si el resultado fue cultivo positivo para Candida, cultivo de sangre positivo para bacteriemia o cultivo de sangre negativo que representará mejor el espectro de muestras que serían analizadas en la plataforma. Catorce de las muestras eran de pacientes candidémicos, ocho de pacientes bacterémicos y diez de pacientes negativos en el cultivo sanguíneo. La figura 57 muestra los valores T2 medidos para todas las 32 muestras de pacientes. Se llevó a cabo una reacción de PCR sencilla utilizando 1 mL de cada espécimen. Se agregaron 750 copias del control de inhibición interno a cada reacción de PCR. Entre las muestras negativas para Candida la señal de control interno (IC) promedio fue 279 ms con un CV entre los 18 especímenes negativos de Candida de 25%. En ningún caso la señal de IC estuvo por debajo del umbral de decisión (128 ms, 5 desviaciones estándar agregadas a las T2 promedio medidas en reacciones de detección negativa de Candida) sugiriendo que todos los negativos eran verdaderos negativos y no estaban presentes sustancias inhibitoras con las muestras de sangre entera. Las reacciones de detección fueron multiplexadas con base en las guías de IDSA, de tal manera que tres resultados fueron reportados

- como sigue: *C. albicans* o *C. tropicalis* positivo; *C. krusei* o *C. glabrata* positiva; y *C. parapsilosis* positiva. El T2 promedio medido en los especímenes negativos de *Candida* es 114 ms, la CV para estas mediciones fue 2.4%, y el umbral de decisión (calculado por la adición de cinco veces la desviación estándar medida en las reacciones de detección negativas de *Candida* más el T2 promedio medido en especímenes negativos de *Candida*) fue 128 ms.
- 5 En especímenes positivos para *Candida*, la señal IC fue suprimida debido a la competición por los reactivos de amplificación. En casos de *C. albicans* alta, se observó la misma reactividad cruzada para la detección con las partículas de *C. parapsilosis* (por ejemplo, muestra de paciente #3) sin embargo esta señal no está significativa por encima del corte (20 ms) y no lleva una diferencia en la terapia antifúngica puesto que tanto *C. albicans* como *C. parapsilosis* son susceptibles a fluconazol.
- 10 El T2MR identificó exitosamente catorce muestras de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, o *C. krusei* las cuales fueron confirmadas positivas por cultivo de sangre seguido por la tarjeta bioquímica Vitek 2. Adicionalmente, la detección fue específica para *Candida* spp., puesto que las muestras de pacientes bacterémicos con *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, coagulasa negativa de *Staphylococcus*, o *Streptococcus* alfa hemolítico permanecieron negativas.
- 15 Las pruebas extraídas en serie fueron probadas de dos pacientes que exhibieron síntomas que sugerían candidemia, tales como fiebre persistente después de recibir antibióticos para demostrar la utilidad del ensayo en la monitorización de la eliminación de *Candida*. Las extracciones de sangre para T2MR ocurrieron el mismo día de las extracciones de sangre para el cultivo sanguíneo. Cultivos para seguimiento fueron extraídos entonces a lo largo del transcurso de nueve días para el paciente A y en el transcurso de cinco días para el paciente B. La figura 3 muestra
- 20 los resultados obtenidos con el método T2MR para ambos pacientes. El paciente A tenía sangre extraída para cultivo (t=0), fue diagnosticado con candidemia y recibió la administración intravenosa de micafungina (*C. glabrata*) al día siguiente a través de cultivo sanguíneo (t=1). Los especímenes de sangre entera fueron probados con T2MR en t=0 días, t=3 días, t=7 días, t=8 días, t=9 días. Los valores de T2MR obtenidos fueron 320 ms a t=0, 467 ms a t=3, 284 ms a t=7, 245 ms a t=8, y 117 ms (por debajo del corte) para t=9. Extracciones de cultivos sanguíneos
- 25 subsecuentes en los días 3 y día 8 tomaron 24 y 48 horas para dar cultivo positivo, respectivamente. Una serie de especímenes de extracción seriada fueron obtenidos del paciente B. Se detectó correctamente la *C. albicans* con T2MR en el día 0 (T2=426 ms). El cultivo sanguíneo resultó positivo en el día 2 con identificación subsecuente de *C. albicans*. Dos días después de que el paciente recibió la administración de micafungina, fue evidente un descenso agudo en T2MR de *C. albicans* (T2=169 ms) y tres o más días después de que se inició el tratamiento antifúngico no se observó *C. albicans* detectable. Todas las pruebas fueron completadas en un tiempo de procesamiento total de 2
- 30 horas, utilizando un termociclador PCR de bloque rápido y un procedimiento de termociclización de tres etapas que no fue optimizado en cuanto a velocidad.

Conclusiones

- 35 Hemos desarrollado y validado un ensayo de *Candida* T2MR en sangre entera capaz de detectar las especies clínicamente importantes de *Candida* que resaltan las ventajas de la detección no óptica para eliminar la purificación de analitos permitiendo así tiempos de análisis más rápidos y resultados más reproducibles. Se utilizó PCR asimétrico para amplificar específicamente la región ITS2 del genoma de *Candida* directamente en sangre entera para alcanzar sensibilidades de detección clínicamente relevantes. Se desarrolló un método de detección de T2 en el cual
- 40 dos grupos de nanopartículas derivadas con oligonucleótidos hibridan a cada extremo del amplicón de cadena sencilla. Los amplicones sirven así como uniones interpartícula e inducen la aglomeración de nanopartículas que generan un cambio medible y reproducible en la relaxometría (T2) rotación-rotación de los protones en las moléculas de agua. Hemos construido e implementado adicionalmente un control de inhibición interna para monitorizar los inhibidores de PCR que pueden estar presentes en las muestras de pacientes.

- 45 El ensayo fue evaluado utilizando cepas de referencia y aislados clínicos cuantificados por Coulter Counter y sembrados en sangre entera de donantes saludables. La repetibilidad del ensayo fue medida utilizando sangre sembrada con *C. albicans* (misma muestra, mismo operador, mismo instrumento) en el transcurso de 10 días y observamos CVs menores de 12.8% (n=30) en el rango de respuesta dinámico completo (0 a 1E5 células/mL). La sensibilidad analítica y el límite de detección de ≤ 10 células/mL fueron medidos para *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, y *C. parapsilosis* y >10 células/mL con 92.5% detectados a 10 células/mL para *C. glabrata*. Aunque no está
- 50 demostrado, una causa posible de los LoD más alto observados en *C. glabrata* puede ser que el número de copias del operón de ADN es reducido en *C. glabrata* en comparación con las otras especies de *Candida* spp investigadas puesto que es sabido que *C. glabrata* existe en la naturaleza como un haploide mientras que las otras especies de *Candida* son diploides. La concordancia con el estándar de oro para el diagnóstico de *Candida* fue alta con el 98% de concordancia positiva y 100% negativa observada para 133 muestras de *C. albicans* y *C. krusei* sembradas *in vitro*. Debe anotarse que el tiempo hasta el resultado fue de 2 horas para la prueba T2 de *Candida* mientras que el
- 55 tiempo para obtener resultado positivo en el cultivo de sangre es típicamente dos días para *C. albicans* y ~1 día (18-24 horas) para *Candida krusei*.

Los 32 especímenes clínicos son similares a los resultados de los cultivos de sangre. Los T2 medidos estaban por encima de un corte establecido en cinco desviaciones estándar de los valores T2 medidos en los especímenes

negativos de *Candida* agregados a su promedio. En este caso el umbral fue 128 ms (n=54). En ningún caso se observó inhibición de la reacción de PCR, puesto que el control interno fue detectado en todas las 32 reacciones con una señal IC reducida observada en pacientes positivos de *Candida* y un CV de 25% (T2 medio de 279 ms) en los especímenes negativos a *Candida* (n=18). El ensayo es específico para la detección de *Candida* y no se observó reactividad cruzada con ninguno de los especímenes bacterémicos (n=8). Los especímenes positivos en *Candida* fueron identificados con exactitud, las *Candida* spp., causantes fueron identificadas con exactitud y todo dentro de un tiempo de respuesta de 2 horas.

El potencial de este ensayo para proveer una detección rápida de la eliminación de *Candida* después de la administración de terapia antifúngica también fue demostrado. Se hizo extracción a dos conjuntos de muestras de pacientes y se sometieron a T2MR (figura 3). Se observaron señales T2 de moderadas a altas para *C. glabrata* en un paciente A en el día 0 y en el día 3 con agentes antifúngicos administrados en el día 1. Se observó un descenso en la señal de *C. glabrata* en los días subsecuentes sin ninguno detectable después de ocho días de tratamiento antifúngico. Una señal fuerte de *C. albicans* fue medida para el paciente B en el día 0, y se observó una declinación aguda (delta T2 de 306 ms) en la señal T2 un día después de la administración antifúngica sin ninguna señal detectable después de dos días de tratamiento antifúngico. Aunque son preliminares, estos datos sugieren que la prueba podría ser utilizada para monitorizar la efectividad del tratamiento y la eliminación de *Candida* en forma de tiempo real.

En conclusión hemos desarrollado una prueba sensible y específica para el diagnóstico de candidemia causada por las cinco especies de *Candida* más comúnmente encontradas. Los resultados clínicos tempranos fueron alentadores y muestran que un diagnóstico e identificación de especies rápidos son alcanzables y podrían no solamente facilitar un tratamiento temprano con el antifúngico apropiado sino también proveer un medio para monitorizar la eliminación de *Candida*. Anticipamos que este método de T2MR basado en nanopartículas puede ser aplicado ampliamente al diagnóstico de enfermedades en una variedad de tipos de especímenes y patógenos.

Ejemplo 23. Ensayo de tacrolimus utilizando Fab.

El ensayo de tacrolimus es un inmunoensayo competitivo homogéneo llevado a cabo utilizando una muestra de sangre entera con EDTA extraída para liberar tacrolimus de las células de los glóbulos rojos y proteínas enlazantes. Un componente clave del ensayo es la alta afinidad del anticuerpo de tacrolimus, un método confiable de extracción y una mejora en los sistemas reguladores seleccionados para promover la agregación específica y minimizar la agregación no específica. Esta versión del ensayo utiliza un Fab monovalente recombinante con alta afinidad por tacrolimus.

El ensayo de tacrolimus fue establecido utilizando calibradores de sangre entera, controles de sangre entera comercial, muestras sembradas y muestras de pacientes.

Los reactivos del ensayo incluyeron: (a) partícula de 244 nm conjugada con BSA secuencial, y un anticuerpo Fab monovalente y bloqueado con mPEG-tiol + NEM (la partícula es diluida a Fe 0.2 mM en regulador de ensayo); (b) tacrolimus C22 modificado conjugado a BSA en tacrolimus una relación de entrada de BSA de 10:1 (diluida a 600 ng/ml en regulador de ensayo); (c) regulador de ensayo de glicina 100 mM pH 9.0, BSA al 1%, Tween 80 al 0.05%, NaCl 150 mM, y Proclin al 0.05%; y (d) reactivo de extracción de MeOH al 70%, ZnSO₄ 60 mM en dH₂O.

Se prepararon calibradores de sangre entera utilizando Sigma FK506 Stock 1 mg/ml en MeOH al 100%. La sangre entera con EDTA fue sembrada a niveles variables con la solución de tacrolimus. La sangre sembrada fue incubada a 37°C con mezcla suave y luego almacenada durante la noche a 4°C antes de tomar alícuotas y congelar. Los niveles de diana fueron 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, y 250 ng/ml de tacrolimus. Los calibradores fueron suministrados a un laboratorio externo para la asignación de valor mediante el ensayo Architect Tacrolimus. Las muestras fueron probadas por espectroscopía de masas. Los resultados muestran una correlación de 0.9998 para el valor teórico versus la asignación de valor real.

Los controles de calidad consistieron en 3 niveles de Controles de Matriz Inmunosupresora UTAK. Las muestras de pacientes fueron obtenidas de pacientes de trasplante en terapia de tacrolimus.

El protocolo de prueba fue como sigue:

(i) Permitir que todas las muestras, calibradores, QC y reactivos se equilibren a temperatura ambiente mezclando por inversión suave.

(ii) Transferir con pipeta 200 µL de muestra, calibrador, o material QC en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Agregar 200 µL de reactivo de extracción y someter a vórtex durante 30 segundos. Permitir que la muestra incube durante 2 minutos a temperatura ambiente y centrifugar durante 5 minutos a 10,000 rpm. Transferir el sobrenadante limpio a un tubo limpio y preparar una dilución 2.5x utilizando regulador de ensayo.

(iii) Transferir con pipeta 10 µL del extracto diluido y 10 µL de partículas diluidas al tubo de reacción, mezclar con vórtex e incubar durante 15 minutos a 37°C. Transferir con pipeta 20 µL de conjugado BSA-tac en el tubo de reacción, mezclar con vórtex e incubar durante 15 minutos a 37°C. Llevar a cabo gMAA durante 6 ciclos (12 minutos). Mezclar con vórtex, incubar durante 5 minutos a 37°C y leer en el lector T2 a 37°C.

5 Los calibradores fueron probados en triplicado para cada prueba (6 lecturas en total). Los datos individuales leídos fueron ajustados con un modelo 5PL utilizando GraphPad Prism 5 para Windows, versión 5.02, GraphPad Software, San Diego California Estados Unidos. El calibrador 0 fue introducido como 0.01 ng/ml y utilizado en el modelo de curva. Las curvas de calibración resultantes (Análisis de Calibración) fueron utilizadas para retrocalcular la concentración de tacrolimus para todos los calibradores, siembras en sangre entera, QC y muestras de pacientes
10 contenidos en el análisis.

Además, se obtuvo una curva de Calibración Maestra ajustando los datos a través del estudio completo de 3 días (n=18) para cada calibrador. Todas las muestras fueron retrocalculadas utilizando la Curva Maestra y los niveles de tacrolimus resultante fueron comparados con los obtenidos utilizando el Análisis de Calibración.

15 Se probó en triplicado un panel de reproducibilidad consistente en 13 miembros (9 calibradores, 3 controles y 1 muestra de sangre entera sembrada) con dos análisis por día para un total de 18 replicados. Los calibradores fueron almacenados a -80°C mientras que los controles y la siembra en sangre entera fueron almacenados a 4-8°C durante la duración del estudio.

20 Las concentraciones de la muestra fueron predichas utilizando la curva de calibración del análisis así como la curva maestra en GraphPrism. Se calcularon la precisión dentro del análisis, dentro del día, día a día y total mediante ANOVA utilizando MiniTab15.

Los datos predichos utilizando el método de Calibración de Análisis mostraron imprecisión total <25%CV a través de un rango de concentración de tacrolimus de ~3-210 ng/ml.

25 La sensibilidad analítica fue calculada por el método 2SD. Se determinó la desviación estándar de 18 replicados del calibrador 0. El nivel de tacrolimus en el T2 máximo (asíntota máxima del ajuste de curva) -2SD fue calculada entonces y se predijo la concentración utilizando la Curva de Calibración Maestra. La sensibilidad analítica es 0.8 ng/ml.

30 Durante el desarrollo y criba del anticuerpo de tacrolimus, se evaluó la especificidad del anticuerpo contra cinco metabolitos de tacrolimus. La inhibición por ELISA fue llevada a cabo con cada uno de los 5 metabolitos y comparada para tacrolimus libre para cinco clones madurados con afinidad y siete clones con maduración de afinidad adicional por clonación cruzada. Los datos para los dos clones cruzados y un anticuerpo RUO monoclonal murínico del estado del arte se muestran a continuación. La única reactividad cruzada observada fue una ligera reactividad del metabolito 15-O-desmetilo.

Se tabula a continuación un resumen del comportamiento del ensayo de tacrolimus.

Requerimiento	Resultados
Rango reportable:	~3.5 – 200 ng/ml con base en calibrador %CV<30% y 90-110% de recuperación. ~2 a > 200 ng/ml con base en calibrador %CV<30% y 85-115% de recuperación.
Sensibilidad analítica (2SD):	0.8 ng/ml

Requerimiento	Resultados
Precisión	@ 2.8 ng/ml: 22% CV @ 6.9 ng/ml: 14% CV @ 14.6 ng/ml: 4% CV
Tiempo hasta el resultado:	56 minutos
Tipo de espécimen:	Sangre entera
Pretratamiento:	El proceso de extracción basado en solventes demostró funcionalidad de uso planeada sobre el instrumento
Volumen de muestra:	200 µL

Ejemplo 24. Preparación de nanopartículas para detección de analitos de ácido nucleico.

- Preparación de partículas de sonda individuales: Partículas superparamagnéticas de óxido de hierro carboxilado de 800 nm, consistentes de numerosos nanocristales de óxido de hierro embebidos en una matriz polimérica incluyendo un diámetro de partícula total de 800 nm (véase Demas et al., New J. Phys. 13:1 (2011)) fueron lavados utilizando una rejilla magnética antes del uso. Las partículas magnéticas fueron resuspendidas en 66 µL de agua libre de nucleasa, 20 µL de regulador MES 250 mM pH 6, y 4 µL de sonda aminada (obtenida de IDT), una concentración de 1 mM por mg de partícula por preparar. Se prepararon una partícula de sonda aminada en 3' y una partícula de sonda aminada en 5' (por ejemplo, la sonda para *C. parapsilosis*). La sonda fue agregada a la partícula y la suspensión fue sometida a vórtex utilizando un sistema de vórtex equipado con un soporte de espuma para sostener el tubo. El aparato para vórtex fue fijado a una velocidad que mantiene las partículas bien suspendidas sin salpicar. Se disolvió entonces N-etil-N'-(3-dimpolietilaminopropil) carbodiimida clorhidrato (EDC) en agua e inmediatamente se agregó a la mezcla en vórtex de partícula-sonda. El tubo fue cerrado e incubado entonces con rotación en una incubadora a 37°C durante 2 horas. El tubo fue colocado entonces en una gradilla magnética y se retiró el fluido de reacción. Las partículas fueron lavadas con una serie de lavados (125 µL/mg por partícula) como sigue: agua, agua, imidazol 0.1 M, pH 6.0, con una incubación de 5 minutos con rotación a 37°C, agua, bicarbonato de sodio 0.1 M, pH 8.0 con una incubación de 5 minutos con rotación a 37°C, agua. Las partículas fueron sometidas entonces a un estrés por calor durante 1 hora a 60-65°C en bicarbonato de sodio 0.1 M pH 8.0 con rotación. Después del estrés por calor, el bicarbonato fue retirado colocando el tubo en una gradilla magnética. Las partículas fueron resuspendidas entonces en un regulador de almacenamiento (Tris-EDTA, Tween 20 al 0.1%) y sometidas a vórtex. El regulador de almacenamiento fue retirado y se agregaron 100 µL finales de regulador de almacenamiento a la preparación de partículas. Las partículas fueron almacenadas a 2-8°C, cuantificadas usando una prueba de hierro para determinar la concentración de hierro de las partículas, luego probadas de nuevo contra un ácido nucleico diana (por ejemplo, titulación de oligo ITS2 de *C. parapsilosis*). En el ensayo de *Candida*, las partículas se diluyen en 8x SSPE suplementada con azida de sodio al 0.09% como conservante.
- Preparación de partículas de sonda duales: Para la preparación de una partícula de sonda dual, el procedimiento es el mismo anterior, excepto que se mezclan volúmenes iguales de una segunda sonda (por ejemplo, *C. albicans* aminada en 3') y la primera sonda (por ejemplo, *C. tropicalis* aminada en 3') antes de la adición a las partículas magnéticas. de la misma manera, se mezclaron volúmenes iguales de sondas aminadas en 5' antes de la adición a las partículas magnéticas.
- Ejemplo 25. Mejoras en el ensayo de *Candida*.**

El límite de detección para el ensayo de *Candida* del Ejemplo 22 fue mejorado lavando la pella. Se combinaron 2.0 mL de sangre entera con 100 µL de regulador de lisis de eritrocitos TRAX (esto es, una mezcla de nonil fenoxipolietoxilanol (NP-40) y 4-octilfenol polietoxilato (Triton-X100)) y se incubó durante aproximadamente 5 minutos. La muestra fue centrifugada durante 5 minutos a 6000 g y el sobrenadante resultante fue retirado y descartado. Para

5 lavar la pella, la pella fue mezclada con 200 µL de regulador Tris EDTA (TE) pH 8.0 y sometida a vórtex. La mezcla fue centrifugada de nuevo durante 5 minutos a 6000 g y el sobrenadante resultante fue retirado y descartado. Después de la etapa de lavado la pella fue mezclada con 100 µL de regulador TE y sometida a agitación con perlas (por ejemplo tal como perlas de vidrio de 0.5 mm, perlas de sílica de 0.1 mm, perlas de sílica de 0.7 mm, o una
10 mezcla de perlas de diferentes tamaños) con agitación vigorosa. La muestra fue centrifugada de nuevo. Se agregaron entonces 50 µL del lisado resultante a 50 µL de una mezcla maestra para PCR asimétrico que contenía desoxinucleótidos, cebadores para PCR y una ADN polimerasa termofílica compatible con sangre entera (T2 Biosystems, Lexington, MA). Los ensayos de aglomeración inducidos por termociclización e hibridación fueron
15 llevados a cabo como se describe en el Ejemplo 22 para producir valores de T2 característicos de la presencia de Candida en la muestra de sangre. El ensayo puede producir (i) un coeficiente de variación en el valor T2 de menos de 20% sobre muestras positivas en Candida; (ii) al menos 95% de detección correcta a menos de o igual a 5 células/mL en muestras sembradas en 50 muestras individuales de sangre de pacientes saludables; (iii) al menos 95% de detección correcta en menos que o igual a 5 células/mL en muestras sembradas en 50 muestras individuales de sangre de pacientes no saludables; y/o (iv) mayor que o igual a 80% de detección correcta en muestras de pacientes clínicamente positivos (esto es, positivos para Candida por otra técnica, tal como por ejemplo cultivo celular), partiendo con 2 mL de sangre.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la presencia de un patógeno en una muestra de sangre entera, comprendiendo el método:

- (a) proveer una muestra de sangre entera de un sujeto;
- 5 (b) mezclar la muestra de sangre entera con un agente de lisis de eritrocitos para producir glóbulos rojos destruidos;
- (c) después de la etapa (b), centrifugar la muestra para formar un sobrenadante y una pella, descartando una parte o todo el sobrenadante, y resuspender la pella para formar un extracto, lavando opcionalmente la pella antes de resuspender la pella y repetir opcionalmente la etapa (c);
- (d) someter a lisis las células del extracto para formar un lisado;
- 10 (e) colocar el lisado de la etapa (d) en un contenedor y amplificar un ácido nucleico en el lisado para formar una solución lisada amplificada que comprende el ácido nucleico diana, en donde el ácido nucleico diana es característico del patógeno que va a ser detectado;
- 15 (f) después de la etapa (e) mezclar la solución lisada amplificada con de 1×10^6 hasta 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro de la solución lisada amplificada para formar una muestra líquida, en donde las partículas magnéticas tienen un diámetro medio de 700 nm a 950 nm, una relajación T_2 por partícula que va de 1×10^9 a $1 \times 10^{12} \text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$, y unidades estructurales de enlazamiento sobre su superficie, siendo operativa las unidades estructurales de enlazamiento para alterar la agregación de las partículas magnéticas en la presencia de un ácido nucleico diana o un agente de enlazamiento multivalente;
- 20 (g) colocar la muestra líquida en un dispositivo, comprendiendo el dispositivo un soporte que define un pozo para contener el tubo de detección que comprende las partículas magnéticas y el ácido nucleico diana y que tiene una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina de RF para detectar una señal producida al exponer la muestra líquida a un campo magnético polarizado creado utilizando uno o más magnetos y una secuencia de pulsos de RF;
- (h) exponer la muestra a un campo magnético polarizado y una secuencia de pulsos de RF;
- 25 (i) después de la etapa (h) medir la señal de la muestra líquida, en donde la muestra líquida comprende opcionalmente proteínas de sangre entera y oligonucleótidos no diana; y
- (j) sobre la base del resultado de la etapa (i) detectar el patógeno, en donde opcionalmente el patógeno es bacterias u hongos, y en donde el método es capaz de detectar una concentración de patógenos de 10 células/mL en la muestra de sangre entera,
- 30 preferiblemente en donde las etapas (a) a (i) son completadas al cabo de 3 horas y/o la etapa (i) se lleva a cabo sin ninguna purificación previa de la solución lisada amplificada.

2. Un método para detectar la presencia de un virus en una muestra de sangre entera, comprendiendo el método:

- (a) proveer una muestra de plasma de un sujeto;
- 35 (b) mezclar de 0.05 a 4.0 mL de la muestra de plasma con un agente de lisis para producir una mezcla que comprende virus destruidos;
- (c) colocar la muestra (b) en un contenedor y amplificar un ácido nucleico diana en el filtrado para formar una solución filtrada amplificada que comprende el ácido nucleico diana, en donde el ácido nucleico diana es característico del virus que va a ser detectado;
- 40 (d) después de la etapa (c) mezclar la solución filtrada amplificada con 1×10^6 hasta 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro de la solución filtrada amplificada para formar una muestra líquida, en donde las partículas magnéticas tienen un diámetro medio de 700 nm a 950 nm, una relajación T_2 por partícula que va de 1×10^9 hasta $1 \times 10^{12} \text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$, y unidades estructurales de enlazamiento sobre su superficie, siendo operativa las unidades estructurales de enlazamiento para alterar la agregación de las partículas magnéticas en la presencia del ácido nucleico diana o un agente de enlazamiento multivalente;
- 45 (e) colocar la muestra líquida en un dispositivo, comprendiendo el dispositivo un soporte que define un pozo para

contener el tubo de detección que comprende las partículas magnéticas y el ácido nucleico diana, y que tiene una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada a la bobina de RF para detectar una señal producida por la exposición de la muestra líquida a un campo magnético polarizado creado utilizando uno o más magnetos y una secuencia de pulsos de RF;

5 (f) exponer la muestra líquida a un campo magnético polarizado y una secuencia de pulsos de RF;

(g) después de la etapa (f) medir la señal desde la muestra líquida; y

(h) sobre la base del resultado de la etapa (g) detectar el virus,

en donde el método es capaz de detectar menos de 100 copias de virus en la muestra de sangre entera, preferiblemente en donde las etapas (a) a (g) son completadas al cabo de 3 horas.

10 3. El método de la reivindicación 1, en donde se mezclan de 0.05 a 4.0 mL de la muestra de sangre entera con dicho agente de lisis de eritrocitos para producir dichos glóbulos rojos destruidos.

4. Un método para detectar la presencia de un ácido nucleico diana en una muestra de sangre entera, comprendiendo el método:

(a) proveer una o más células de una muestra de sangre entera de un sujeto;

15 (b) someter a lisis dichas células para formar un lisado;

(c) amplificar un ácido nucleico en el lisado para formar una solución de lisado amplificada que comprende el ácido nucleico diana;

20 (d) después de la etapa (c) agregar a un tubo de detección la solución de lisado amplificada y de 1×10^6 hasta 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro de la solución lisada amplificada, en donde las partículas magnéticas tienen un diámetro medio que va desde 700 nm a 950 nm, y unidades estructurales de enlazamiento sobre su superficie, siendo operativa las unidades estructurales de enlazamiento para alterar la agregación de las partículas magnéticas en la presencia del ácido nucleico diana o un agente de enlazamiento multivalente;

25 (e) colocar el tubo de detección en un dispositivo, comprendiendo el dispositivo un soporte que define un pozo para contener el tubo de detección que comprende las partículas magnéticas y el ácido nucleico diana, y teniendo una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina de RF para detectar una señal producida por la exposición de la muestra líquida a un campo magnético polarizado creado utilizando uno o más magnetos y una secuencia de pulsos de RF;

(f) exponer la muestra a un campo magnético polarizado y una secuencia de pulsos de RF;

(h) después de la etapa (f), medir la señal del tubo de detección; y

30 (i) sobre la base del resultado de la etapa (h) detectar el ácido nucleico diana,

preferiblemente

en donde dicho ácido nucleico diana es purificado antes de la etapa (d).

5. Un método para detectar la presencia de un ácido nucleico diana en una muestra de sangre entera, comprendiendo el método:

35 (a) proveer un extracto producido por la lisis de glóbulos rojos en una muestra de sangre entera de un sujeto, centrifugar la muestra para formar un sobrenadante y una pella, descartar una parte o todo el sobrenadante, y resuspender la pella para formar un extracto, lavando opcionalmente la pella antes de resuspender la pella y repetir opcionalmente las etapa de centrifugación, descarte y resuspensión;

40 (b) someter a las células a lisis en el extracto para formar un lisado, que comprende opcionalmente combinar el extracto con perlas para formar una mezcla y agitar la mezcla para formar un lisado;

(c) colocar el lisado de la etapa (b) en un tubo de detección y amplificar ácidos nucleicos en la misma para formar una solución lisada amplificada que comprende el ácido nucleico diana;

- (d) después de la etapa (c), agregar al tubo de detección de 1×10^6 hasta 1×10^{13} partículas magnéticas por mililitro de la solución lisada amplificada, en donde las partículas magnéticas tienen un diámetro medio que va de 700 nm a 950 nm, y unidad estructural de enlazamiento sobre su superficie, siendo operativa las unidades estructurales de enlazamiento para alterar la agregación de las partículas magnéticas en la presencia del ácido nucleico diana o un agente de enlazamiento multivalente;
- (e) colocar el tubo de detección en un dispositivo, comprendiendo el dispositivo un soporte que define un pozo para contener el tubo de detección que comprende las partículas magnéticas y el ácido nucleico diana, y que tiene una bobina de RF dispuesta alrededor del pozo, configurada la bobina de RF para detectar una señal producida al exponer la muestra líquida a un campo magnético polarizado creado utilizando uno o más imanes y una secuencia de pulsos de RF;
- (f) exponer la muestra a un campo magnético polarizado y una secuencia de pulsos de RF;
- (g) después de la etapa (f) medir la señal desde el tubo de detección; y
- (h) sobre la base del resultado de la etapa (g) detectar el ácido nucleico diana, en donde la etapa (g) se lleva a cabo sin ninguna purificación previa de la solución lisada amplificada.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dichas partículas magnéticas comprenden una o más poblaciones que tienen una primera sonda y una segunda sonda conjugada a su superficie, siendo operativa la primera sonda para enlazarse a un primer segmento del ácido nucleico diana y siendo operativa la segunda sonda para enlazarse a un segundo segmento del ácido nucleico diana, en donde las partículas magnéticas forman agregados en la presencia del ácido nucleico diana.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dichas partículas magnéticas comprenden una primera población que tiene una primera unidad estructural de enlazamiento sobre su superficie y una segunda población que tiene una segunda unidad estructural de enlazamiento sobre su superficie, y comprendiendo dicha unidad estructural de enlazamiento multivalente una primera sonda y una segunda sonda, siendo operativa la primera sonda para enlazarse a dicha primera unidad estructural de enlazamiento y siendo operativa la segunda sonda para enlazarse a dicha segunda unidad estructural de enlazamiento, siendo operativas las unidades estructurales de enlazamiento y la unidad estructural multivalente para alterar una agregación de las partículas magnéticas en la presencia del ácido nucleico diana.
8. El método de la reivindicación 1, en donde dicho patógeno es una especie de *Candida*, dicha amplificación sucede en la presencia de un cebador de avance y un cebador reverso, cada uno de los cuales es universal a múltiples especies de *Candida* para formar una solución que comprende un amplicón de *Candida*; dichas unidades estructurales de enlazamiento son operativas para alterar la agregación de las partículas magnéticas en la presencia del amplicón de *Candida* o de un agente de enlazamiento multivalente;
- preferiblemente
- i) donde el cebador de avance comprende la secuencia de oligonucleótidos 5'-GGC ATG CCT GTT TGA GCG TC- 3' y/o el cebador reverso comprende la secuencia de oligonucleótidos 5'-GCT TAT TGA TAT GCT TAA GTT CAG CGG GT-3', o
- ii) en donde:
- (a) la especie de *Candida* es *Candida albicans*, y en donde la primera sonda comprende la secuencia de oligonucleótido 5'-ACC CAG CGG TTT GAG GGA GAA AC-3' y la segunda sonda comprende la secuencia de oligonucleótido 5'-AAA GTT TGA AGA TAT ACG TGG TGG ACG TTA-3';
- (b) en donde la especie de *Candida* es *Candida krusei*, y en donde la primera sonda y la segunda sonda comprenden una secuencia de oligonucleótidos seleccionada de: 5'-CGC ACG CGC AAG ATG GAA ACG-3', 5'-AAG TTC AGC GGG TAT TCC TAC CT-3', y 5'-AGC TTT TTG TTG TCT CGC AAC ACT CGC-3';
- (c) en donde la especie de *Candida* es *Candida glabrata*, y en donde la primera sonda comprende la secuencia de oligonucleótido 5'-CTA CCA AAC ACA ATG TGT TTG AGA AG-3' y la segunda sonda comprende la secuencia de oligonucleótido 5'-CCT GAT TTG AGG TCA AAC TTA AAG ACG TCT G-3'; o
- (d) en donde la especie de *Candida* es *Candida parapsilosis* o *Candida tropicalis*, y en donde la primera sonda y la segunda sonda comprenden una secuencia de oligonucleótidos seleccionada de: 5'-AGT CCT ACC TGA TTT GAG GTC NtIndAA-3', 5'-CCG NtIndGG GTT TGA GGG AGA AAT-3', 5'-AAA GTT ATG AAATAA ATT GTG GTG GCC ACT AGC-3', 5'-ACC CGG GGGTTT GAG GGA GAA A-3', 5'-AGT CCT ACC TGA TTT GAG GTC GAA-3', y 5'-CCG

AGG GTT TGA GGG AGA AAT-3'.

9. El método de la reivindicación 8, en donde

- i) las etapas (a) a (h) son completadas al cabo de 3 horas, o
- 5 ii) las partículas magnéticas comprenden dos poblaciones, una primera población que porta la primera sonda sobre su superficie, y la segunda población porta la segunda sonda sobre su superficie, o
- 10 iii) dichas partículas magnéticas comprenden una o más poblaciones que tienen una primera sonda y una segunda sonda conjugadas a su superficie, siendo operativa la primera sonda para enlazarse a un primer segmento del amplicón de Candida y siendo operativa la segunda sonda para enlazarse a un segundo segmento del amplicón de Candida, en donde las partículas magnéticas forman agregados en la presencia del amplicón de Candida, o
- 15 iv) dichas partículas magnéticas comprenden una primera población que tienen una primera unidad estructural de enlazamiento sobre su superficie y una segunda población que tiene una segunda unidad estructural de enlazamiento sobre su superficie, y dicha unidad estructural de enlazamiento multivalente comprende una primera sonda y una segunda sonda, siendo operativa la primera sonda para enlazarse a dicha primera unidad estructural de enlazamiento y siendo operativa la segunda sonda para enlazarse a dicha segunda unidad estructural de enlazamiento, siendo las unidades estructurales de enlazamiento y la unidad de enlazamiento multivalente operativas para alterar una agregación de las partículas magnéticas en la presencia del amplicón de Candida.

Figura 1A

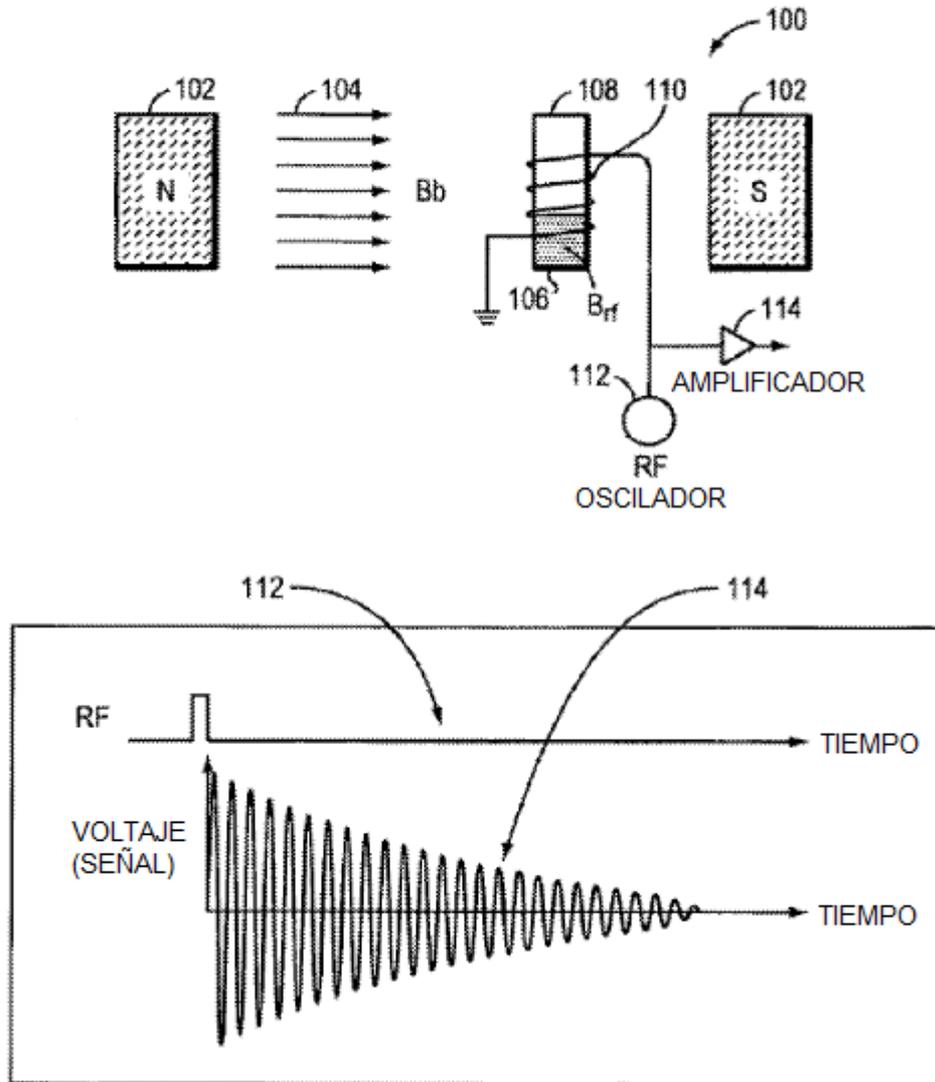
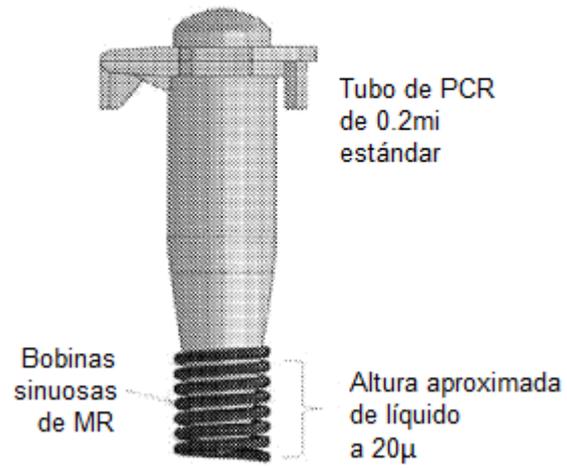


Figura 1B



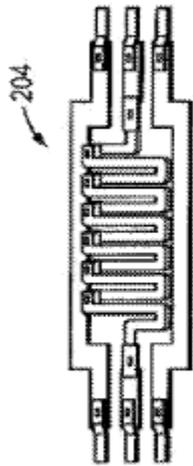


FIG. 2C

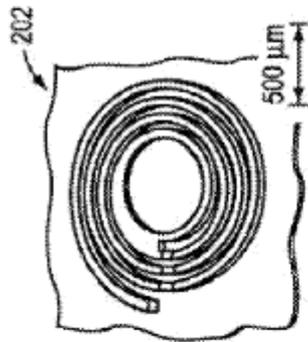


FIG. 2B



FIG. 2A

Figura 2

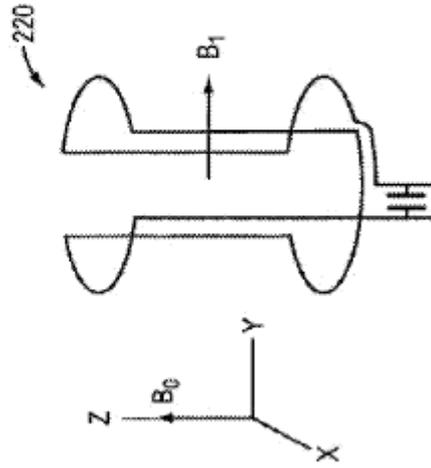


FIG. 2E

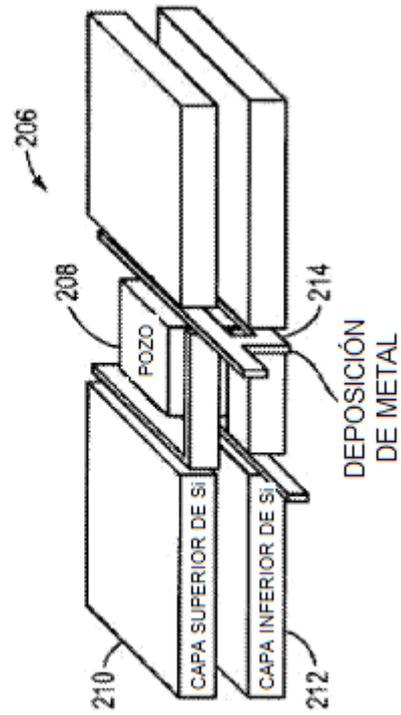


FIG. 2D

Figura 3

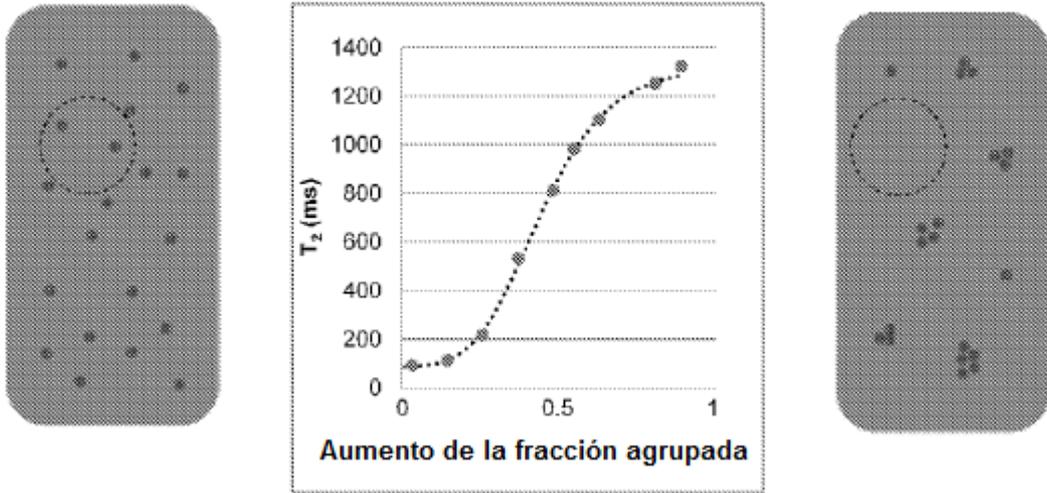


Figura 4

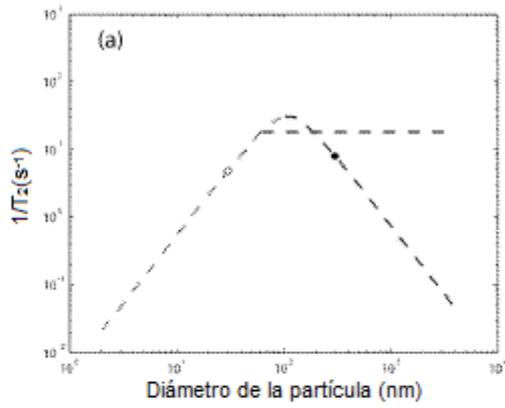


Figura 4A

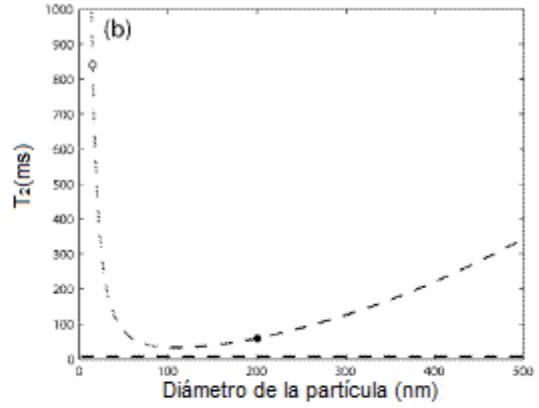


Figura 4B

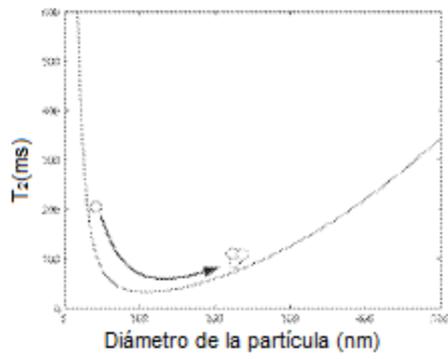


Figura 4C

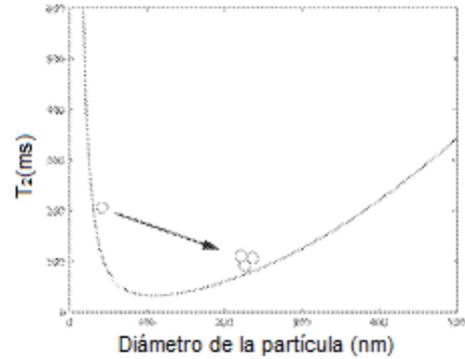


Figura 4D

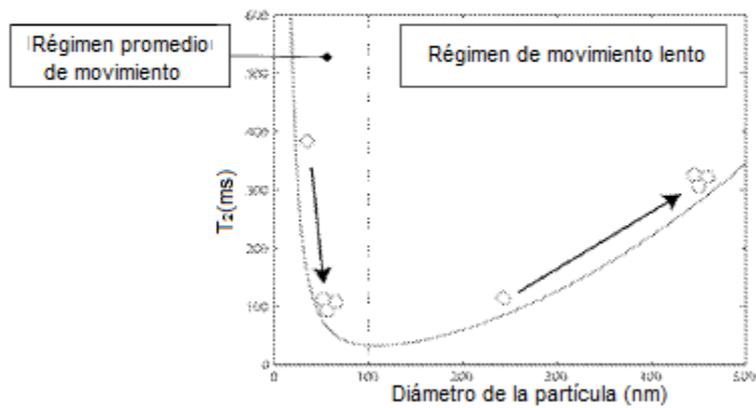


Figura 4E

Figura 5

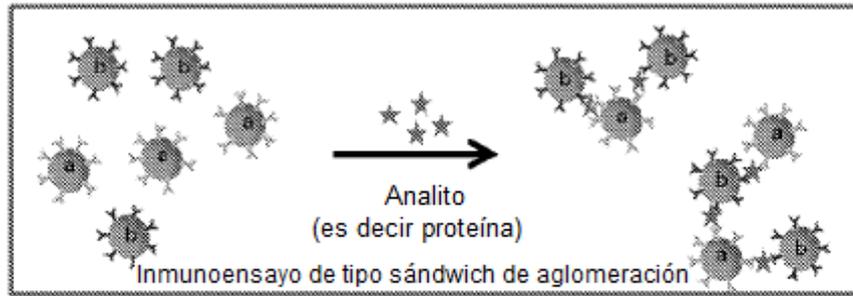


Figura 5A

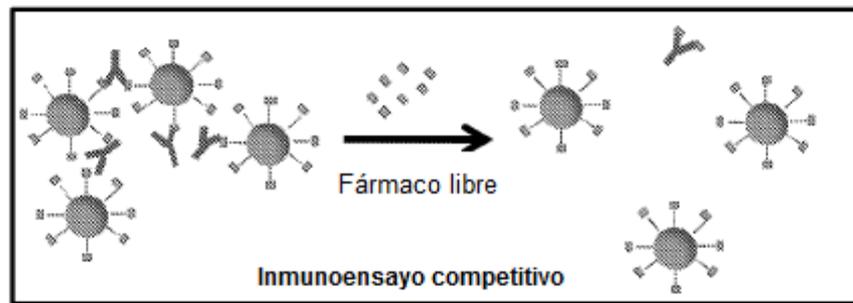


Figura 5B

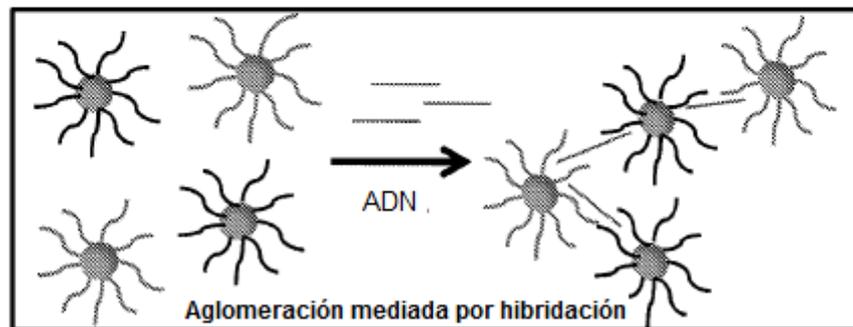


Figura 5C

Figura 6

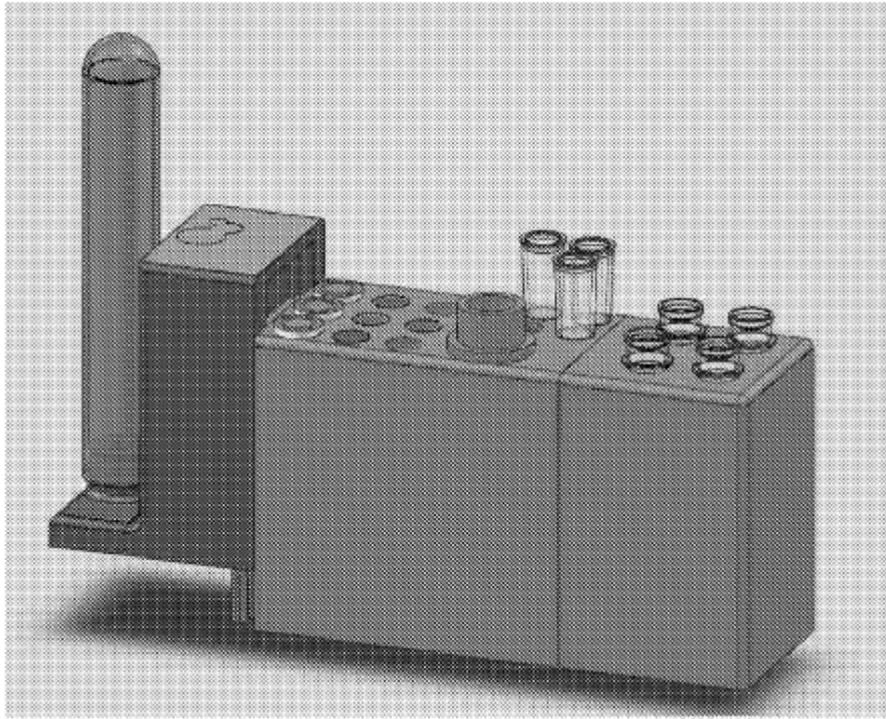


Figura 7

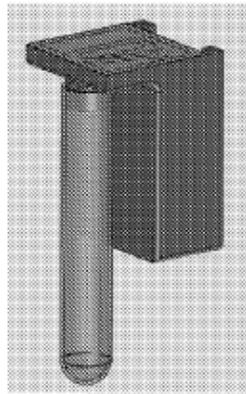


Figura 7A

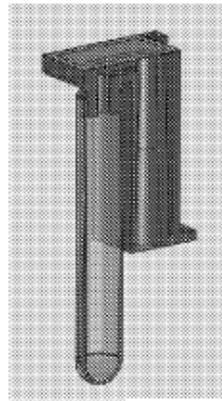


Figura 7B

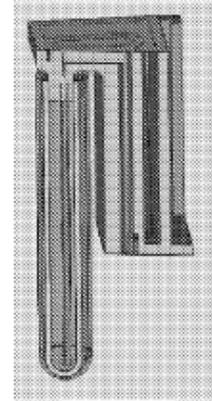


Figura 7C

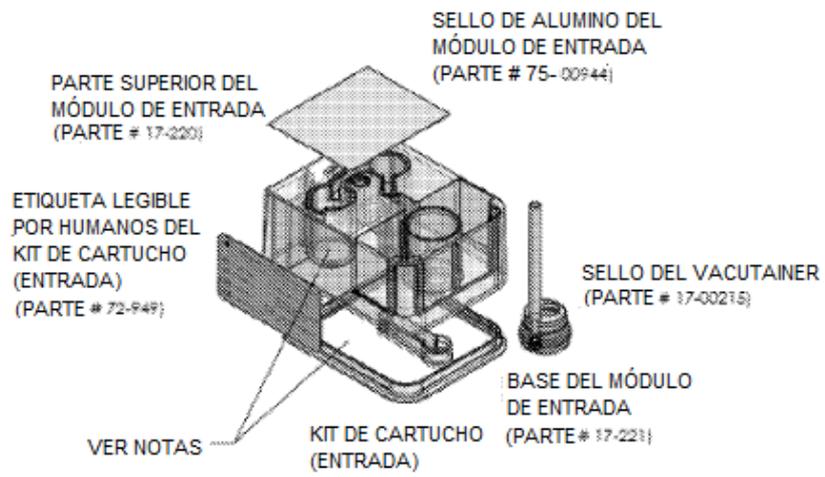


Figura 7D

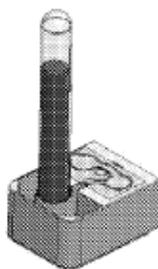


Figura 7E



Figura 7F

Figura 8

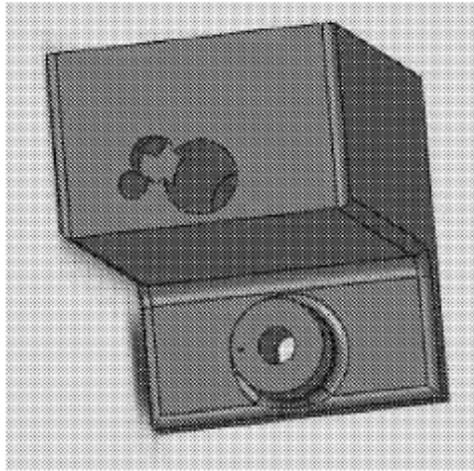


Figura 9

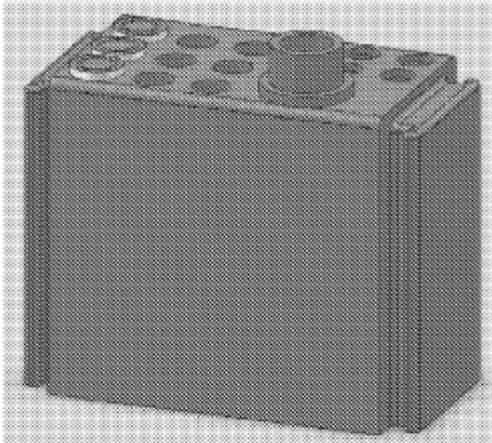


Figura 9A

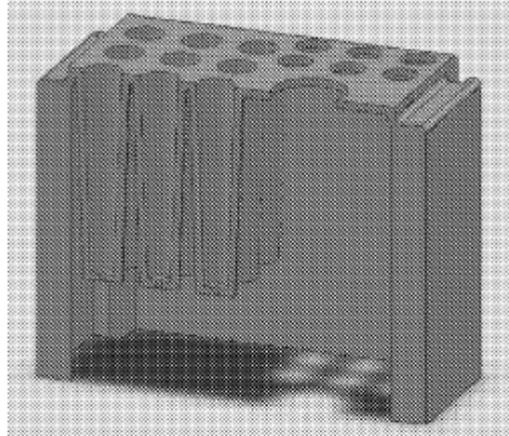


Figura 9B

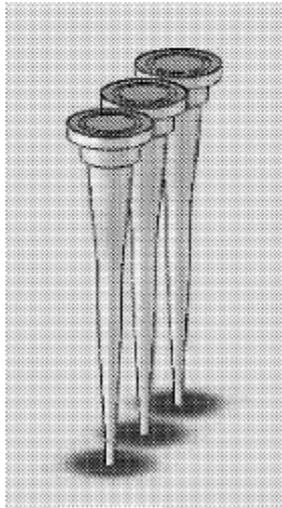


Figura 9C

Figura 10

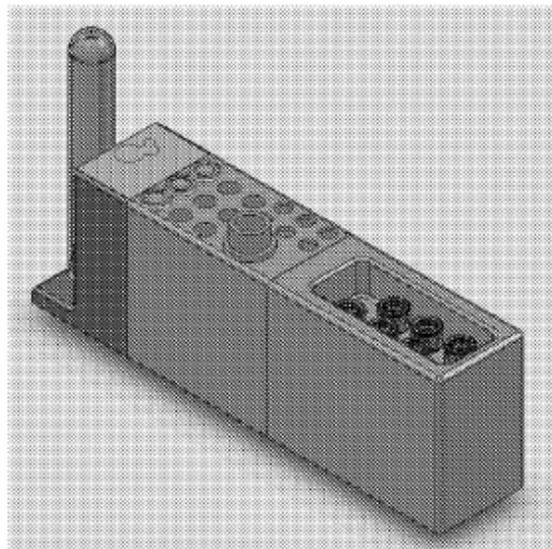


Figura 10A

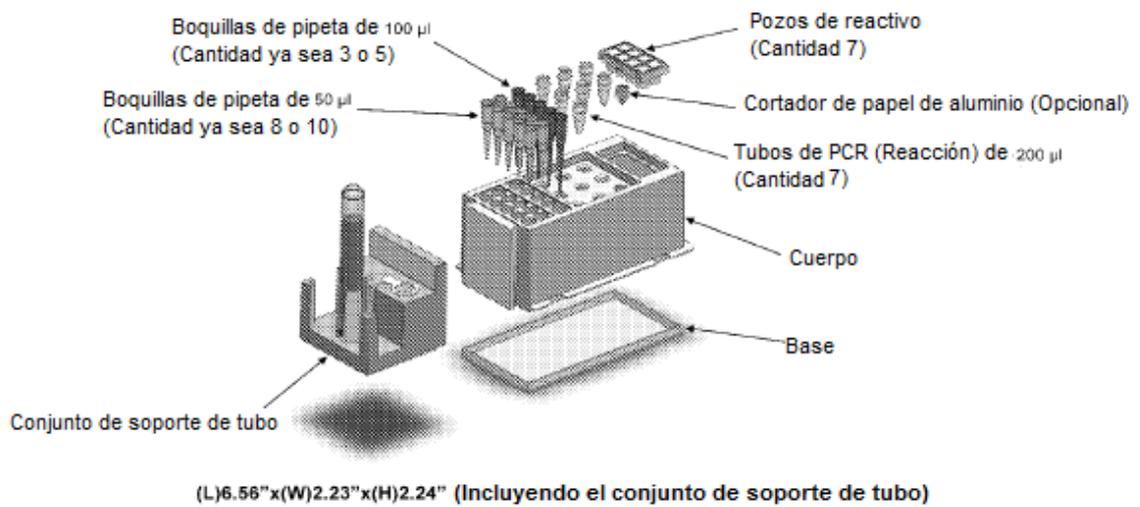


Figura 10B

Figura 11

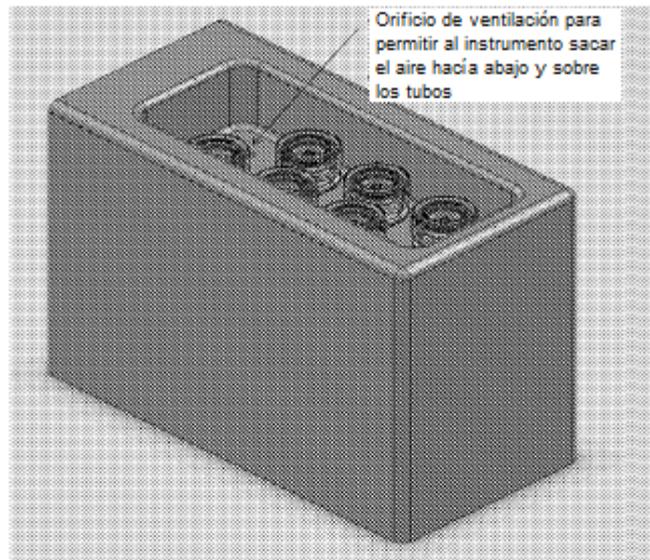


Figura 12

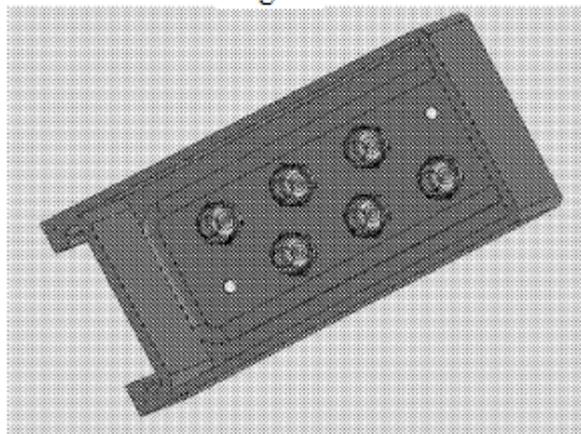


Figura 13

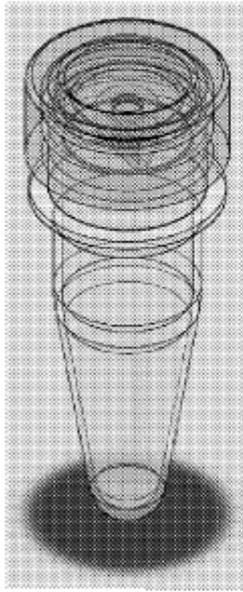


Figura 13A

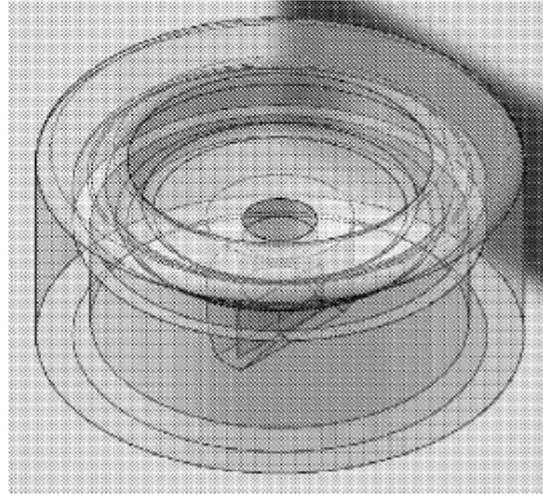


Figura 13B

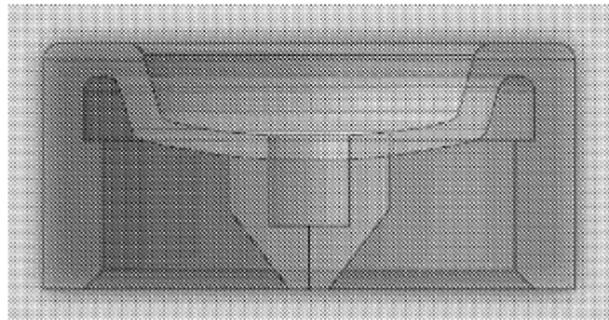


Figura 13C

Figura 14

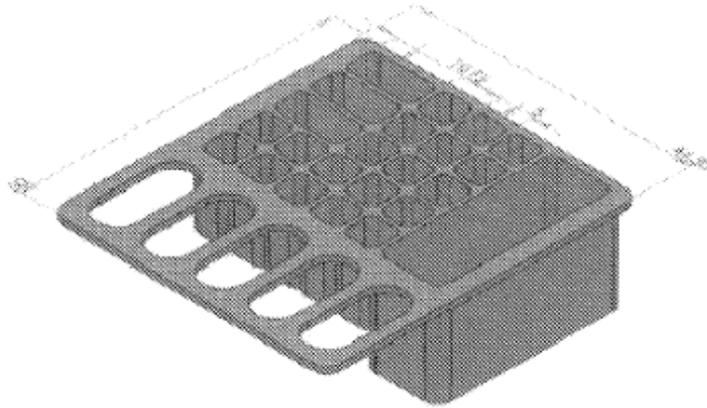


Figura 14A

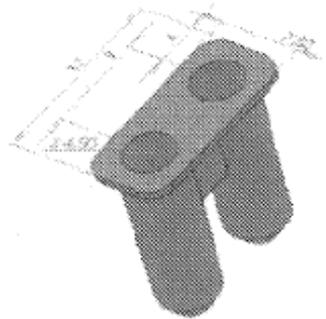


Figura 14B

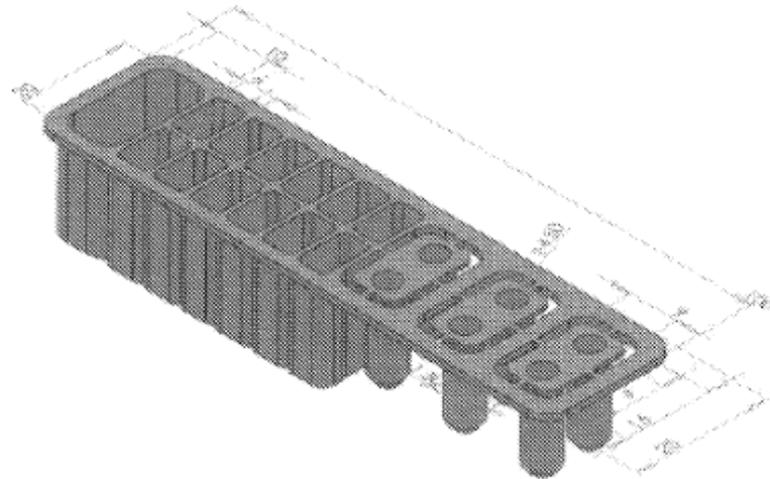


Figura 14C

Figura 15

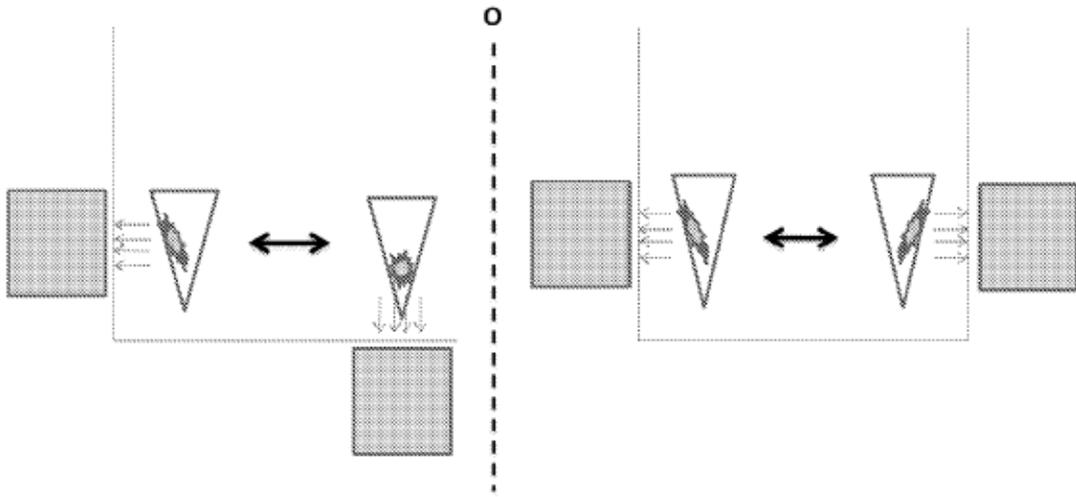


Figura 16

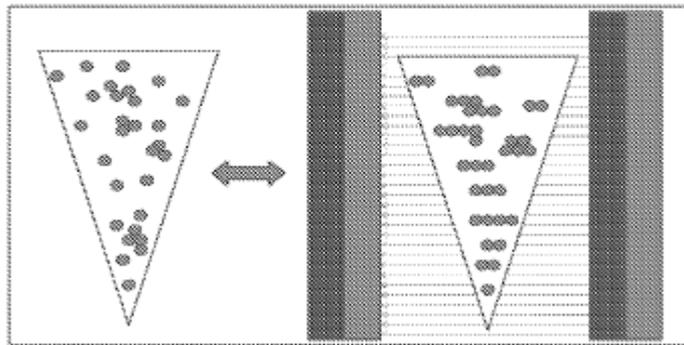


Figura 17

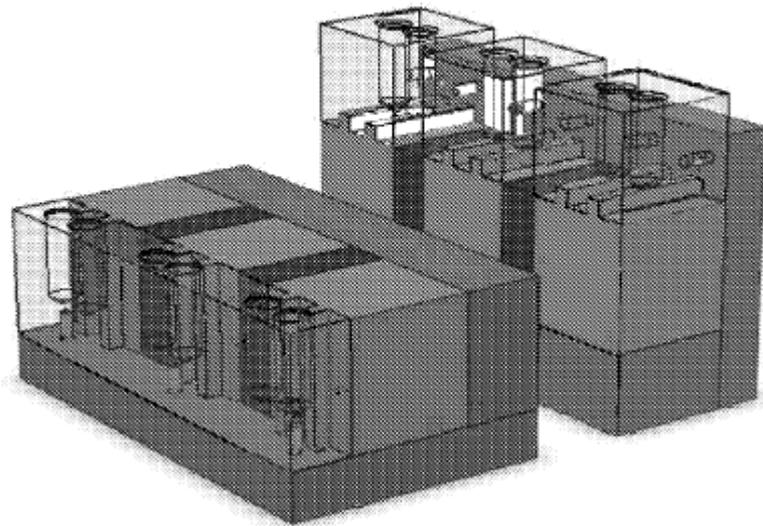


Figura 18

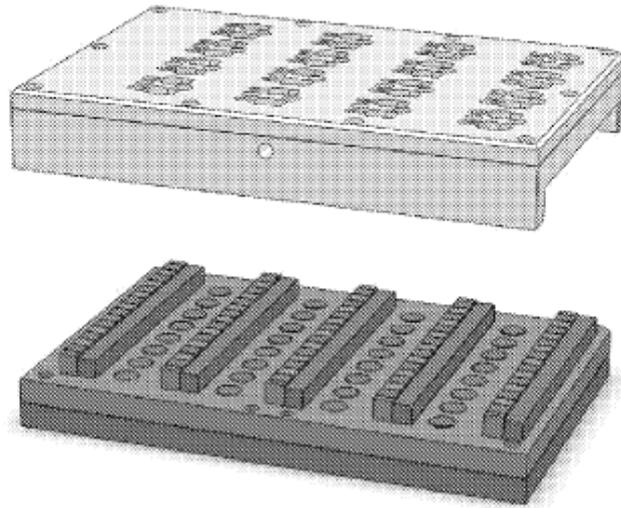


Figura 18A

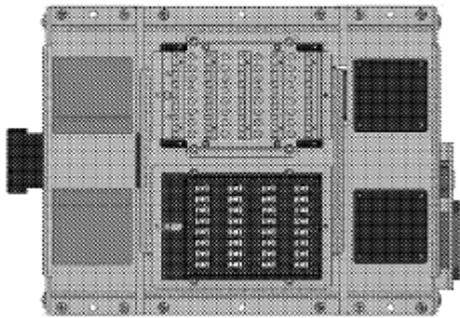


Figura 18B

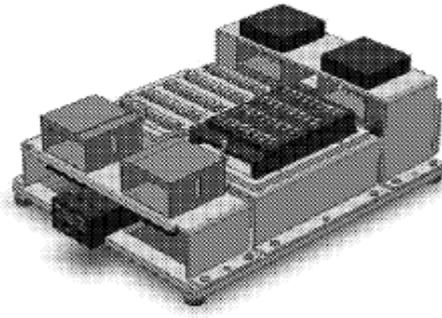


Figura 18C

Figura 19

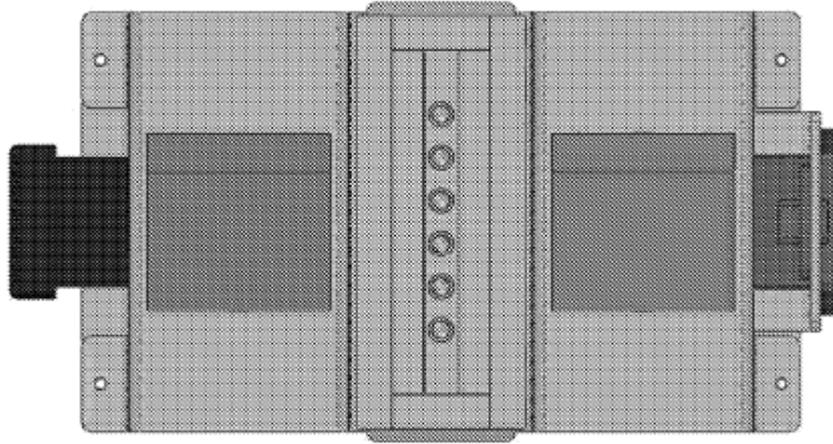


Figura 19A

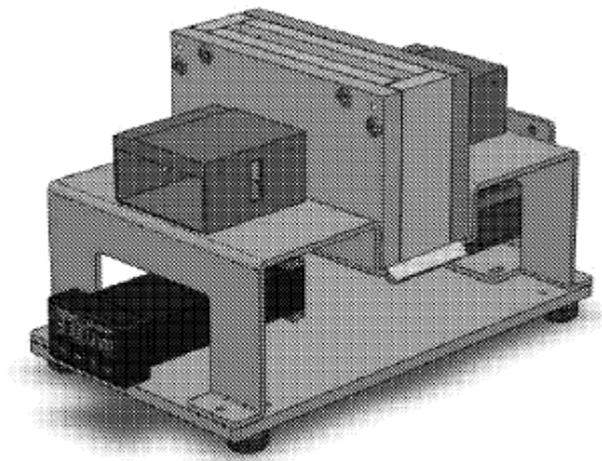


Figura 19B

Figura 20

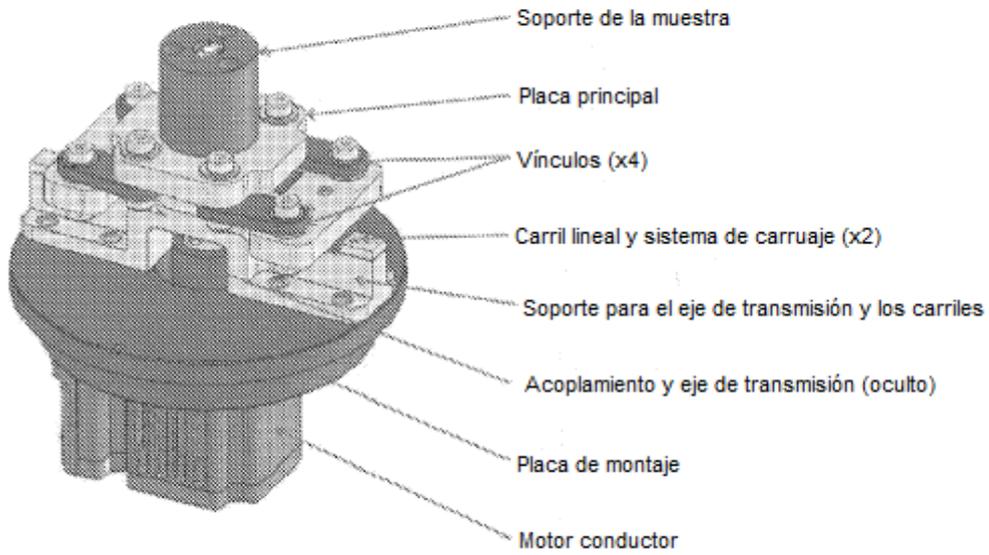


Figura 21

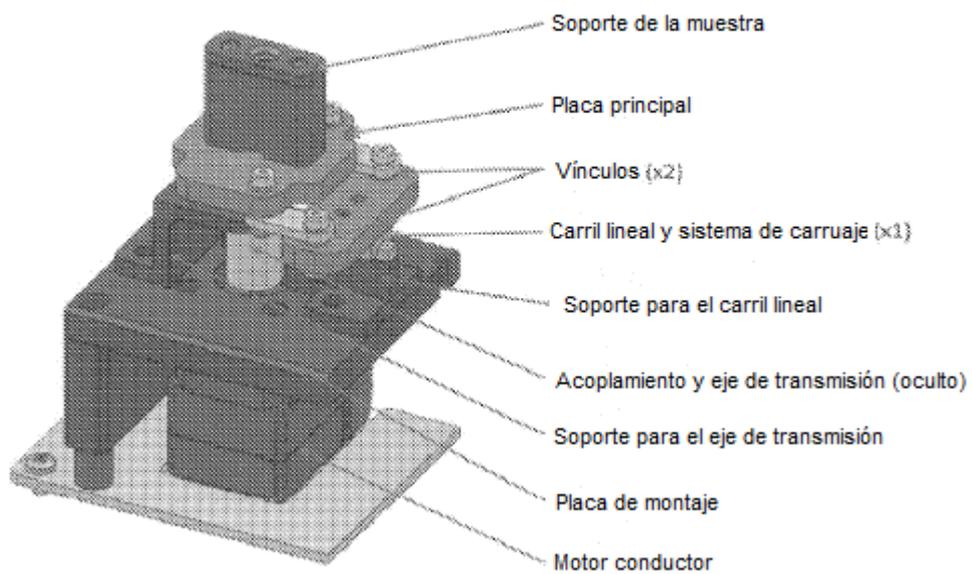


Figura 22

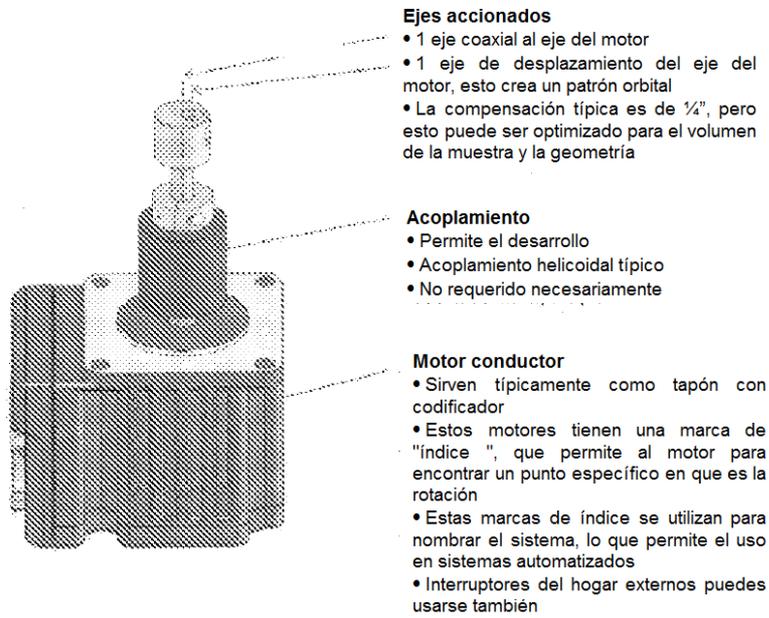


Figura 22A

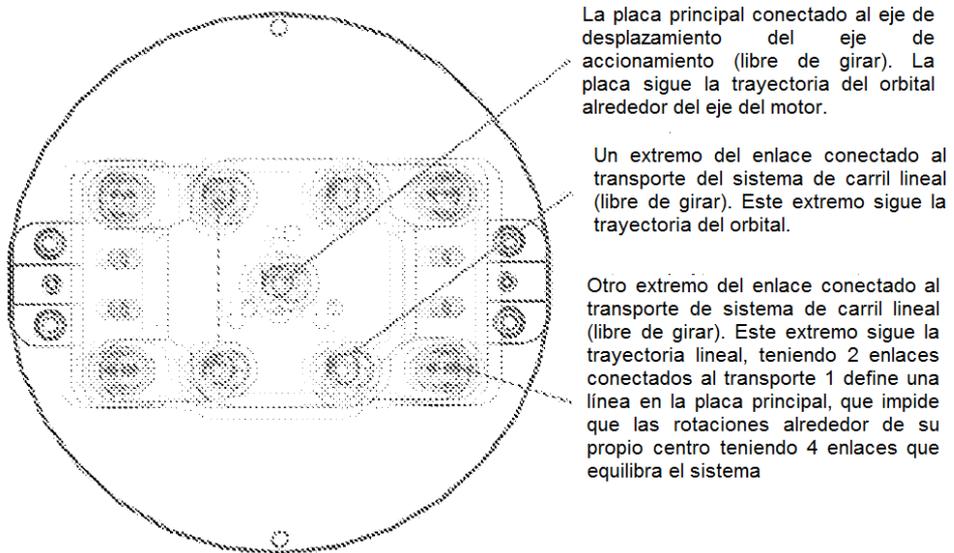


Figura 22B

Figura 23

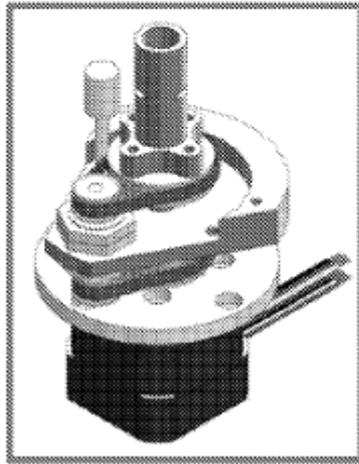


Figura 23A

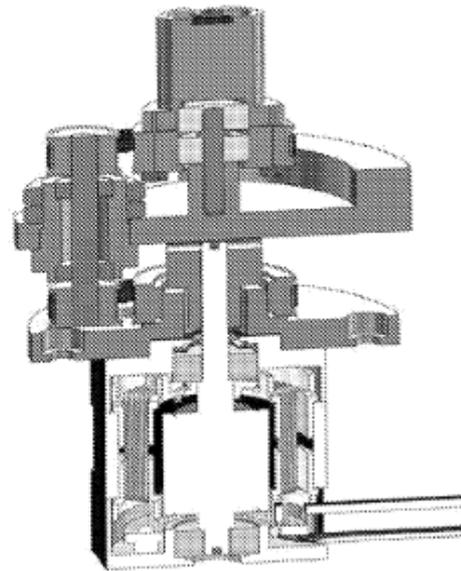


Figura 23B

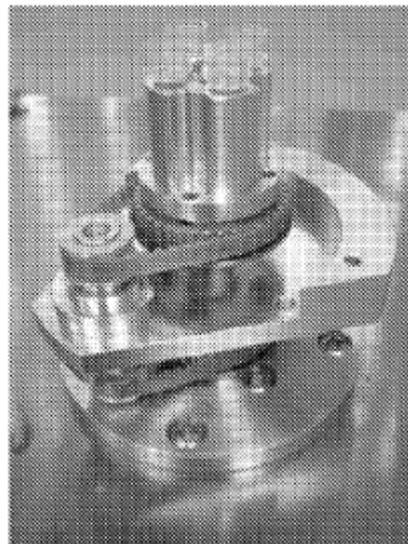


Figura 23C

Figura 24

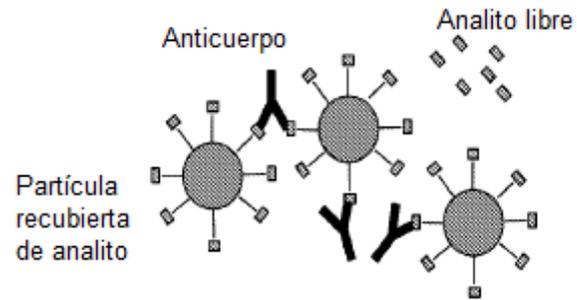


Figura 25

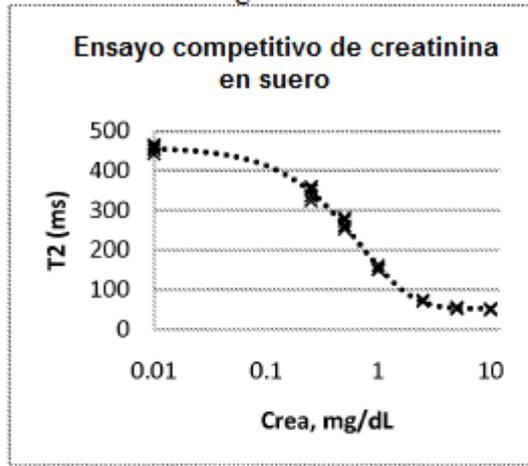


Figura 25A

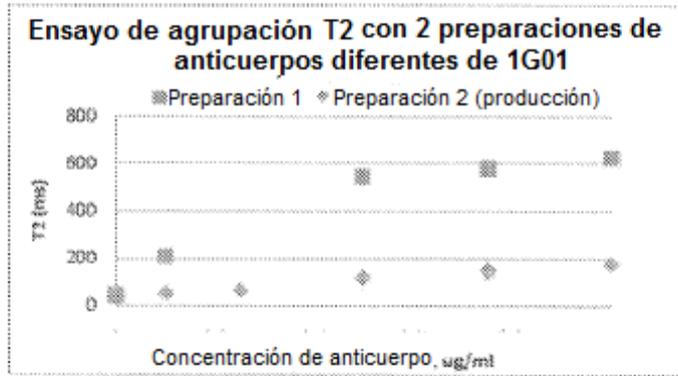


Figura 25B

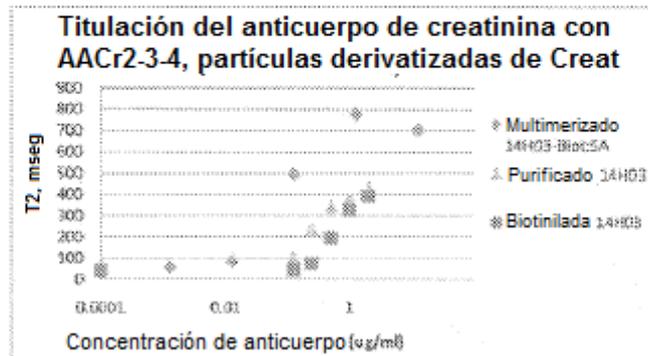


Figura 25C

Figura 26

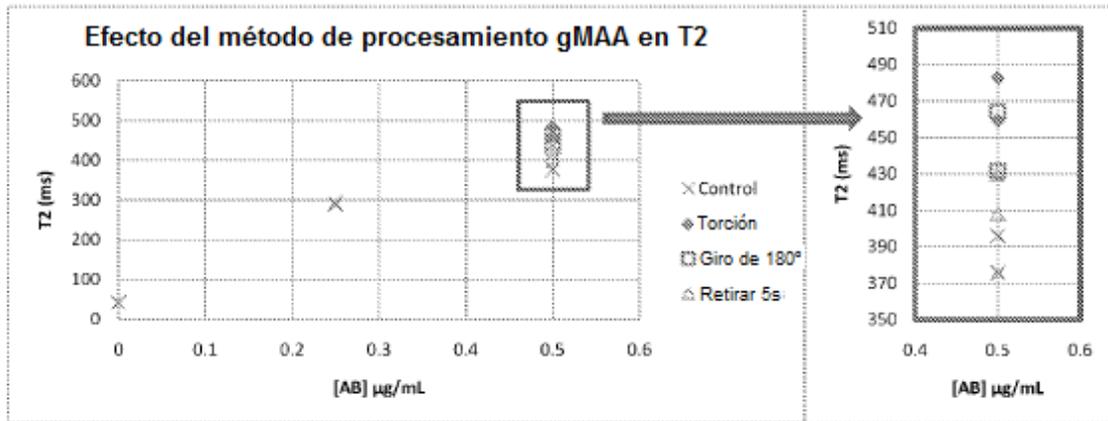


Figura 27

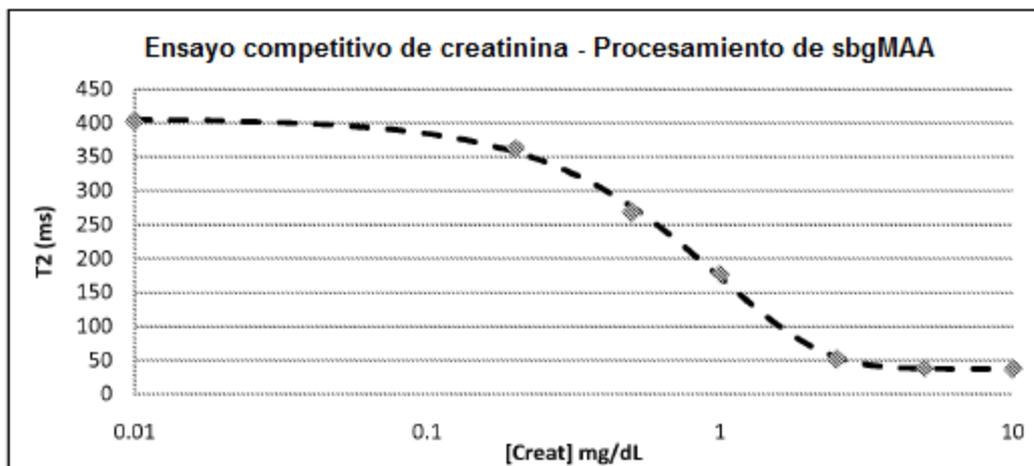


Figura 28

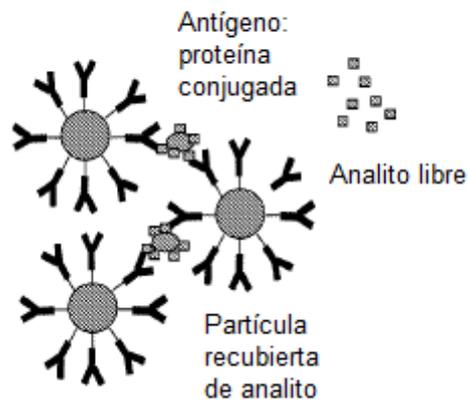


Figura 29

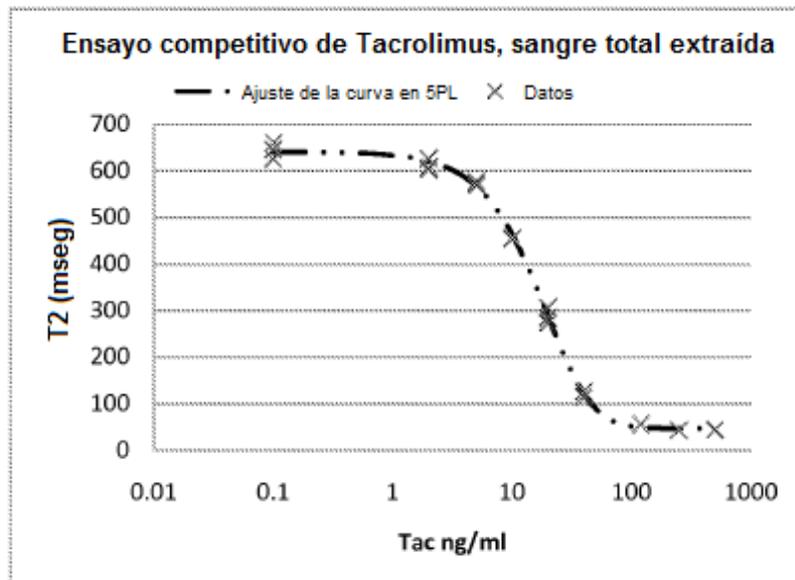


Figura 30

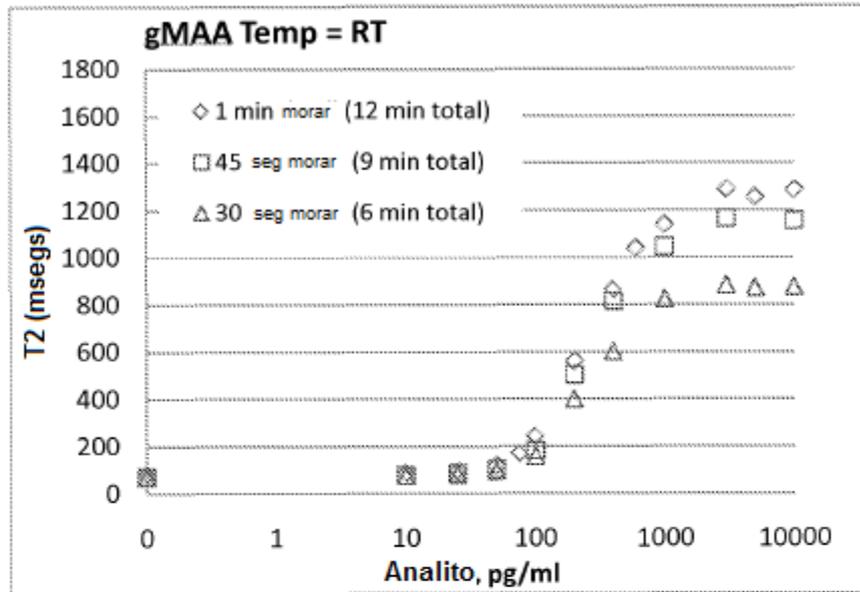


Figura 30A

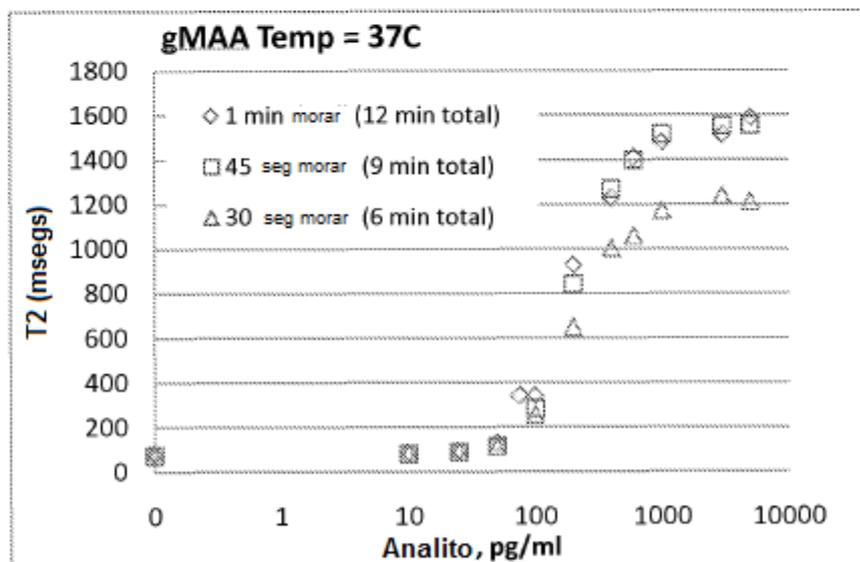


Figura 30B

Figura 31

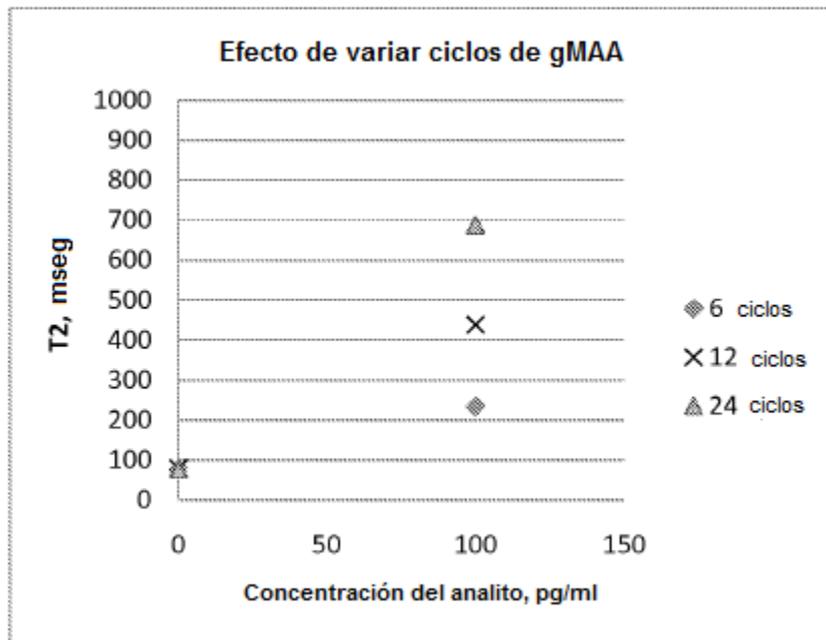


Figura 32

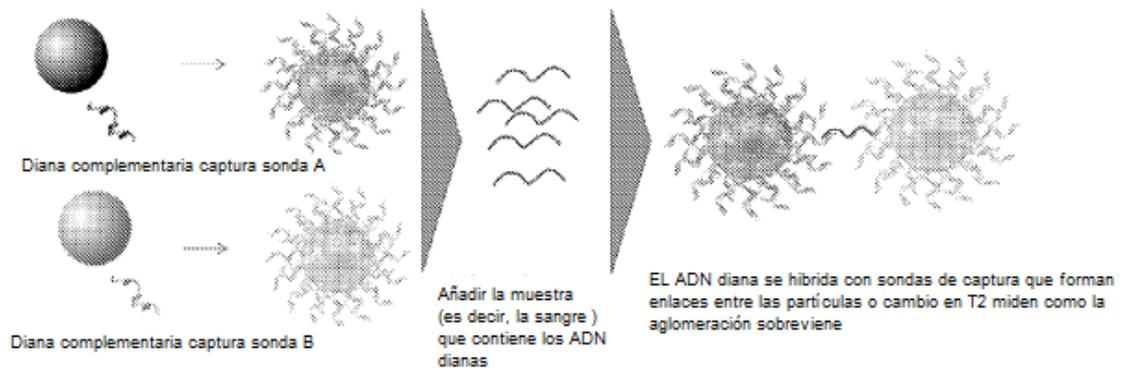


Figura 33

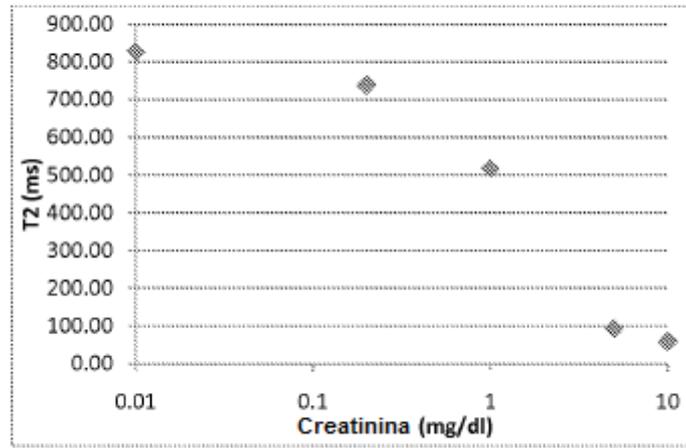


Figura 34

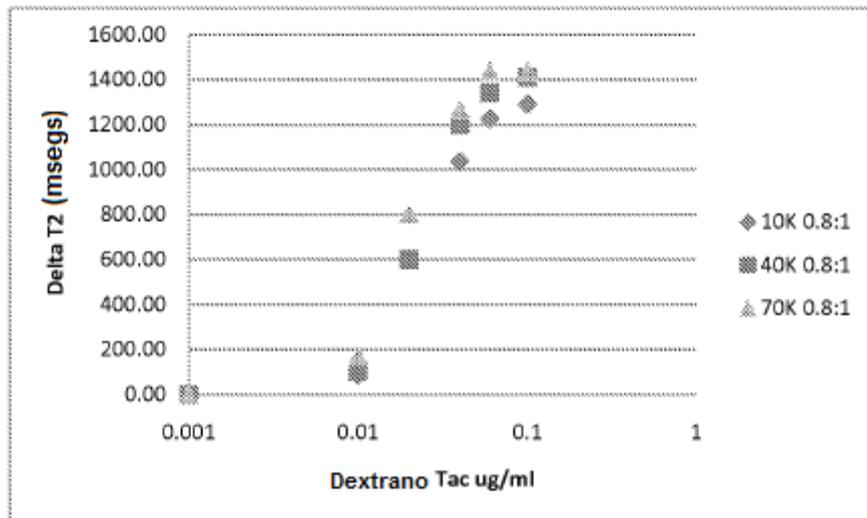


Figura 35

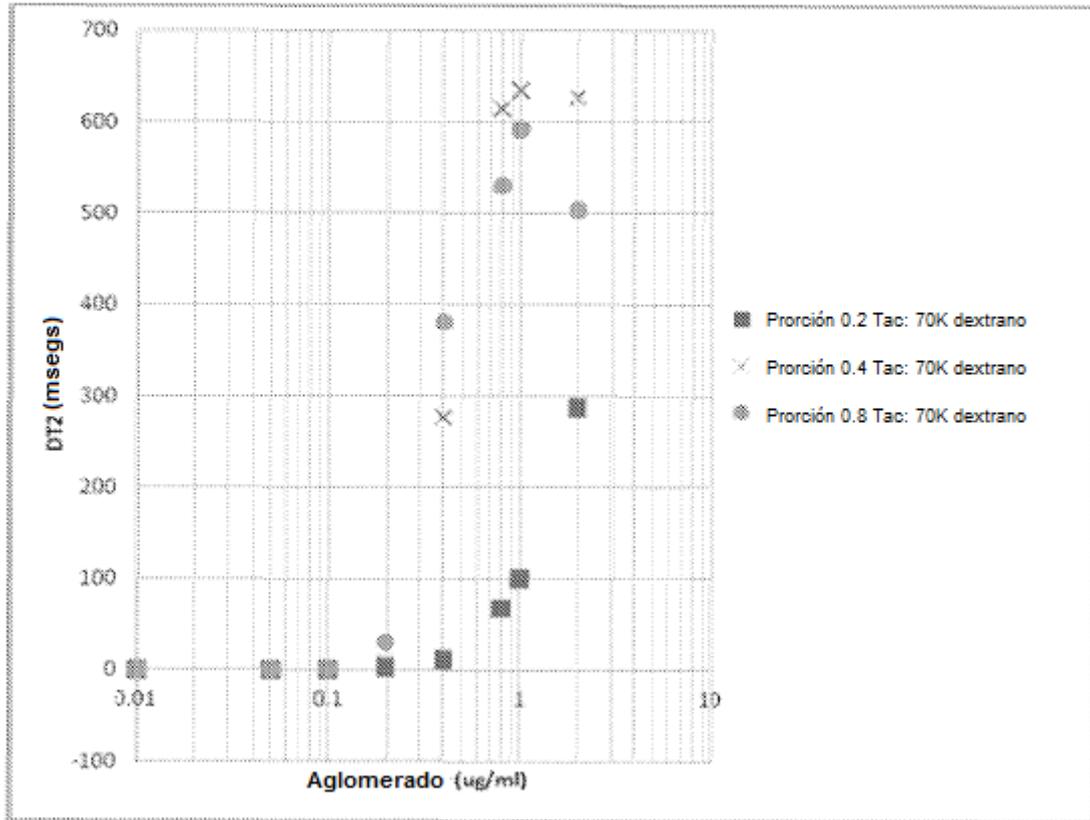


Figura 36

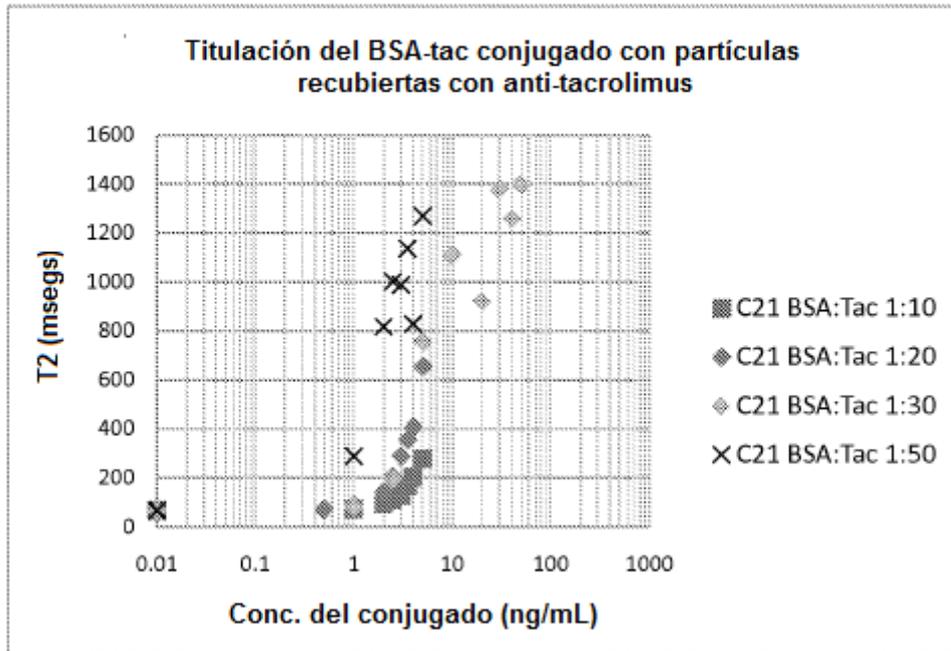


Figura 37

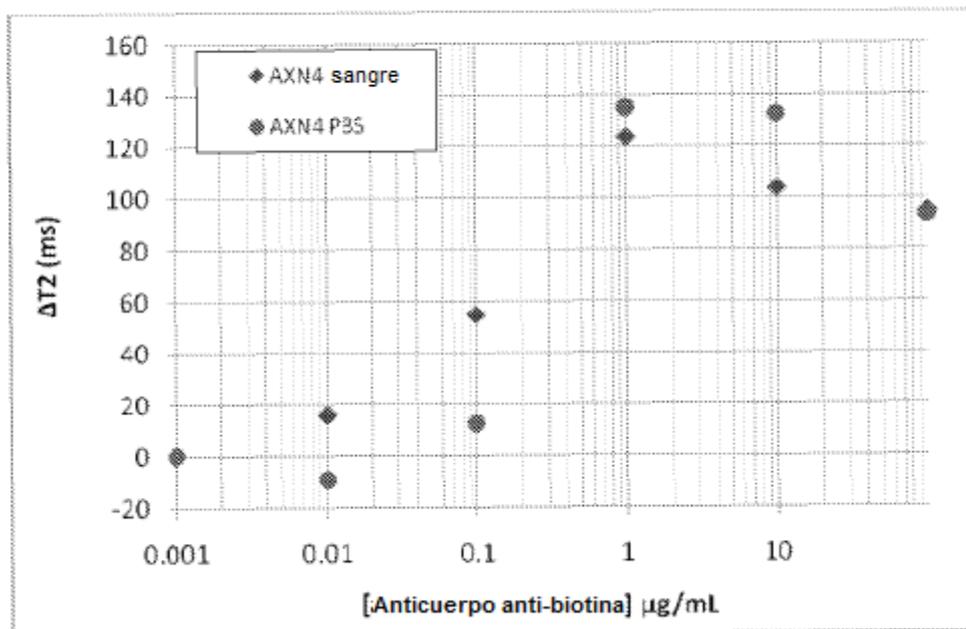


Figura 38

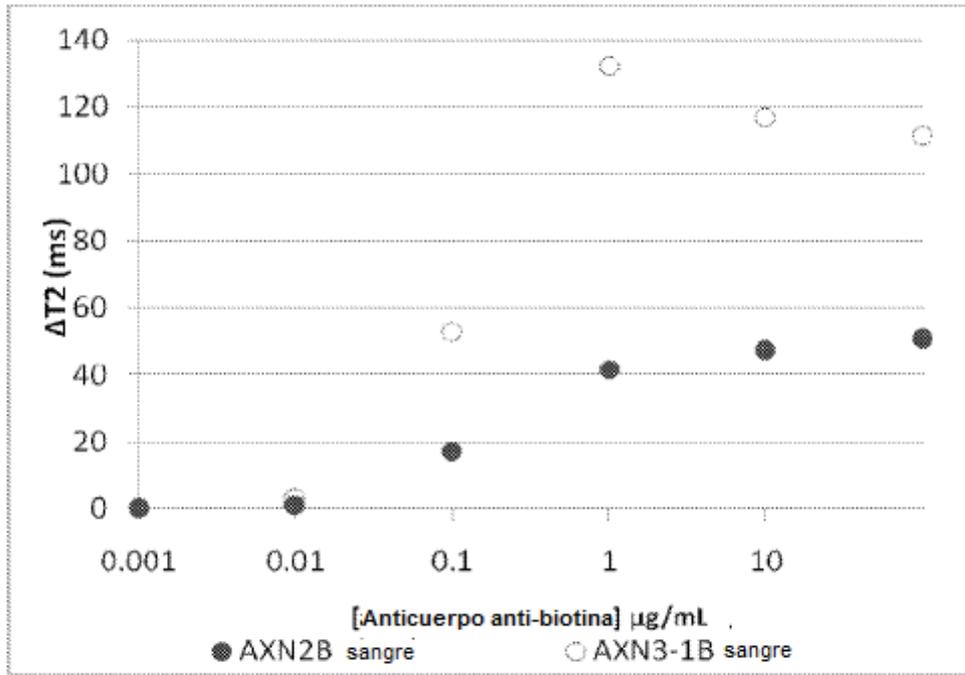


Figura 39

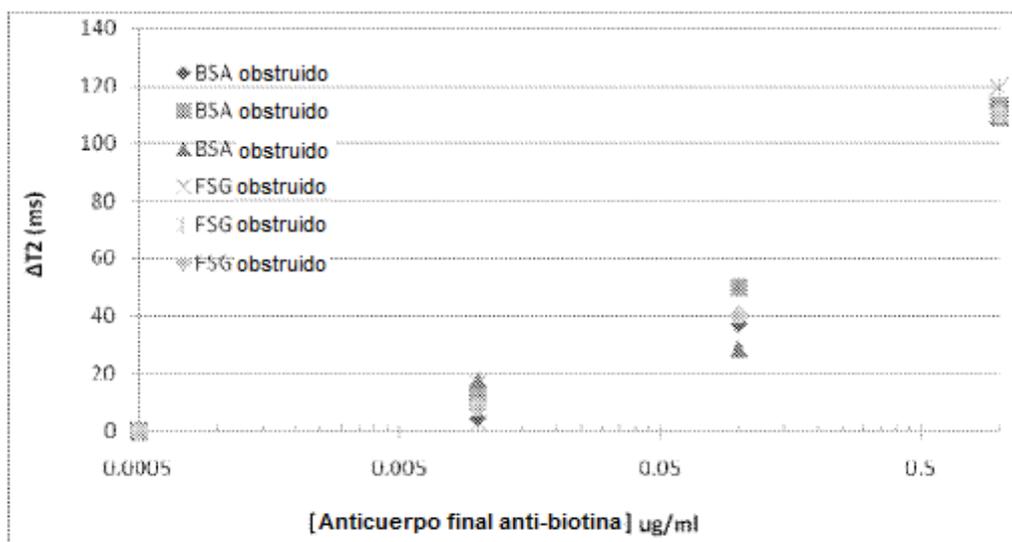
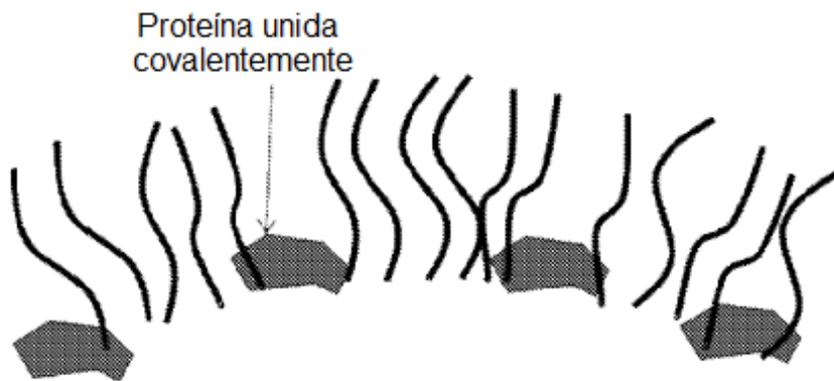


Figura 40



Superficie de partícula antes del bloque de proteína

Figura 40A



Superficie de partícula después del bloque de proteína

Figura 40B

Figure 41

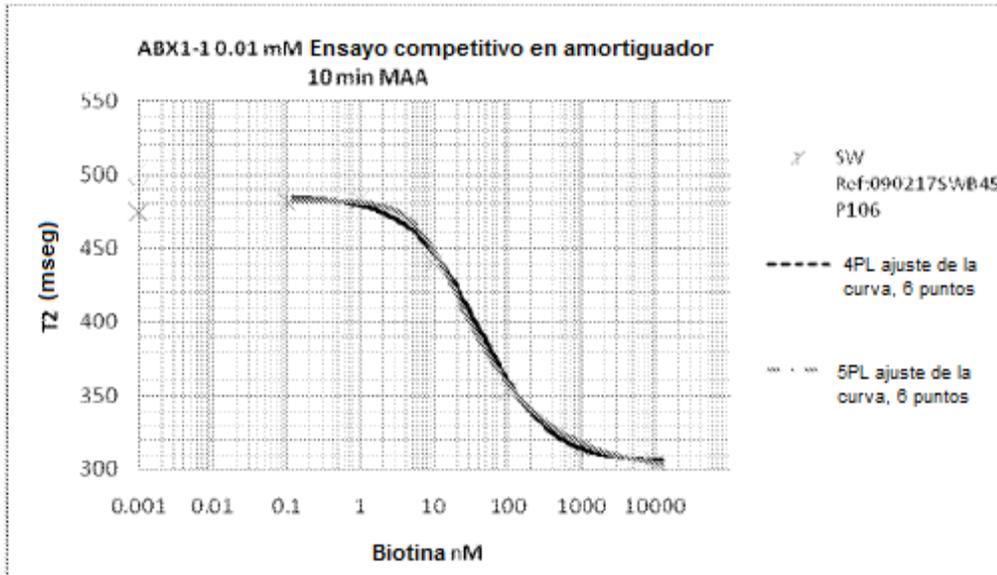


Figure 41A

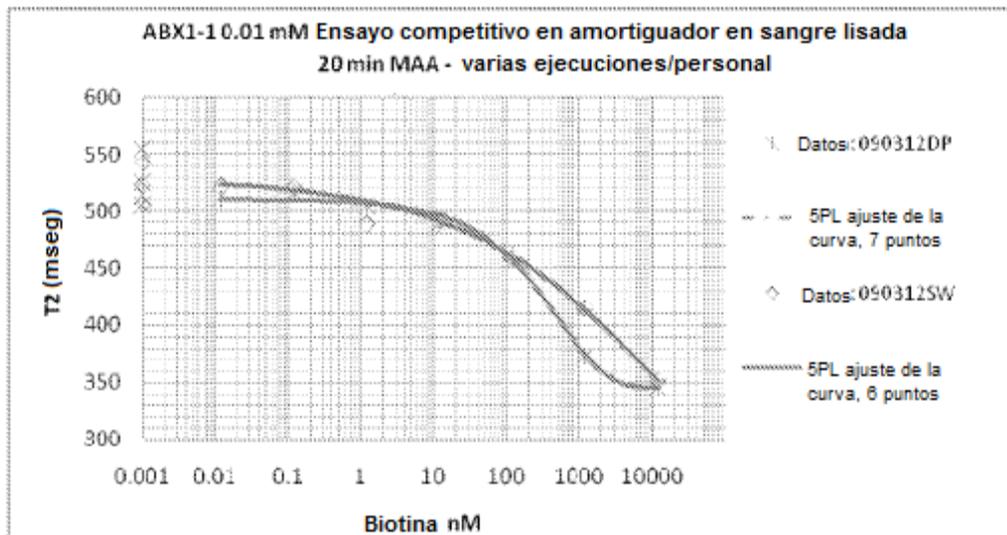


Figure 41B

Figura 42

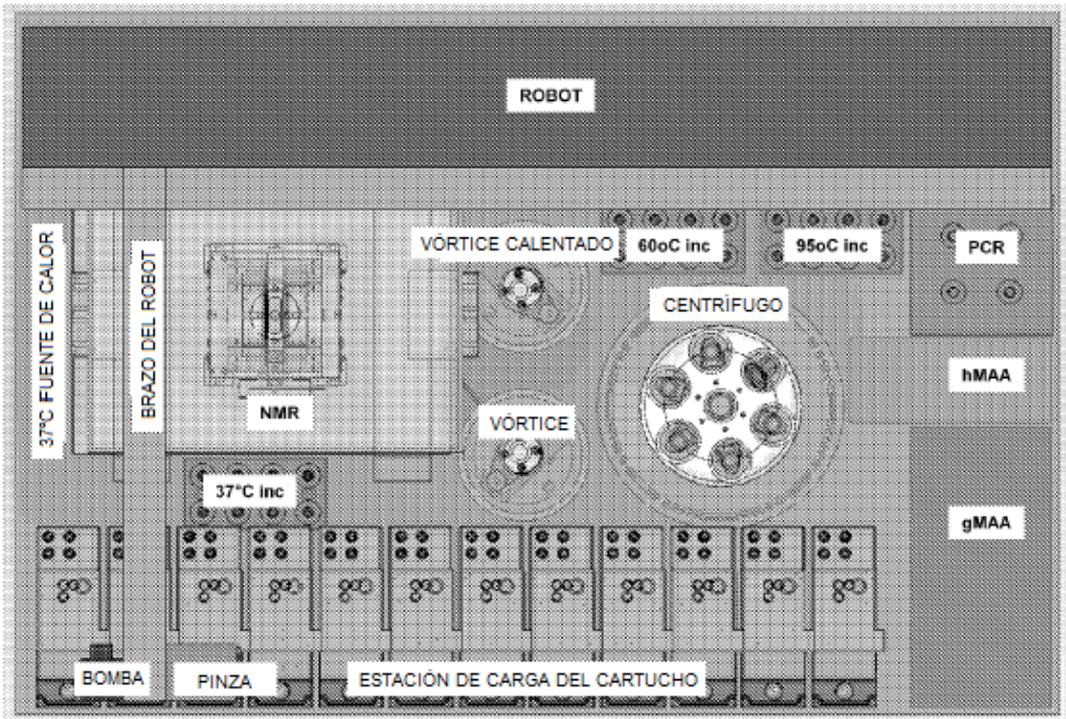


Figura 43

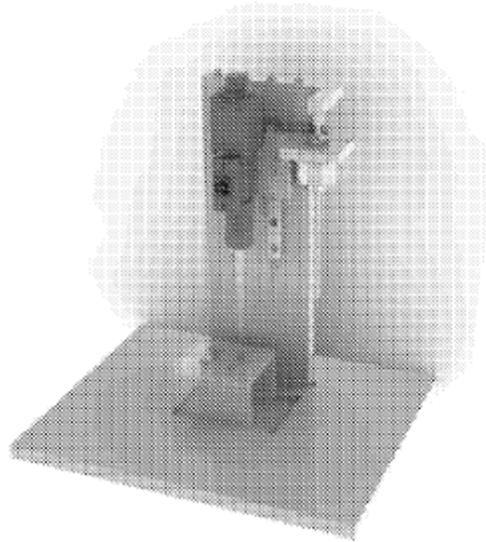


Figura 43A

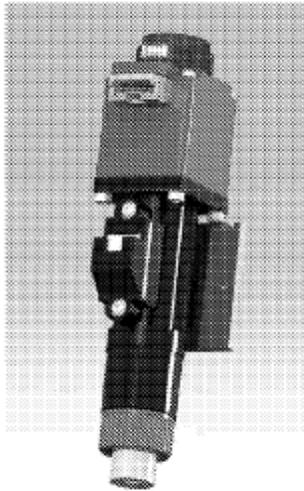


Figura 43B

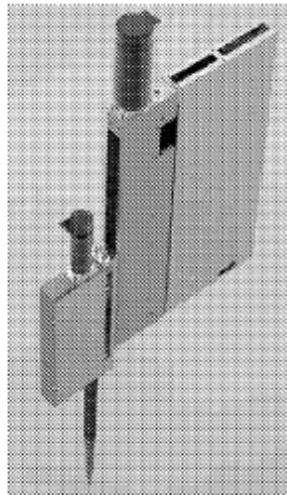


Figura 43C

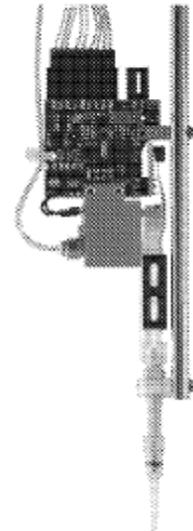


Figura 43D

Figura 44

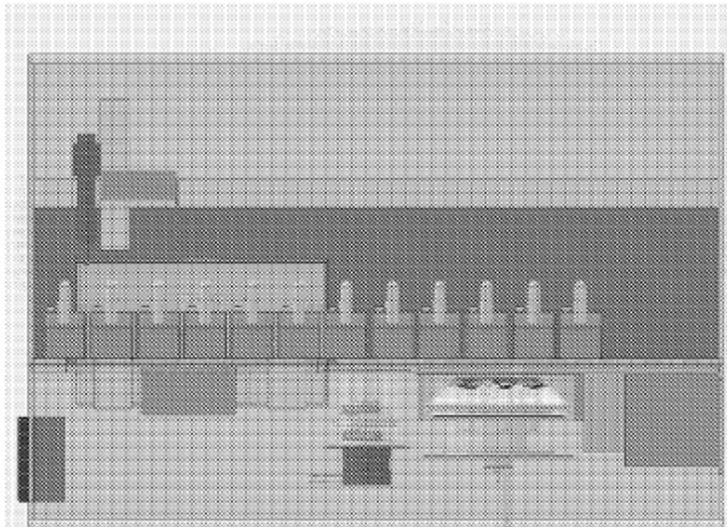
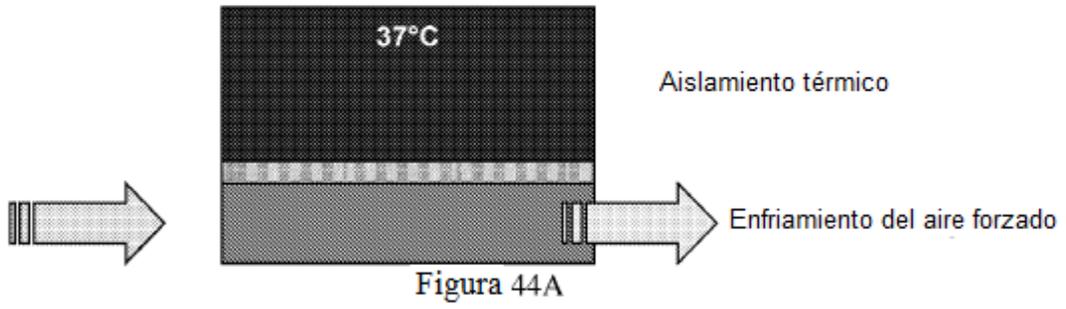


Figura 44B

Figura 45

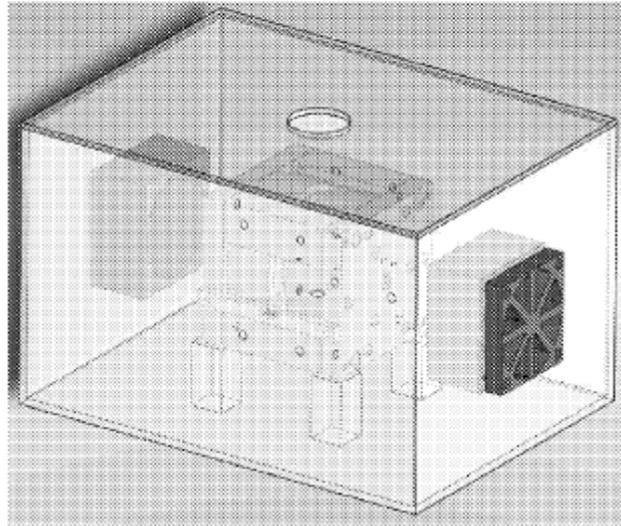


Figura 45A

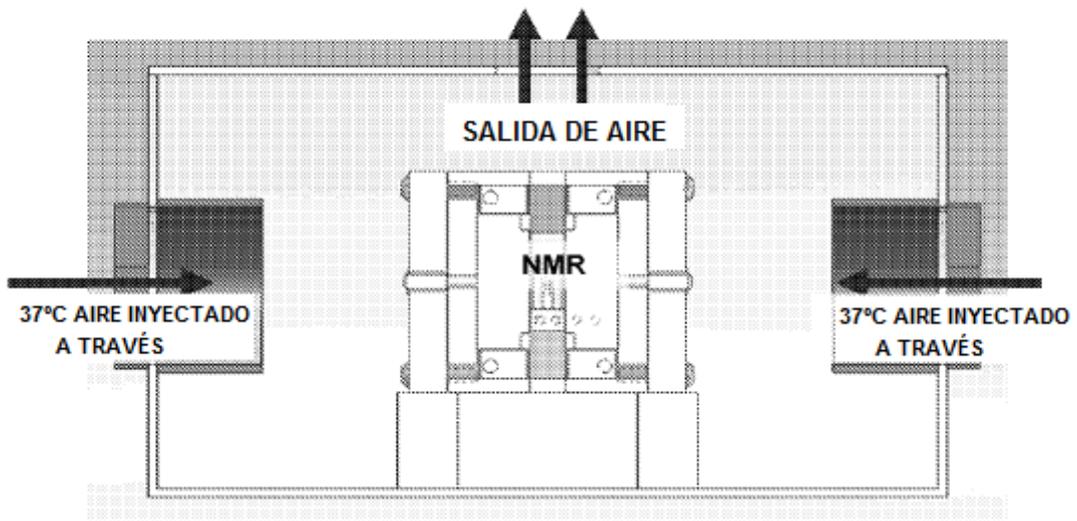


Figura 45B

Figura 46

UFC/ml	dia 1		dia 2		dia 3		dia 4		dia 5		dia 6		dia 7		dia 8	
	media	%CV	media	%CV	media	%CV	media	%CV	media	%CV	media	%CV	media	%CV	media	%CV
100000	1143	5.2	1082	7.0	1031	8.5	1078	6.6	976	4.0	952	5.3	1040	2.2	1017	4.7
10000	1133	4.4	1160	1.4	1135	5.3	1078	7.5	931	6.7	975	9.4	1036	4.5	966	4.8
1000	1114	7.6	1056	3.0	1127	3.3	1049	3.7	972	7.4	952	5.0	1017	5.7	1025	6.0
100	936	5.4	871	2.1	891	8.1	831	11.9	750	3.3	895	10.1	807	3.6	760	9.5
10	383	1.0	440	6.4	379	7.0	371	5.0	365	11.7	374	4.3	417	8.4	361	11.1
0	107	2.2	108	1.0	100	0.6	101	0.9	95	0.8	94	2.1	93	2.6	91	0.5

Figura 46A

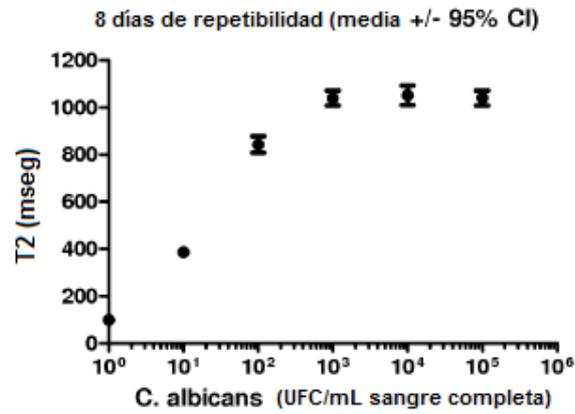


Figura 46B

Figura 47

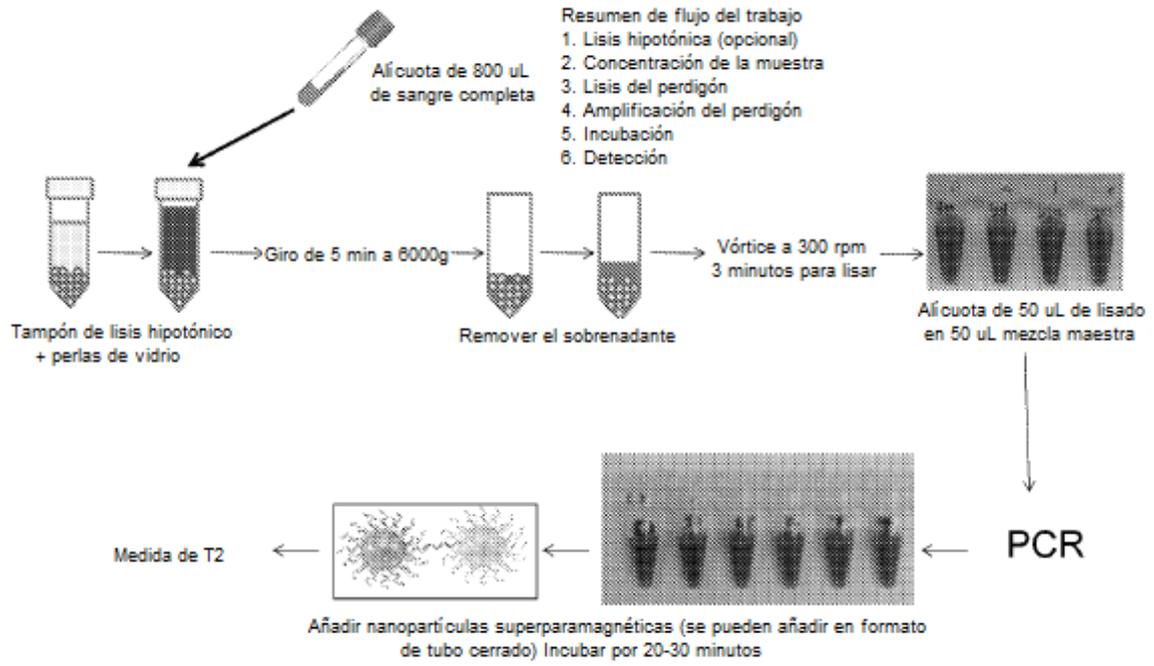


Figura 48

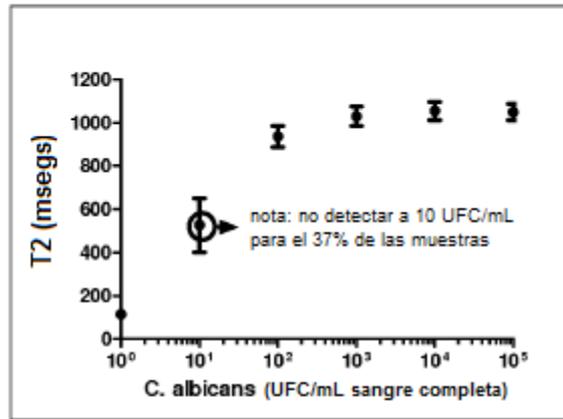


Figura 48A

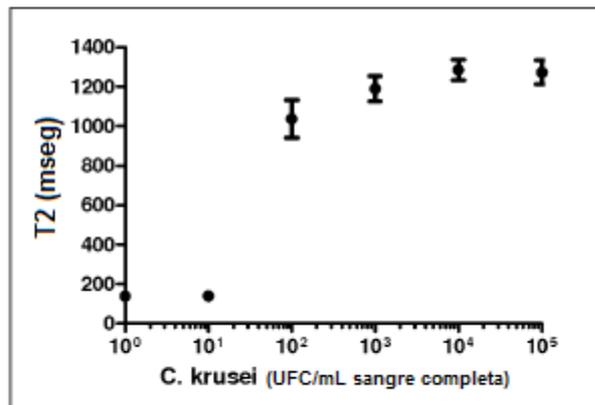


Figura 48B

Figura 49

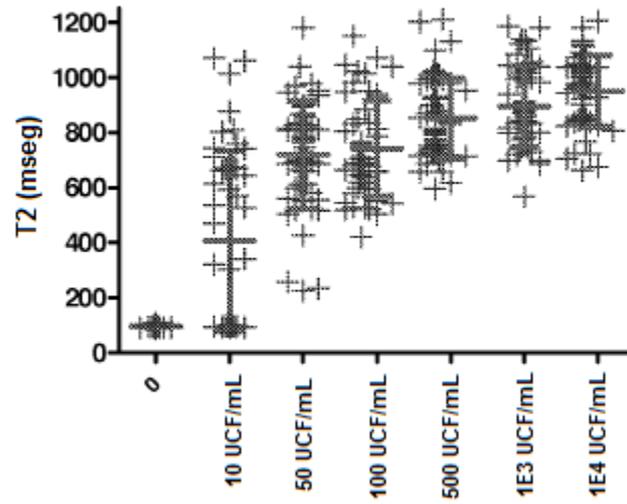


Figura 50

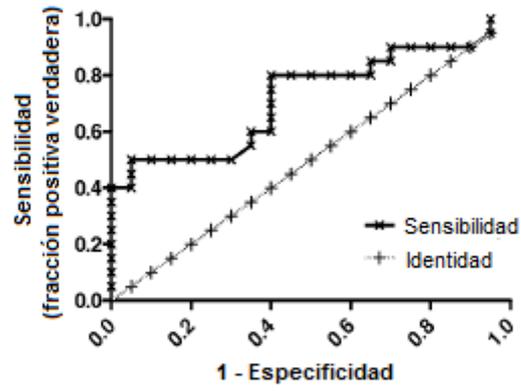


Figura 50A

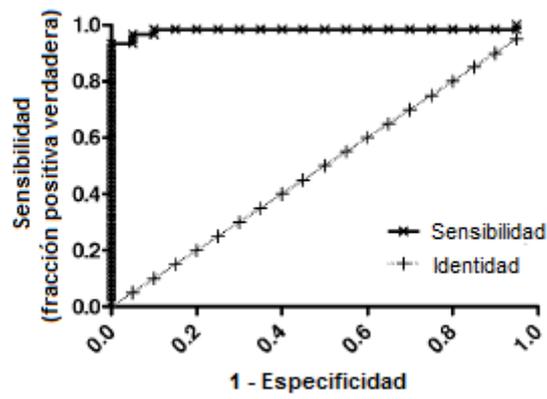


Figura 50B

Figura 51

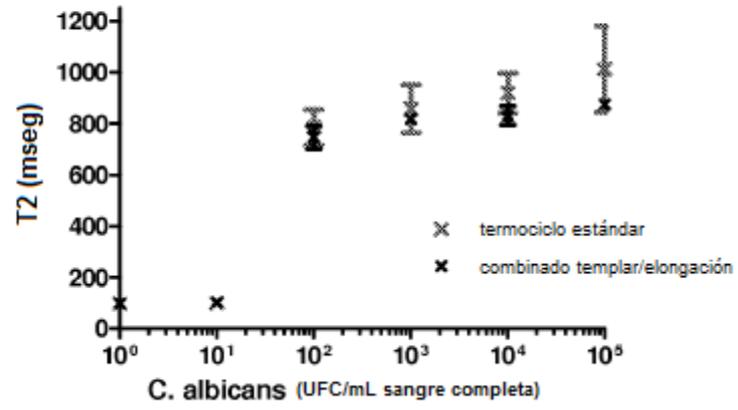


Figura 52

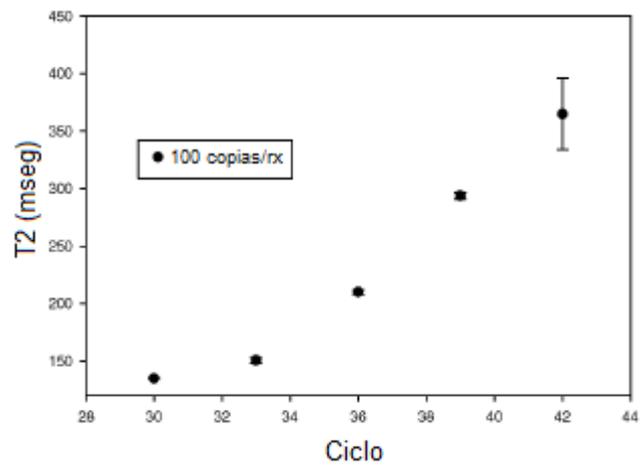


Figura 53

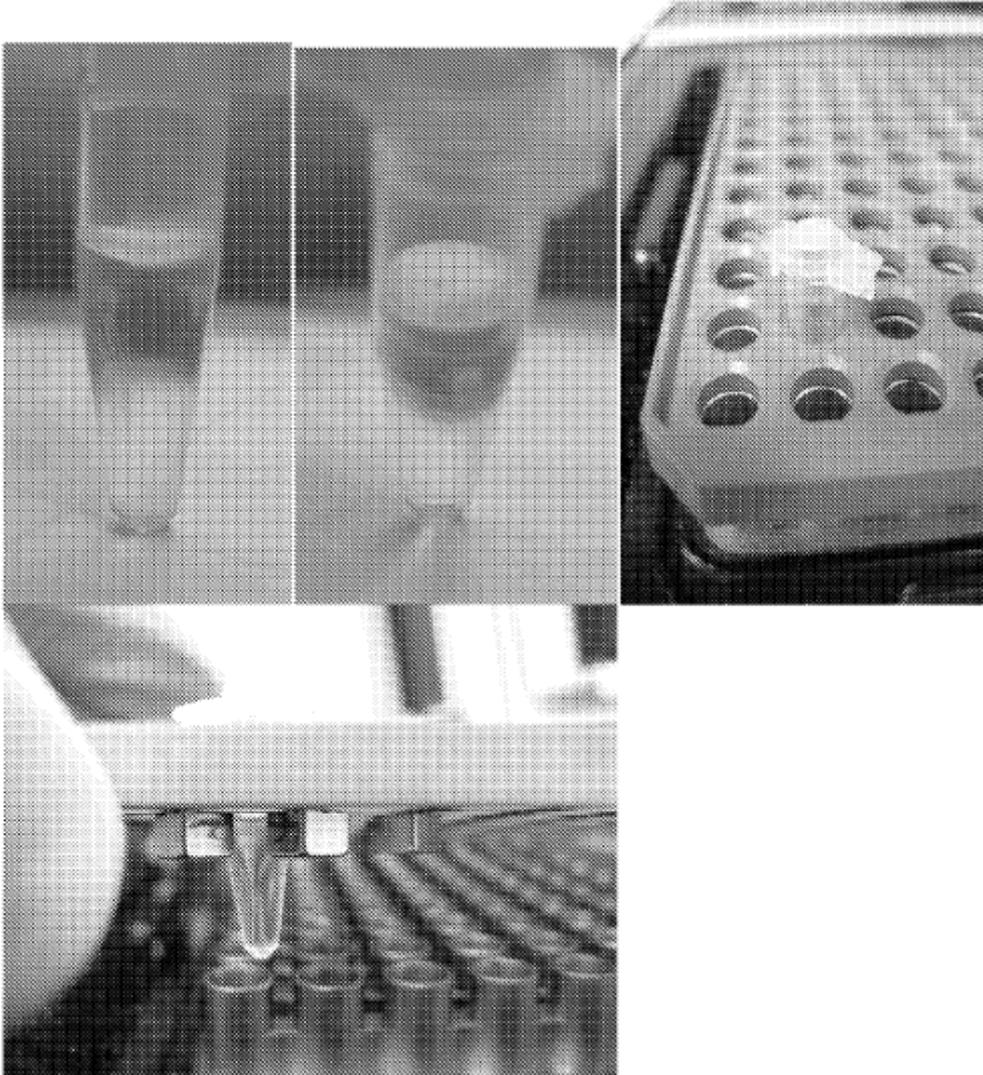
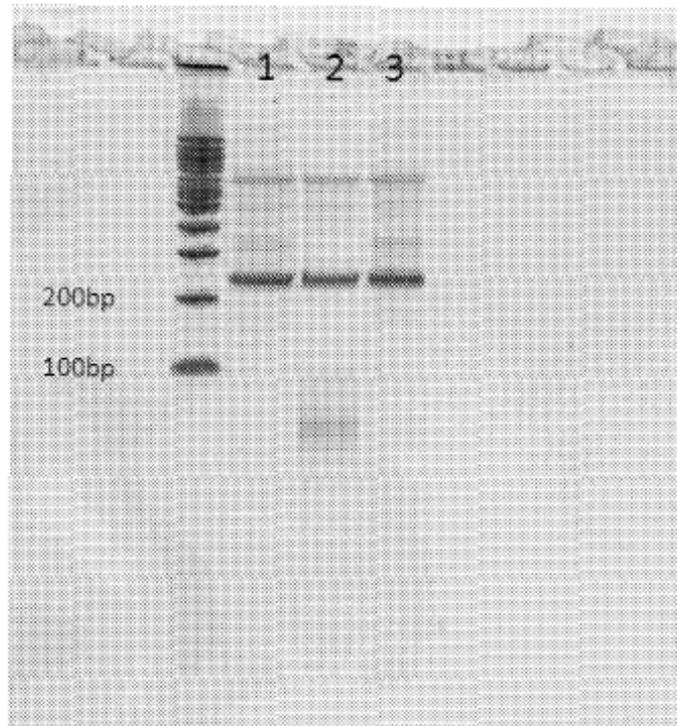
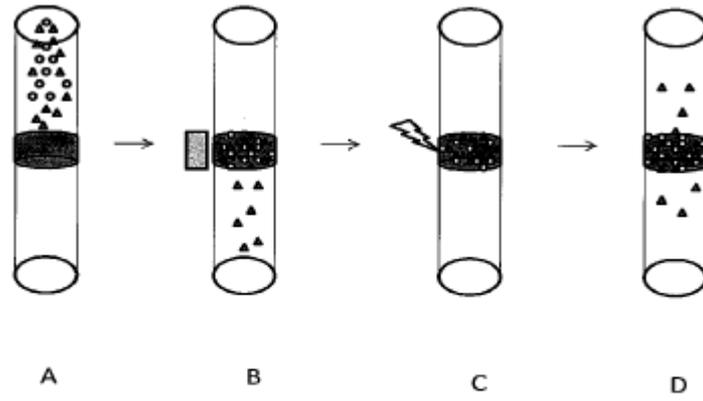


Figura 54





Figuras 55A-55D

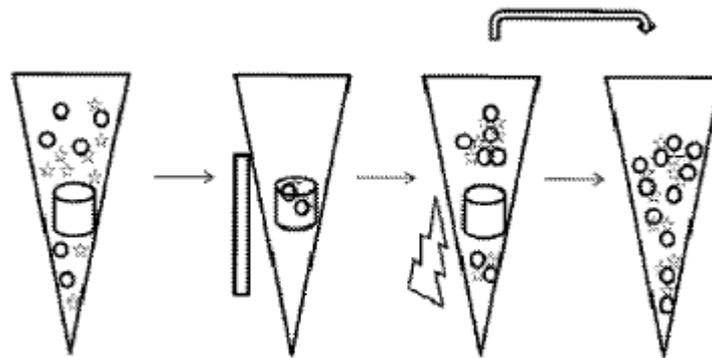


Figura 55E

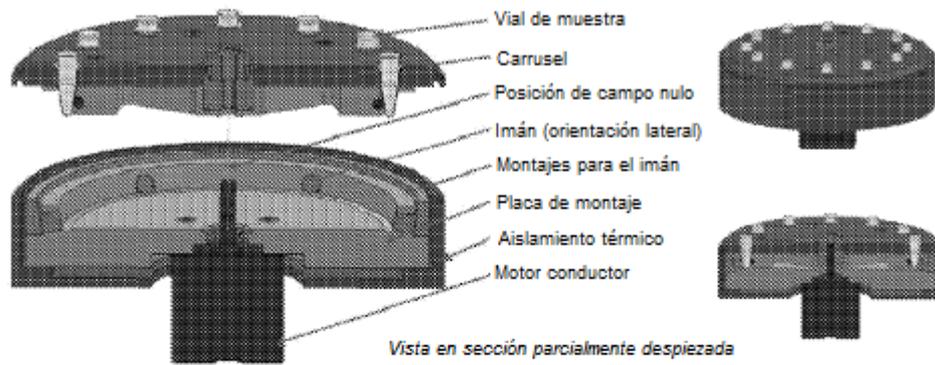


Figura 56A

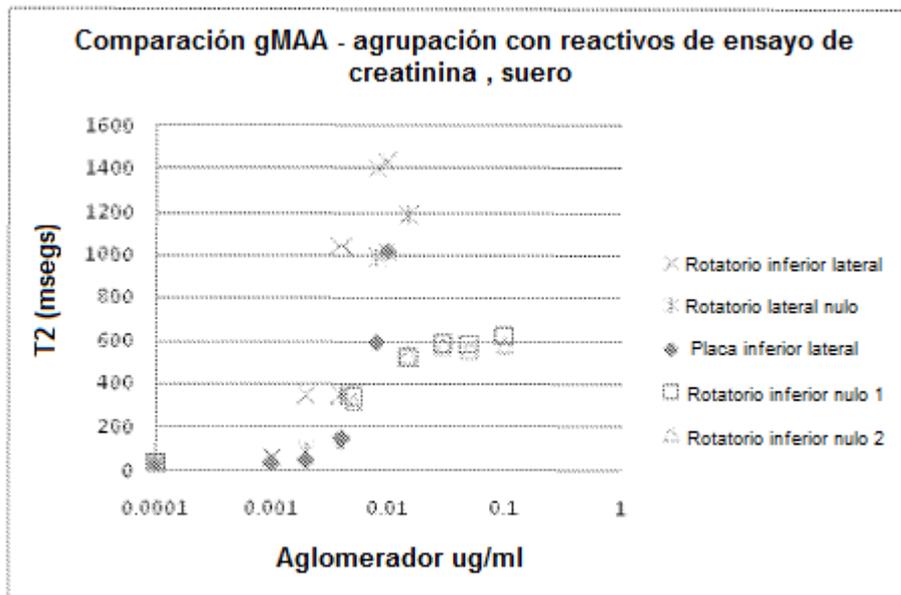


Figura 56B

Figura 57

