

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 394**

51 Int. Cl.:

G01N 11/10 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2011 E 11743272 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2588845**

54 Título: **Procedimiento de detección de interacciones moleculares**

30 Prioridad:

19.08.2010 FR 1056678

02.07.2010 FR 1002810

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

05.10.2016

73 Titular/es:

BIOFILM CONTROL (100.0%)

Biopole Clermont-Limagne

63360 Saint Beuzire, FR

72 Inventor/es:

BERNARDI, THIERRY;

MAYER, PASCAL y

GROELLY, JÉRÔME

74 Agente/Representante:

POINDRON, Cyrille

ES 2 585 394 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

Procedimiento de detección de interacciones moleculares

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento de detección de interacciones moleculares. En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento de detección de interacciones moleculares entre al menos dos sustancias que pueden interactuar entre sí.

10 La presente invención encuentra una aplicación particularmente en el campo de la investigación científica, en el campo médico, en particular en el análisis de muestras biológicas.

15 En la siguiente descripción, las referencias entre paréntesis (Ref.) corresponden a la lista de referencias presentada al final del texto.

Estado de la técnica

20 En el campo médico y analítico, hay muchas situaciones en las que es interesante, o incluso necesario, detectar eventos de interacciones entre moléculas y/u objetos tales como anticuerpos, células, bacterias, virus y macromoléculas. Por ejemplo, para detectar una contaminación bacteriana, se utiliza con frecuencia una prueba de antígeno / anticuerpo.

25 Para determinar el grupo sanguíneo de una persona, se utiliza con frecuencia una prueba de afinidad entre anticuerpos y glóbulos rojos de la persona, que permite de este modo determinar el grupo sanguíneo de dicha persona.

30 En el estado de la técnica existen métodos "sencillos" que pueden realizarse cuando las sustancias a detectar se presentan en gran número. Puede tratarse, por ejemplo, de un método que comprende una mezcla de sustancias a detectar con sustancias de afinidad, es decir, sustancias que pueden interactuar con las sustancias a detectar. Las interacciones permiten formar un precipitado o un agregado visible a simple vista y que revela el resultado. De esta manera, por ejemplo, es posible realizar la tipificación del grupo sanguíneo, añadiendo anticuerpos a una gota de sangre y observando la formación o la no formación de un agregado de glóbulos rojos.

35 También existen procedimientos que permiten medir las variaciones de viscosidad de un medio, que se producen cuando en ese medio se juntan sustancias de afinidad.

40 Por ejemplo, el documento US 3 635 678 (Ref 1) describe un procedimiento en el que una sola esfera de acero de tamaño macroscópico (muy superior a la micra) sumergida en el fluido, se pone en suspensión por un juego de imanes, midiéndose el movimiento de la esfera en suspensión mediante un sistema óptico. Cuando la viscosidad del medio aumenta, la amplitud del movimiento de la esfera disminuye a lo largo del tiempo, el objetivo es deducir la velocidad de coagulación de la sangre.

45 Un inconveniente principal de la técnica descrita en ese documento es la complejidad de su realización ya que debe mantenerse una esfera en suspensión. Por otro lado, la esfera en movimiento, debido a su tamaño y a su masa, tal como se describe en la patente, puede romper interacciones débiles en el origen de la variación de la viscosidad e impedir su detección. La sensibilidad del método es débil y se limita a la detección de variaciones de viscosidad relativamente significativas. Adicionalmente, para la lectura de los resultados deben utilizarse sistemas complejos y reactivos.

50 En el documento WO 01/86255 (Ref 2) se describe otro sistema que comprende un microscopio con el que es posible observar un movimiento de una partícula en suspensión en un líquido. La viscosidad del líquido se deduce del desfase de la segunda armónica de señal obtenida a partir de la observación de la partícula en suspensión en un líquido con el microscopio.

55 En el documento EP 1 544 536 (Ref 3) se describe otra variante de esta estrategia, que comprende la oscilación de una partícula magnetizable en un campo magnético para generar una señal y por tanto obtener un resultado.

60 El documento FR 2 866 706 describe un procedimiento que permite estudiar el desarrollo de una biopelícula en un medio de cultivo no homogéneo. Según este documento, la viscosidad del medio se determina sumergiendo al menos una partícula magnética en el cultivo, sometiendo el cultivo a un campo magnético y detectando el grado de libertad de movimiento de la partícula magnética.

65 Uno de los inconvenientes principales de estos métodos es la complejidad de su puesta en marcha y del seguimiento de la oscilación de una partícula accionada por una fuerza aplicada de manera periódica y controlada.

La instrumentación compleja, costosa y difícil de parametrizar por un lado para hacer oscilar y mantener la oscilación de la partícula, y por otro lado, para observar el movimiento periódico de la partícula.

5 Adicionalmente estos métodos solo permiten medir modificaciones de viscosidad que deben tener lugar en la zona de oscilación de la partícula en suspensión. Además las modificaciones de viscosidad deben ser significativas para que puedan detectarse. De este modo, es necesario disponer de soluciones que contengan un gran número de sustancias de afinidad. Estos procedimientos son por tanto poco sensibles y no permiten alcanzar una precisión satisfactoria para métodos que utilizan, por ejemplo, anticuerpos, u otras sustancias de afinidades dirigidas específicamente a detectar o dosificar.

10 Otro procedimiento normalmente utilizado para detectar reacciones de afinidades es la técnica ELISA y sus numerosas variaciones. Dicha técnica consiste en:

- 15 - adherir, sobre un soporte, un primer anticuerpo que presente una afinidad con una sustancia,
- poner en contacto durante un tiempo determinado la sustancia a detectar con el primer anticuerpo adherido sobre su soporte,
- retirar por aclarado la sustancia que no haya reaccionado con el anticuerpo,
- poner en contacto la sustancia unida a los anticuerpos adheridos en la superficie y un segundo anticuerpo que presente una afinidad con dicha sustancia,
- 20 - retirar por aclarado los anticuerpos que no hayan reaccionado con la sustancia, y
- detectar la presencia del segundo anticuerpo unido a la sustancia unida al primer anticuerpo unido al soporte.

25 Muy a menudo, el segundo anticuerpo está unido a un marcador que es detectable directamente por un método físico, por ejemplo un marcador fluorescente o magnético, o un marcador unido a una enzima, por ejemplo la fosfatasa alcalina o la peroxidasa de rábano picante, para detectar el producto de la reacción catalizada por la enzima a partir de un sustrato adecuado.

30 Este procedimiento presenta varios inconvenientes, por ejemplo, requiere numerosos lavados controlados que disminuyen su sensibilidad. También comprende numerosas etapas de manipulación por el experto en la materia; la realización de al menos dos reacciones de afinidad; el marcaje obligatorio del segundo anticuerpo con, al menos un marcador sensible y sofisticado, la utilización de un dispositivo complejo y difícil de parametrizar para detectar y cuantificar la señal emitida por el marcador. Este procedimiento es por tanto largo, costoso y necesita una instrumentación compleja para su aplicación.

35 Se han desarrollado otros métodos para detectar una reacción de afinidad que tan solo requiere un anticuerpo, por ejemplo técnicas, basadas en la resonancia de plasmón superficial ("*plasmon surface resonance*"), balanzas piezoeléctricas, es decir, una simple observación al microscopio para determinadas sustancias que lo permitan. Para hacer esto, el anticuerpo se fija sobre un soporte que sea adecuado a la técnica de detección, la sustancia se pone en contacto durante un tiempo determinado con el anticuerpo fijado sobre el soporte, después se realiza la lectura directamente o tras un aclarado para eliminar las sustancias que no hayan reaccionado por afinidad con los anticuerpos.

45 Estos métodos presentan numerosos inconvenientes, por ejemplo, el instrumento necesario para realizar la lectura es sofisticado y costoso. Además requieren soportes particulares para la fijación de dichos anticuerpos. Por otro lado, requieren un gran número de etapas y dependen de la calidad y de la cantidad de anticuerpos fijados.

50 En los métodos anteriormente indicados, es por tanto esencial adherir el anticuerpo, o cualquier otra sustancia de afinidad, sobre un soporte. En el estado de la técnica se conocen superficies de afinidad. Dichas superficies pueden obtenerse, por ejemplo, por "moldeado molecular".

55 También se sabe que los procedimientos anteriormente citados pueden realizarse fijando, de manera inespecífica sobre un soporte, la sustancia que quiere detectarse. La sustancia así fijada se pondrá en contacto con un anticuerpo, o con cualquier otra sustancia de afinidad adecuada, marcada o no marcada, según el procedimiento de detección, después eventualmente de aclarar antes de proceder a la lectura.

60 No obstante, estas variantes presentan numerosos inconvenientes. En particular, se requiere unir la sustancia a detectar sobre el soporte, lo que no es posible de manera universal ni específica. Adicionalmente, esta fijación puede modificar la estructura de la sustancia fijada. Esta modificación de la estructura puede alterar la sensibilidad y/o la especificidad de la detección, en particular cuando se utilizan anticuerpos. Adicionalmente, la fijación puede conducir a la obtención de resultados falsos negativos y/o falsos positivos. Adicionalmente, la fijación puede ser diferente de una aplicación a otra, pudiendo por tanto ser, los resultados así obtenidos, no reproducibles. Además, para la detección se requieren dispositivos complejos y costosos.

65 Por tanto, existe una necesidad real de encontrar un procedimiento de detección de interacciones moleculares que palle estos defectos, inconvenientes y obstáculos de la técnica anterior, en particular un procedimiento que permita

mejorar la sensibilidad de detección de interacciones moleculares, reducir los costes de aplicación, un procedimiento cuya aplicación sea sencilla y que permita obtener resultados rápidos, fiables y reproducibles.

Descripción de la invención

5 El objeto exacto de la presente invención es responder a las numerosas necesidades e inconvenientes anteriormente citados de la técnica anterior proporcionando un procedimiento de detección de interacciones moleculares.

10 En particular la presente invención tiene por objeto un procedimiento de detección de interacciones en una solución que comprende las siguientes etapas:

a. introducir en una solución al menos una primera sustancia y preferentemente al menos una segunda sustancia que puede interactuar con dicha primera sustancia,

15 b. introducir en la solución obtenida en la etapa a) de 2 a 10.000.000 partículas magnéticas o magnetizables reposando dichas partículas sobre una superficie sumergida en dicha solución, teniendo dichas partículas un tamaño comprendido entre 10 nm a 100 μm ,

20 c. determinar la interacción de dichas sustancias por aplicación de un campo eléctrico, magnético o electromagnético con el fin de poner en movimiento dichas partículas, detectándose la interacción entre dichas sustancias cuando la movilidad de dichas partículas sobre dicha superficie se modifica.

25 De acuerdo con la invención, por movilidad se entiende el movimiento de las partículas por aplicación y/o bajo el efecto de campo eléctrico, magnético o electromagnético. Esta movilidad puede definirse, por ejemplo, a partir de la relación entre la velocidad de las partículas en un punto del espacio dado y la intensidad de gradiente del cuadrado del campo magnético en ese lugar del espacio dado, por ejemplo, a partir de relación entre la velocidad de las partículas en un punto del espacio dado y la intensidad de gradiente del potencial eléctrico en este lugar del espacio dado.

30 De acuerdo con la invención, la modificación de la movilidad puede seleccionarse entre una ralentización, una desaceleración, una modificación de la trayectoria, una aceleración o una detención de dichas partículas.

35 De este modo, de acuerdo con la invención, la aplicación de campo eléctrico, magnético o electromagnético puede provocar o no un reagrupamiento o una dispersión de dichas partículas.

40 De acuerdo con la invención, por interacción de sustancias se entiende, por ejemplo, una interacción molecular, por ejemplo, interacciones de tipo enlace de hidrógeno, iónico, van der Waals, una interacción biológica, por ejemplo, interacciones de reconocimiento de motivos tridimensionales específicos de tipo hormona-receptor, anticuerpos-antígenos, una interacción electrostática, una interacción magnética, un gradiente de concentración de iones o de moléculas, en otros términos, cualquier gradiente de potencial, de concentración molecular o iónica que encuentre su origen a nivel de sustancias y que tienda a hacer que se aproximen o se repelan, por ejemplo, mediante enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals, enlaces hidrófobos, enlaces covalentes, enlaces iónicos, por ejemplo, mediante movimiento de quimiotaxis. Puede tratarse, por ejemplo, de una interacción antígenos-anticuerpos, enzimas-sustratos, receptores-ligandos, moléculas-células, células-vectores, células-virus, células eucariotas-células procariontas, células eucariotas-células eucariotas, células procariontas-células procariontas.

50 La solución que puede de utilizarse en la presente invención puede ser una solución líquida o un gas. La solución puede ser cualquier solución conocida por el experto en la materia. Puede tratarse, por ejemplo, de un medio de cultivo, por ejemplo un medio de cultivo de células eucariotas y/o procariontas, un medio tampón, por ejemplo cualquier medio tampón conocido por el experto en la materia, por ejemplo, un medio de tampón disponible en el comercio, por ejemplo, tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés), una muestra biológica, por ejemplo, una muestra de sangre, de plasma, de orina, de líquido cefalorraquídeo, una solución salina, por ejemplo una solución fisiológica, un medio de cultivo, por ejemplo infusión de corazón y cerebro disponible en el comercio, un disolvente, por ejemplo, acetona, dimetilsulfóxido, etanol, metanol, propanol, acetonitrilo, acetato de etilo, éter, fenol, cloroformo, tetrahidrofurano, difluoroetileno, y/o un hidrocarburo, por ejemplo hexano, ciclohexano, benceno, octano, decano, petróleo, gasolina, gasoil.

60 De acuerdo con la invención, el gas puede ser, por ejemplo, aire, oxígeno, nitrógeno, neón, argón, gas carbónico, metano, ozono.

De acuerdo con la invención una solución líquida puede tener una masa volúmica de 0,1 a 4 kg/l, de 0,3 a 3 kg/l; una solución gaseosa puede tener una densidad de 10^{-15} kg/m³ a 1000 kg/m³, de 10^{-10} a 30 kg/m³ de 10^{-5} a 3 kg/m³.

65 A través de estos conocimientos generales, el experto en la materia sabrá determinar fácilmente la masa volúmica de una solución. Por ejemplo, la medida de la masa volúmica de la solución puede realizarse, por ejemplo, midiendo la proporción de la masa sobre el volumen, por ejemplo, pesando una solución de volumen conocido.

De acuerdo con la invención, la solución puede tratarse previamente, por ejemplo, la solución puede purificarse, diluirse, concentrarse.

5 De acuerdo con la invención, la solución puede purificarse mediante cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia, por ejemplo, por diálisis, filtración, ultrafiltración, clarificación y por centrifugación. Por ejemplo, el procedimiento de filtración puede comprender pasar la solución sobre un tamiz con poros de 0,2 a 100 μm , pudiendo el procedimiento de ultrafiltración comprender, por ejemplo, una centrifugación a una velocidad de 1 a 3000 vueltas por minuto durante un tiempo de 0,1 a 30 minutos, el procedimiento de diálisis puede ser, por ejemplo, un procedimiento que comprenda una etapa de depósito de la solución sobre una membrana de diálisis, por ejemplo, a un umbral de corte de 500 Da, flotando dicha membrana sobre agua destilada contenida en un recipiente. El procedimiento de clarificación puede ser, por ejemplo, un procedimiento que comprenda la adición de 0,1 % (peso/peso) de albúmina de suero bovino en la solución.

15 De acuerdo con la invención, la purificación de la solución puede permitir, ventajosamente, eliminar de la solución cualquier contaminante y/o moléculas que puedan alterar la detección de la interacción molecular, por ejemplo, la purificación puede permitir eliminar independientemente bacterias, virus, proteínas, moléculas químicas, sales, granos de materias, agregados de moléculas. Naturalmente, el experto en la materia, a través de estos conocimientos generales, sabrá adaptar el procedimiento de purificación en función de la solución.

20 De acuerdo con la invención, la solución también puede diluirse, por ejemplo, mediante cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia, por ejemplo, por dilución en serie. La dilución puede realizarse con cualquier diluyente conocido por el experto en la materia. Puede tratarse, por ejemplo, de una solución tampón, por ejemplo, tampón de fosfato salino, una solución salina, por ejemplo suero fisiológico, etanol, DMSO, acetona, hexano y/o cualquier disolvente, hidrocarburo o solución descrita anteriormente.

25 La solución puede diluirse, por ejemplo, a un factor de 2 a 20.000, de 5 a 500, de 5 a 50.

30 La dilución de la solución puede permitir, ventajosamente, modificar la concentración de los componentes presentes en la solución, por ejemplo, disminuyendo la concentración, por ejemplo, la dilución puede permitir disminuir la concentración proteica. La dilución puede permitir de este modo disminuir la concentración de eventuales compuestos interferentes y así ventajosamente mejorar la especificidad y/o la sensibilidad del procedimiento de la invención.

35 De acuerdo con la invención, la solución también puede concentrarse, por ejemplo, mediante cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia, por ejemplo, por ultracentrifugación, ultrafiltración, evaporación, liofilización.

40 De acuerdo con la invención, la purificación, dilución y/o concentración de dicha solución puede permitir, ventajosamente, ajustar la masa volúmica de dicha solución.

El ajuste de la masa volúmica de la solución permite mejorar, ventajosamente, la especificidad y/o la sensibilidad del procedimiento de la invención, particularmente aumentando, disminuyendo o anulando el efecto de la fuerza de la gravedad que dirige a las partículas hacia la superficie.

45 De acuerdo con la invención, el volumen de la solución utilizado en el procedimiento puede ser, por ejemplo, de 0,3 μl a 100 ml, de 3 μl a 100 ml, de 30 μl a 1 ml.

50 De acuerdo con la invención, la solución puede ser susceptible de modular la interacción entre dichas primera y segunda sustancias. Por ejemplo, la solución puede aumentar o disminuir la interacción entre dichas sustancias.

55 De acuerdo con la invención, la solución puede comprender, ventajosamente, un compuesto que aumente o disminuya la interacción entre dichas primera y segunda sustancias. El compuesto puede añadirse a la solución, por ejemplo, antes de realizar el procedimiento de la invención. El compuesto puede ser, por ejemplo, moléculas químicas, sales, iones, polímeros de macromoléculas, coloides, micropartículas, por ejemplo, ácidos y bases que modifican el pH de la solución, por ejemplo, NaCl que modifica la fuerza iónica de la solución, por ejemplo, polietilenglicol que puede, por ejemplo, aumentar la afinidad de dichas sustancias.

60 La presente invención permite, ventajosamente, determinar si dicha solución modula realmente la interacción, comparando los resultados obtenidos por el procedimiento de la invención en el que las sustancias son idénticas con soluciones diferentes.

65 De acuerdo con la invención la primera sustancia puede seleccionarse del grupo que comprende células eucariotas, células procariotas, membranas, virus, priones, mitocondrias, cloroplastos, vesículas, liposomas, constituyentes celulares, flagelos, proteínas, lipoproteínas, glucoproteínas, anticuerpos, ácidos nucleicos, complejos lipídicos, coloides, macromoléculas, micropartículas, nanopartículas, antígenos, hormonas, ligandos de proteínas y moléculas químicas.

De acuerdo con la invención, las células eucariotas que pueden utilizarse en la presente invención pueden ser, por ejemplo, células eucariotas de animales, por ejemplo, células de sangre, por ejemplo, leucocitos, por ejemplo, granulocitos, neutrófilos polinucleares; eosinófilos polinucleares; basófilos polinucleares; linfocitos B, linfocitos T, linfocitos citolíticos naturales (NK, por las siglas en inglés *Natural Killer*), monocitos, eritrocitos, trombocitos. También puede tratarse de células eucariotas vegetales, por ejemplo, células de la epidermis vegetal, del xilema, floema, parénquima, colénquima, esclerénquima. También puede tratarse de hongos, levaduras. Puede tratarse, por ejemplo, de *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Pityrosporum*, *Pneumocystis*, *Epidermo-phyton*, *Microsporium*, *Trichophyton*. También puede tratarse de protozoos, por ejemplo, *Entamoeba histolytica*, *Acanthamoeba castellanii*, *Naegleria fowleri*.

De acuerdo con la invención, las células procariotas pueden ser, por ejemplo, cualquier bacteria conocida por el experto en la materia. Las bacterias que pueden utilizarse en la presente invención son, por ejemplo, bacterias comprendidas en el grupo, sin limitarse al mismo, constituido por *Acetobacter aurantium*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides melaninogenicus*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Branhamella catarrhalis*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Calymmatobacterium granulomatis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Clostridium welchii*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium fusiforme*, *Coxiella burnetii*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus maloratus*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus pertussis*, *Haemophilus vaginalis*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Klebsiella oxytoca*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Legionella pneumophila*, *Methanobacterium extroquens*, *Microbacterium multiforme*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium diphtheriae*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium lepraemurium*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia asteroides*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella tularensis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas maltophilia*, *Rhizobium radiobacter*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia mooseri*, *Rickettsia psittaci*, *Rickettsia quintana*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia trachomae*, *Rochalimaea henselae*, *Rochalimaea quintana*, *Rothia dentocariosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus avium*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus gallinarum*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus mitior*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus*, *Treponema pallidum*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio comma*, *Vibrio parahemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Xanthomonas maltophilia*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis* y *Yersinia pseudotuberculosis*, etc.

Las membranas que pueden utilizarse en la presente invención pueden ser cualquier fragmento de membranas de células eucariotas, procariotas, por ejemplo, células procariotas o eucariotas anteriormente citadas, cualquier fragmento de membrana celular y/o de compartimento celular, por ejemplo mitocondrias, cloroplastos, endoplastos, retículo endoplasmático.

Las proteínas que pueden utilizarse en la presente invención pueden ser proteínas plasmáticas, proteínas celulares, proteínas bacterianas. Por ejemplo, las proteínas pueden ser hormonas, por ejemplo, progesterona, vasopresina, hormona tirotrópica, hormona luteinizante (LH) hormona estimulante de la tiroides (TSH), hormona del crecimiento (GH), factor de crecimiento epidérmico (EGF), insulina, oxitocina. Puede tratarse, por ejemplo, de canales, por ejemplo canales de calcio, por ejemplo, los canales descritos en Catterall WA. (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 16: 521-55 (Ref 4), canales de potasio, por ejemplo, los canales descritos en Dick GM y Tune JD, Role of potassium channels in coronary vasodilation, Exp Biol Med (Maywood). Enero 2010; 235(1): 10-22. (Ref 6). También puede tratarse de péptidos implicados en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), por ejemplo, el CMH I y/o el CMH II. También puede tratarse de receptores, por ejemplo, receptores nucleares, intracelulares, de membrana, transmembrana, acoplados a proteínas G, receptores de acetilcolina, receptor de la FSH, receptor de testosterona, por ejemplo, los receptores descritos en Mostallino MC y colaboradores Plasticity and function of extrasynaptic GABA(A) receptors during pregnancy and after delivery, Psychoneuroendocrinology. Dic. 2009; 34 Supl 1: S74-83 (Ref 7). También puede tratarse de enzimas, por ejemplo, enzimas bacterianas, por ejemplo, enzimas de restricción, por ejemplo, HindIII, Eco RI, BamHI, MstII, TaqI, NotI, HinfI, AluI, BglIII, HaeII, HhaI, PstI, SmaI, enzimas implicadas en la señalización celular, por ejemplo, proteína quinasas, enzimas implicadas en la biosíntesis, por ejemplo, en la biosíntesis de ácidos grasos, fosforilasas, deshidrogenasas, por ejemplo, glucosa deshidrogenasa, enzimas implicadas en el metabolismo general, por ejemplo, aldehído deshidrogenasa, alfa-amilasa, L-gluconolactona oxidasa, rodopsina, citocromo B, citocromo C.

También puede tratarse de proteínas estructurales, por ejemplo, actina, miosina, peptina, albúmina, colágeno, histona H4.

Los anticuerpos que pueden utilizarse en la presente invención pueden ser cualquier anticuerpo conocido por el experto en la materia. Por ejemplo, puede tratarse de cualquier anticuerpo disponible en el comercio, por ejemplo, las IgG, IgA, IgM, IgE e IgD, los anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos dirigidos contra una de las proteínas anteriormente citadas, anticuerpos dirigidos contra otros anticuerpos por ejemplo, anticuerpos de conejo dirigidos contra anticuerpos humanos, por ejemplo, anticuerpos dirigidos específicamente contra anticuerpos dirigidos contra el receptor de la FSH. También pueden tratarse de anticuerpos obtenidos después de la inmunización de un individuo, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento *Biologie cellulaire et moléculaire, Concepts et expériences*, 2ª edición 2004, Gerald Karp (Ref 5). Puede, por ejemplo, de anticuerpos producidos por un ser humano o un animal en respuesta a una infección, por ejemplo, por un virus, una bacteria, un prión, un parásito, un protozoo, pero también respuesta a una enfermedad, por ejemplo, un cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, como por ejemplo, la enfermedad de Basedow, la esclerosis en placas, pero también en respuesta a una intoxicación, a un envenenamiento, a una contaminación, a un estímulo, a una ingestión, a una inhalación y a una inyección, por ejemplo, por un pesticida, un veneno, un insecticida, un herbicida, un agente alergizante, pero también en respuesta a un injerto, por ejemplo, de médula ósea, de órganos, como por ejemplo, un riñón, un pulmón, un hígado, un miembro, como por ejemplo, una mano, una pierna, un pie, pero también en respuesta a un implante de órgano artificial, una cámara implantable, un marcapasos, un corazón artificial, una cadera artificial.

Las moléculas químicas que pueden utilizarse en el procedimiento de la invención pueden ser cualquier molécula química conocida por el experto en la materia. Puede tratarse, por ejemplo, de un reactivo de coagulación, de un reactivo descrito en el documento, de una hormona, por ejemplo, hormonas esteroideas, por ejemplo, cortisol, aldosterona, progesterona, dehidroepiandrosterona (DHEA), sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS), estradiol, adrostenediona, dihidrotestosterona (DHT), estrona, estriol, testosterona, por ejemplo, tiroxina, por ejemplo hormonas peptídicas, por ejemplo eritropoyetina (EPO), glucagón, somatostatina, péptido natriurético auricular (ANP), corticotropina (ACTH).

De acuerdo con la invención, la primera sustancia puede estar presente en la solución, en este caso, no es necesario introducir la primera sustancia en la solución.

De acuerdo con la invención, dicha primera sustancia puede fijarse previamente sobre la superficie sumergida. El procedimiento de fijación de la primera sustancia que puede utilizarse en la presente invención puede ser cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia. Naturalmente, a través de estos conocimientos generales, el experto en la materia sabrá seleccionar el procedimiento de fijación en función de la primera sustancia.

Según la invención, cuando la primera sustancia se fija, la interacción molecular con dicha segunda sustancia, modifica la superficie sumergida y, por ejemplo, puede densificar esta superficie sobre la cual reposa dicha partícula frenando así el desplazamiento de dicha partícula cuando se aplica el campo eléctrico, magnético o electromagnético, revelando de este modo la interacción.

De acuerdo con la invención, la segunda sustancia puede ser cualquier sustancia definida anteriormente capaz de interactuar con la primera sustancia.

De acuerdo con la invención, la masa volúmica de la primera y/o de la segunda sustancia puede ser superior o inferior a la de la solución, preferentemente superior a la de la solución. Ventajosamente, la superioridad de la masa volúmica de dicha primera y/o segunda sustancia permite una localización de dicha primera y/o segunda sustancia cerca de fondo del envase.

De acuerdo con otro método de realización de la invención, el procedimiento de la invención puede realizarse con una solución que contenga previamente dicha al menos una primera, dicha al menos una segunda sustancia. En este modo de realización, el procedimiento puede no comprender la etapa a) y puede comprender únicamente las etapas b) y c) anteriormente citadas.

De acuerdo con la invención, el procedimiento puede comprender en lugar de la etapa a) una etapa previa a') de fijación de dicha primera sustancia sobre una superficie de un envase, a'') la introducción de una solución en dicho envase, y a''') la introducción de al menos una segunda sustancia que pueda interactuar con dicha primera sustancia.

De acuerdo con la invención, el procedimiento de la invención puede realizarse con una pluralidad de partículas, por ejemplo, con al menos 2 partículas, con, por ejemplo, de 2 a 10.000.000, de 1000 a 1.000.000, de 10.000 a 1.000.000, de 100.000 a 1.000.000, de 10.000 a 100.000 partículas. Ventajosamente, la pluralidad de partículas permite detectar directamente, sin dispositivos de visualización complejos y sin colorantes, la interacción entre dichas sustancias, a diferencia de los procedimientos de la técnica anterior que utilizan una sola partícula y que para la detección de la interacción, se necesitan dispositivos de visualización complejos y colorantes.

De acuerdo con la invención, dichas al menos dos partículas pueden seleccionarse del grupo que comprende partículas cargadas eléctricamente, partículas magnéticas, partículas revestidas de al menos una capa magnética, partículas magnetizables, partículas revestidas de una capa magnetizable, partículas eléctricas, electromagnéticas, electrificables, portadoras de una carga eléctrica o una mezcla de dos o más de estas partículas. Puede tratarse, por ejemplo, de partículas constituidas completamente o en parte de un material magnético y/o magnetizable, es decir, que pueden ponerse en movimiento bajo el efecto/aplicación de un campo eléctrico, magnético o electromagnético. De hecho, puede tratarse de cualquier partícula que permita llevar a cabo la presente invención.

Ventajosamente, dichas partículas pueden ser una partícula de cualquier forma adaptada a la realización de la presente invención, por ejemplo en forma de esfera, disco, de forma geométrica asimétrica, por ejemplo, con una cara plana, etc.

Puede utilizarse cualquier tamaño apropiado de partícula magnética. El tamaño puede seleccionarse, por ejemplo, en función del tamaño del envase de la solución. Por ejemplo, el tamaño de las partículas puede ser inferior a la décima parte del tamaño del envase, preferentemente inferior a la centésima parte, de manera incluso más preferida, inferior a la milésima parte del tamaño del recipiente. Por ejemplo, la partícula puede permitir un tamaño, por ejemplo, de 10 nm a 100 μm , de 0,1 a 10 μm .

Ventajosamente, el procedimiento de la invención permite medir ligeras variaciones de propiedades viscoelásticas de la solución en la que se sumergen las partículas. Cuanto menor sea esta variación más sensible deberá ser la medición. La invención permite utilizar, de manera exacta y ventajosa, una pluralidad de partículas, detectar ligeras variaciones causadas por interacciones débiles entre sustancias que están o bien en pequeñas cantidades o aplican fuerzas de interacción de ligera intensidad. La utilización de una sola partícula y/o esfera magnética o magnetizable no permite detectar de manera satisfactoria las interacciones. Adicionalmente, existe un riesgo no despreciable de detección de fenómenos inespecíficos, por ejemplo, causados por la presencia de un agregado, de impurezas que pueden interferir con el movimiento de dicha micropartícula magnetizable bajo el efecto del campo magnético, eléctrico o electromagnético.

Al contrario, el procedimiento de la invención, en el que se utilizan al menos dos partículas, permite obtener un resultado fiable y estadísticamente representativo.

Adicionalmente, cuanto mayor sea el número de partículas, más información aportará sus movimientos relativos, particularmente permitiendo una mejor cobertura de la superficie de contacto con la que se desarrolla el fenómeno medido. Por tanto, el procedimiento de la invención permite, ventajosamente, interpretar no solamente el movimiento propio de dichas micropartículas (trayectoria, velocidad de desplazamiento...), sino también la imagen global que van a diseñar después de la aplicación del campo magnético, eléctrico o electromagnético. En efecto, la distribución homogénea inicial de una pluralidad de micropartículas se perturba por la aplicación de este campo en función de las propiedades viscoelásticas del medio. Por ejemplo, si el medio es muy viscoso, por ejemplo, si se desarrollan interacciones fuertes entre las sustancias puestas en presencia, la distribución permanece homogénea, no pudiendo desplazarse las partículas, o pudiendo desplazarse poco, bajo el efecto de dicho campo. Si el medio es poco viscoso, o no es viscoso, o si se desarrollan interacciones muy débiles o nulas entre dichas sustancias puestas en presencia, la distribución seguirá las líneas del campo más significativas, por ejemplo, formando un anillo o una mancha por encima de un imán cilíndrico, teniendo las partículas plena libertad para desplazarse bajo el efecto de dicho campo.

Adicionalmente, el procedimiento de la invención permite, ventajosamente, gracias a la utilización de una pluralidad de partículas, por ejemplo, distribuyendo y/o dispersando dichas partículas de manera homogénea en la solución que contiene dichas sustancias, observar visualmente interacciones visibles no solamente a escala molecular, es decir, del orden de nanómetros, sino también a escala microscópica, es decir, del orden de micras e incluso macroscópica, es decir, superior a la micra.

Por ejemplo interacciones entre sustancias que conducen 1) a la formación de agregados, de núcleos de nucleación, cristales que interfieren de diferentes maneras con dichas partículas en comparación con sustancias cuyas interacciones conducen 2) a la formación de polímeros más o menos reticulados. En el primer caso las partículas tienen tendencia a acumularse contra los agregados, núcleos de nucleación, cristales del lado opuesto en el sentido del movimiento generado por la aplicación del campo eléctrico, magnético o electromagnético sobre dichas partículas. Las partículas generan una imagen contrastada a nivel de zonas de acumulación. En el segundo caso, si la polimerización se desarrolla de manera homogénea y regular en la solución, la imagen refleja la inmovilización progresiva de dichas partículas conforme disminuye la intensidad del campo eléctrico, magnético o electromagnético (por ejemplo conforme se alejen del imán). Por tanto, el procedimiento de la invención permite obtener, ventajosamente, imágenes que revelan las estructuras derivadas de interacciones entre las sustancias y las partículas en la solución.

Preferentemente, el número de partículas que se utiliza para visualizar imágenes a escala microscópica e incluso macroscópica, comprende de 1000 a 1.000.000, de 10.000 a 1.000.000, de 100.000 a 1.000.000, de 10.000 a 100.000.

De acuerdo con la invención, las partículas pueden tener, ventajosamente, una densidad próxima a la densidad de las sustancias que pueden que interaccionan entre sí. Por ejemplo, las partículas pueden tener, por ejemplo, una densidad relativa a las sustancias comprendida entre 0,3 y 3.

5 De acuerdo con la invención, la densidad de las partículas puede determinarse por cualquier procedimiento conocido por el experto de la materia, por ejemplo, puede tratarse de la relación entre la masa de las partículas y el aumento del volumen de la solución en la que se añaden esas partículas.

10 De acuerdo con la invención, la densidad de las partículas permite mejorar, ventajosamente, la especificidad y/o la sensibilidad del procedimiento de la invención, por ejemplo, aumentando, disminuyendo o anulando el efecto de la fuerza de la gravedad.

15 Preferentemente, las partículas y las sustancias tendrán una masa volúmica superior a la de la solución en la que están contenidas. Preferentemente, las partículas y las sustancias tendrán una masa volúmica ligeramente superior, por ejemplo de 1,0001 a 3 veces superior a la de la solución en la que están contenidas.

20 Ventajosamente, a la superficie de las partículas pueden acoplarse moléculas adherentes. Ventajosamente, el acoplamiento de dichas moléculas en la superficie de las partículas permite la adhesión de las partículas entre sí. Por ejemplo, las partículas pueden estar recubiertas con polímeros, por ejemplo, polímeros de bloque que comprenden una parte hidrófila y una partida hidrófoba, permitiendo ventajosamente un reagrupamiento fijo de partículas después de aplicación del campo eléctrico, magnético o electromagnético. En otras palabras, la interacción entre las moléculas adherentes permite solidarizar las partículas entre sí después de la aplicación del campo y por tanto obtener un resultado estable y no modificable.

25 De acuerdo con la invención, las partículas pueden ser del mismo tamaño o de tamaño o diferente.

30 Cuando las partículas son del mismo tamaño, las partículas están esencialmente frenadas o aceleradas al mismo tiempo durante la interacción molecular. Cuando las partículas utilizadas son de distinto tamaño, el tamaño de pequeñas partículas puede seleccionarse, por ejemplo, de manera que se frenen después del inicio de la interacción molecular, quedando frenadas más tarde las partículas grandes. En este caso, las partículas de tamaño más pequeño se frenan antes que las partículas de tamaño más grande.

35 Cuando las partículas son de distinto tamaño, las partículas pequeñas pueden presentar un tamaño, por ejemplo, de 10 nm a 1 μm , por ejemplo de 100 a 500 nm, y las partículas grandes pueden presentar un tamaño, por ejemplo, de 1 μm a 100 μm , por ejemplo, de 1 μm a 10 μm , por ejemplo de 1 μm a 5 μm .

Ventajosamente, las partículas de diversos tamaños pueden permitir una detección y/o un análisis precoz y más sensible de la interacción molecular.

40 De acuerdo con la invención, también se puede utilizar una pluralidad de partículas del mismo tamaño con una magnetización diferente.

45 La diferencia de comportamiento de diferentes partículas puede permitir, ventajosamente, evaluar la fuerza de interacción molecular. Mediante la aplicación de campo magnético se puede provocar un movimiento de las partículas que hayan sido más fuertemente magnetizadas, la fuerza magnética es mayor, mientras que las partículas que hayan sido más débilmente magnetizadas no pueden ponerse en movimiento en comparación con una inmovilización total de todas las partículas cuando la interacción es fuerte.

50 De acuerdo con la invención, dicha al menos una partícula es preferentemente una partícula generadora de una señal detectable. La detección de esta señal dependerá de las propiedades de la partícula. Por ejemplo, dicha al menos una partícula puede ser fluorescente, fosforescente, radioactiva, quimioluminiscente, reflectante o de color.

55 Por ejemplo, en el caso en el que dicha al menos una partícula sea fluorescente, la fluorescencia emitida por dicha partícula puede detectarse, por ejemplo, visualmente y/o por cualquiera de los medios ópticos conocidos por el experto en la materia. Dicha al menos una partícula puede, por ejemplo, iluminarse para seguir su movimiento mediante una fuente luminosa, por ejemplo, un rayo láser.

60 De acuerdo con la invención, la iluminación puede ser continua o intermitente. Por ejemplo la iluminación puede realizarse durante todo el procedimiento o, por ejemplo, durante la etapa a) o b) o c), a) y c), a) y b) y b) y c).

Por ejemplo, en el caso en el que dicha al menos una partícula sea fosforescente, dicha partícula puede visualizarse por ejemplo, visualmente, por cualquiera de los medios ópticos conocidos por el experto en la materia.

65 Por ejemplo en el caso en el que dicha partícula sea radioactiva, dicha partícula puede detectarse incluso a través de líquidos o medios de cultivo ópticamente opacos, así como a través de placas de microdilución ópticamente opacas por cualquier dispositivo de detección de radioactividad emitida conocido por el experto en la materia,

particularmente el método clásico de revelado sobre película autorradiográfica. Tan solo hay que presionar la película sensible bajo la placa de microdilución y después revelar la imagen del fondo de dicha placa de microdilución.

5 Por ejemplo en el caso en el que dicha al menos una partícula sea quimioluminiscente, la detección de dicha partícula puede formarse añadiendo al medio un reactivo químico que permita la emisión de energía luminosa por dicha partícula. La detección de esta señal puede ser, por ejemplo, visual y/o por cualquiera de los medios conocidos por el experto en la materia, particularmente a través de la utilización de una cámara CCD (*“Charge Coupled Device”*, dispositivo de carga acoplada) sensible a las longitudes de ondas emitidas, que barren (escanean) las cúpulas de la placa de microdilución.

10 Por ejemplo en el caso en el que dicha al menos una partícula sea reflectante, la detección de dicha partícula puede ser, por ejemplo, visual o por cualquiera de los medios ópticos conocidos por el experto en la materia. Ventajosamente, dicha al menos una partícula puede, por ejemplo, iluminarse, para seguir su movimiento mediante una fuente luminosa, por ejemplo, un rayo láser.

15 Por ejemplo en el caso en el que dichas al menos dos partículas sean de color, la detección de dichas partículas puede ser, por ejemplo, visual y/o por cualquier medio conocido por el experto en la materia para la detección de partículas de color.

20 De acuerdo con la invención, ventajosamente, dichas partículas pueden seleccionarse de colores diferentes en función de su tamaño y/o en función de su poder magnético. La aplicación del campo magnético permite en este caso que en la superficie aparezca un punto o anillo o una mancha de color debido al reagrupamiento de dichas partículas. Ventajosamente, esta característica permite realizar una detección visual facilitada por el reagrupamiento. En efecto, por ejemplo, en el caso de que dichas partículas sean de dos tamaños diferentes, siendo las partículas grandes de un color y las pequeñas de otro, durante la aplicación del campo magnético si la interacción entre dichas sustancias es débil las partículas pequeñas permanecen inmobilizadas en la solución mientras que las grandes se reagrupan. Este reagrupamiento es visible por la aparición de un punto de color que en este caso es idéntico al color de las partículas de tamaño más grande. Si no hay ninguna interacción molecular en la solución entre las sustancias, las partículas pequeñas y las grandes pueden reagruparse y la reagrupación de las partículas se visualiza por la aparición de un punto de color que corresponde a la superposición de dos colores. Finalmente si la interacción molecular es significativa, las partículas pueden estar totalmente frenadas y no pueden por tanto reagruparse y no es visible ningún punto de color.

35 En otras palabras, el reagrupamiento puede evaluarse, por ejemplo, midiendo la mancha formada por dichas partículas reagrupadas. Por ejemplo, cuando dichas partículas son de color, midiendo el color de dichas partículas. Adicionalmente, el reagrupamiento puede evaluarse, por ejemplo, en función de la forma de la mancha obtenida, por ejemplo, en función de la forma, del diámetro, de su topología, por ejemplo, un disco, un anillo.

40 El experto en la materia comprenderá fácilmente que para la realización de la presente invención, la elección de propiedades visuales de dichas al menos dos partículas también puede realizarse en función de la solución. En efecto, cuanto mayor sea el contraste entre el color de dichas al menos dos partículas y el color de la solución, más fácil será la detección del movimiento de dichas al menos dos partículas.

45 En la presente invención, el campo magnético, o eléctrico o electromagnético puede ser cualquier campo que permita poner en movimiento dichas al menos dos partículas sobre dicha superficie sumergida en dicha solución, por ejemplo, un campo electromagnético o un campo magnético. El campo magnético, o eléctrico o electromagnético puede generarse, por ejemplo, con un imán o un solenoide. El imán puede tener, por ejemplo, forma de barra, de punta, de moneda, etc. o cualquier forma apropiada para realizar la presente invención. El campo puede aplicarse, por ejemplo, por cualquier medio conocido por el experto en la materia, por ejemplo, por impulsión, por aumento progresivo del campo electromagnético, por variaciones del campo electromagnético o por una combinación de estas aplicaciones.

50 Un aumento progresivo del campo electromagnético puede obtenerse, por ejemplo, por aproximación de un imán según una trayectoria rectilínea o sinusoidal, o según un movimiento oscilante que presente o no una amplitud de oscilación y/o una frecuencia variables. Pueden obtenerse variaciones más complejas de campo, por ejemplo, por rotación o por combinaciones de movimientos de un material imantado cerca de dicha al menos una partícula.

55 De este modo, de acuerdo con la invención, dicho campo magnético puede generarse por medios generadores de campo que pueden estar o no en movimiento.

60 Cuando varias partículas deben ponerse en movimiento, el campo debe poder reagrupar dichas partículas sobre dicha superficie sumergida en dicha solución.

65 Cualquiera que sea el modo de realización de la invención, el procedimiento de la invención puede realizarse ventajosamente realizarse de manera simultánea en una pluralidad de compartimentos.

En este caso, para poner en movimiento las partículas en dichos compartimentos, de manera ventajosa puede utilizarse una pluralidad de campos magnéticos, por ejemplo, imanes. Los imanes pueden estar, por ejemplo, fijos sobre un soporte de tal manera que se permita una yuxtaposición de cada compartimento en el que se realiza el procedimiento de la invención con un imán de soporte. La aplicación de campo magnético sobre dichos compartimentos es independiente de un compartimento a otro. El campo magnético aplicado a dichos compartimentos puede ser idéntico o diferente de un compartimento a otro, preferentemente idéntico.

De acuerdo con la invención, el campo magnético, electromagnético, eléctrico puede aplicarse, por ejemplo, durante un tiempo de 1 segundo a 15 minutos, de 10 segundos a 10 minutos. Naturalmente, a través de estos conocimientos generales el experto en la materia sabrá adaptar el tiempo en función de las sustancias ensayadas y/o de la fuerza del campo aplicado.

En la presente invención, por compartimento se entiende, por ejemplo, un reactor de cultivo, cúpulas, tubos o pocillos, por ejemplo, de placas de microdilución. Por placa de microdilución se entiende el tipo de placa definido, por ejemplo, por la American National Standards Institute y la Society for Biomolecular Sciences ("microplacas") que tiene 96, 384 e incluso 1536 pocillos.

El material que constituye dicho compartimento puede ser cualquier material adecuado para la realización de la presente invención, por ejemplo, plástico, por ejemplo policarbonato, poliestireno, etc., cristal, metal, etc. Ventajosamente, pueden utilizarse placas de microdilución de poliestireno que presentan cúpulas sin fondo. El fondo de las cúpulas se obtiene fijando una superficie plana bajo la placa de microdilución. Esta superficie plana puede ser de material transparente, por ejemplo, plástico, vidrio, etc. o de material opaco, por ejemplo, metal, cerámica, etc. El modo de fijación de la superficie plana bajo la placa de microdilución puede ser cualquier modo apropiado conocido por el experto en la materia para una fijación de este tipo, por ejemplo, por adhesión mediante un adhesivo, por un método de fricción, por adhesión mediante fusión del material de plástico, por ejemplo, con láser, etc.

De acuerdo con la invención, los diferentes compartimentos pueden reagruparse sobre un mismo soporte, por ejemplo, sobre una placa que comprende de 1 a 1536 pocillos, por ejemplo 6, 16, 64, 96, etc.

El compartimento puede corresponder, por ejemplo, a un recinto con un extremo cerrado, de tipo tubo, pocillo, etc. o a un recinto que presente dos aberturas.

De acuerdo con una primera configuración, el compartimento puede presentar un extremo cerrado para formar un fondo plano.

De acuerdo con una segunda configuración, el compartimento puede presentar un extremo cerrado para formar un fondo hemisférico.

De acuerdo con la invención, la determinación de la interacción entre dichas sustancias puede efectuarse directamente después de la aplicación del campo magnético, electromagnético, eléctrico. Por ejemplo la determinación puede efectuarse de 0,01 segundos a 30 minutos, de 1 segundo a 3 minutos, después de la aplicación del campo.

De acuerdo con la invención, la determinación de la interacción entre dichas sustancias también puede realizarse comparando el reagrupamiento de las partículas durante la aplicación del campo magnético, electromagnético, eléctrico. Por ejemplo, es posible comparar el reagrupamiento de las partículas en una solución que no contenga ninguna, o que solo contenga una, de dichas sustancias previamente citadas, con el reagrupamiento de las partículas en una solución que comprenda dicha primera y dicha segunda sustancia. Si el reagrupamiento es más significativo o si es menos significativo en la solución que no comprende ninguna o una sola de dichas sustancias, entonces dichas sustancias interaccionan y de este modo se determina esta interacción. En otras palabras, la interacción entre las sustancias puede disminuir o aumentar el reagrupamiento de las partículas durante la aplicación de dicho campo y de este modo puede determinarse. Por ejemplo, si la interacción provoca una agregación de sustancias, el medio puede volverse menos viscoso y el reagrupamiento de las partículas aumentará. Por ejemplo si la interacción provoca una precipitación de sustancias, la superficie puede estar, por ejemplo, saturada por el precipitado y el reagrupamiento de las partículas disminuirá. Por ejemplo, si la interacción provoca una reticulación de las sustancias entre sí, la red de sustancias va a ralentizar a las partículas y el reagrupamiento de las partículas disminuirá. Por ejemplo, si la interacción provoca la formación de cadenas lineales de sustancias, entonces la viscosidad del medio aumentará y el reagrupamiento de las partículas disminuirá.

De acuerdo con la invención, el procedimiento puede realizarse, por ejemplo, en una pluralidad de compartimentos comprendiendo cada uno de ellos:

- dicha solución,
- dicha al menos una partícula, y
- dichas sustancias que pueden interaccionar entre sí.

De acuerdo con la invención, el procedimiento puede comprender adicionalmente una etapa b' de mezcla. La mezcla puede realizarse, por ejemplo, por agitación de la solución en la que están presentes dichas sustancias. Puede tratarse, por ejemplo, de una mezcla con un agitador magnético, de una mezcla con un agitador orbital. De acuerdo con la invención, la mezcla puede realizarse, por ejemplo, durante 1 segundo a 15 minutos, de 10 segundos a 10 minutos.

La presente invención también tiene por objeto la utilización del procedimiento de la invención para, por ejemplo, la identificación de sustancias presentes en una solución, el análisis de muestras biológicas, la realización de ensayos biológicos, la realización de la tipificación sanguínea, la realización de ensayos inmunohematológicos, la realización de la detección de contaminaciones naturales o de origen humano, por ejemplo, por virus, bacterias, amebas, levaduras, por células cancerosas, priones, pesticidas, fungicidas, antibióticos, hormonas y toxinas. La presente invención también tiene por objeto la utilización del procedimiento de la invención para, por ejemplo, la realización de ensayos de estimulación, la realización de estudios científicos sobre sustancias, por ejemplo, para estudiar el efecto de la solución sobre la interacción entre sustancias, por ejemplo, en soluciones acuosas, en soluciones orgánicas, en gases, por ejemplo, con moléculas, coloides, nanopartículas, micropartículas. La presente invención también tiene por objeto la utilización del procedimiento de la invención para, por ejemplo, la realización de estudios científicos sobre sujetos o sustancias que están implicadas, por ejemplo, en biología, en cancerología, en endocrinología, en infectología, por ejemplo, para el estudio de hidrogeles formados en soluciones acuosas, aerogeles formados en gases, geles formados en disolventes o en hidrocarburos.

Por ejemplo, el procedimiento de la invención puede utilizarse para el análisis de muestras biológicas, por ejemplo, para la serotipificación sanguínea, la determinación del CMH de un individuo, la determinación de la presencia, por ejemplo, de una proteína, de un anticuerpo, de un receptor particular, en una muestra. El procedimiento de la invención también puede utilizarse para la identificación de sustancias químicas en una solución.

Por ejemplo, cuando el procedimiento de la invención se utiliza para la serotipificación, la solución es una muestra de sangre que proviene de un individuo, por ejemplo, de un ser humano o de un animal, que comprende la primera sustancia.

Adicionalmente, el procedimiento de la invención puede utilizarse para la determinación de la interacción entre un receptor y un ligando eventual, entre un anticuerpo y una proteína, una molécula química, un anticuerpo distinto y/o cualquier molécula que pueda reconocer un anticuerpo. El procedimiento de la invención también puede utilizarse para detectar la interacción entre células, por ejemplo, entre células eucariotas, células procariotas, entre células eucariotas y procariotas. El procedimiento de la invención también puede utilizarse para detectar independientemente la interacción entre bacterias, virus, levaduras y/o células eucariotas.

El procedimiento de la invención también puede utilizarse, por ejemplo, para detectar fenómenos de quimiotaxis, fenómenos de adhesión celular.

El procedimiento de la invención también puede utilizarse, por ejemplo, para detectar la interacción entre nanopartículas, entre micropartículas, entre objetos de forma compleja de tamaño microscópico y nanoscópico.

El procedimiento de la invención también puede utilizarse, por ejemplo, para detectar la interacción (i) de una primera sustancia, por ejemplo, anticuerpos producidos por un ser humano o por un animal en respuesta a una infección, por ejemplo, por un virus, por una bacteria, por un prión, por un parásito, por un protozoo, pero también en respuesta a una enfermedad, por ejemplo, un cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, como por ejemplo, la enfermedad de Basedow, la esclerosis en placas, pero también en respuesta a una intoxicación, a un envenenamiento, a una contaminación, a un estímulo, a una ingestión, a una inhalación y a una inyección, por ejemplo, por un pesticida, un veneno, un insecticida, un herbicida, un agente alergizante, pero también en respuesta a un injerto, por ejemplo, de médula ósea, de órganos, como por ejemplo, un riñón, un pulmón, un hígado, un miembro, como por ejemplo, una mano, una pierna, un pie, pero también en respuesta a un implante de órgano artificial, una cámara implantable, un marcapasos, un corazón artificial, una cadera artificial, y (ii) de una segunda sustancia, por ejemplo, una sustancia que puede haber provocado la producción de dicha primera sustancia, por ejemplo, un antígeno responsable de la producción de dichos anticuerpos previamente citados.

De acuerdo con la invención, la solución puede comprender la segunda sustancia que puede haber provocado la producción de dicha primera sustancia a detectar.

Ventajosamente, la segunda sustancia puede fijarse a la superficie del envase, permitiendo ventajosamente la fijación de dicha segunda sustancia, detectar una interacción entre dichas primera y segunda sustancia, cualquiera que sea su concentración, por ejemplo, entre anticuerpos y antígenos, incluso cuando estos están presentes en pequeñas cantidades.

De acuerdo con la invención, el procedimiento de la invención puede comprender adicionalmente la utilización (iii) de una tercera sustancia.

Puede tratarse, por ejemplo, de una sustancia tal como se ha definido anteriormente, por ejemplo, anticuerpos que pueden reconocer a al menos una de dichas primera y/o segunda sustancia. Puede tratarse, por ejemplo, de anticuerpos idiotípicos, por ejemplo, anticuerpos que reconocen específicamente anticuerpos producidos por un ser humano o un animal, por ejemplo anticuerpos anti conejo, anticuerpos anti cabra, anticuerpos anti IgG, o anti IgM o anti IgA o anti IgE.

De acuerdo con la invención, la tercera sustancia puede fijarse previamente a la superficie del envase permitiendo, por ejemplo, la detección de la interacción de dicha tercera sustancia con dicha primera y/o segunda sustancia.

Ventajosamente, de acuerdo con la invención la tercera sustancia es un anticuerpo idiotípico, es decir un anticuerpo anti anticuerpo que puede interactuar, por ejemplo, con un anticuerpo producido por un ser humano o un animal en respuesta a un antígeno y/o un antígeno que reside o que ha residido en un ser humano o en un animal como se ha indicado anteriormente.

Por tanto, ventajosamente, la presente invención permite detectar, indirectamente, una sustancia, por ejemplo, una sustancia que reside o que ha residido en un ser humano o en un animal, sin tener que necesitar desarrollar un anticuerpo que interaccione específicamente con esta sustancia.

Por tanto, ventajosamente, la presente invención permite detectar, directa o indirectamente, la presencia de anticuerpos producidos en respuesta a una infección, una enfermedad, una intoxicación, un envenenamiento, una contaminación, un estímulo, una ingestión, un pesticida, un injerto. Adicionalmente, la presente invención permite por tanto detectar infecciones silenciosas, es decir, por ejemplo, infecciones no detectables por los medios microbiológicos habituales, por ejemplo, hemocultivos, cultivos de biopsias, líquidos fisiológicos extraídos que bañan o irrigan el supuesto sitio de infección, por ejemplo, líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, detectando, por ejemplo utilizando anticuerpos idiotípicos que interactúan con anticuerpos dirigidos específicamente contra esas infecciones.

A partir de la lectura de los siguientes ejemplos, ilustrados por las figuras adjuntas y que se ofrecen a modo ilustrativo, podrán aparecer incluso otras ventajas para el experto en la materia.

Breve descripción de las figuras

- La figura 1 representa fotografías de manchas obtenidas con, como sustancia de afinidad, anticuerpos que presentan (swH) o que no presentan (swE) afinidad entre ellos. La fotografía 1A se ha tomado después de 20 segundos de imantación, la fotografía 1B después de 5 minutos de imantación.

- La figura 2 representa fotografías de manchas obtenidas con, como sustancia de afinidad, anticuerpos anti determinante de grupo sanguíneo y de hematíes.

- La figura 3 representa imágenes de manchas obtenidas con, como sustancia de afinidad, anticuerpos anti determinante de grupo sanguíneo y de hematíes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Detección de la interacción de anticuerpos que presentan o que no presentan afinidad entre sí.

En este ejemplo, se utilizaron dos tiras de 8 pocillos de fondo plano (Referencia: MSW002B, BioFilm Control, Francia), indicadas, respectivamente, como swH, swE. En cada pocillo de cada una de las tiras, se depositaron 70 µl de solución de anticuerpos, obtenida mezclando, respectivamente, o bien 15 µl de anticuerpos anti IgG humanos (Referencia BI2018, Paris Anticorps, Francia), o bien anticuerpos anti *E.coli* (Referencia BP2298, Acris Antibodies, Alemania), en 1,5 ml de tampón PBS (NaCl 8 g/l (Sigma Aldrich, USA), KCl 200 mg/l (Sigma Aldrich, USA)), Na₂HPO₄ 1,44 g/l (Sigma Aldrich, USA), KH₂PO₄ 240 mg/l (Sigma Aldrich, USA)) antes de colocarlas durante 16 horas en una estufa termostática (Referencia BC240, Firelabo, Francia) estabilizada a 37 °C.

Se prepararon soluciones indicadas, respectivamente, como Slg0, SlgH y SlgE, que contenían 200 µl de reactivo de búsqueda de anticuerpos humanos antieritrocitarios anti-FY1 (IJB-IH Control 3, referencia 108030357, Instituto Jacques Boy, Francia), 2 µl de microesferas paramagnéticas (Ton004N, BiofilmControl, Francia) y respectivamente o bien 15 µl de agua para preparación de inyectables, o bien 200 µl de anticuerpos anti IgG humanos (Referencia BI2018, Paris Anticorps, Francia), o 200 µl de anticuerpos anti *E.coli* (Referencia BP2298, Acris Antibodies GmbH, Alemania).

A continuación, las soluciones de anticuerpos se retiraron de las tiras swH y swE, después se depositaron 150 µl de tampón PBS y se retiraron por tres veces en cada pocillo.

En los pocillos D, E y F, de las tiras swH y swE, se depositaron 100 µl de Slg0, SlgH y SlgE, respectivamente. Después, las tiras se colocaron durante 20 minutos en una estufa termostática (Referencia BC240, Firelabo, Francia) estabilizada a 37 °C, y después se colocaron sobre un bloque de ensayo imantando (BKT-MSW002 BioFilm

- Control, Francia) durante 20 segundos. A continuación las tiras se colocaron sobre un escáner de documentos (perfection V-750 PRO, Epson, USA) con el cual se efectuó una primera toma de imágenes con el programa informático EpsonScan (Epson, USA). El ciclo de imantación/toma de imágenes se reprodujo una segunda vez para disponer también de una segunda imagen después de un total de 5 minutos de imantación. Las imágenes finales se obtuvieron restando el componente verde de las imágenes del componente rojo de las imágenes, colores obtenidos con el escáner utilizando el programa informático ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) y un recorte de imágenes obtenidas con diferentes ajustes de contraste. Las fotografías correspondientes corresponden a las imágenes de la figura 1.
- Se obtuvieron dos anillos de diferentes diámetros, que correspondían a la acumulación de esferas en el fondo de los pocillos durante su migración en el campo magnético. El diámetro del anillo se considera como una medida de acuerdo con una ley decreciente de la movilidad magnética de las esferas.
- Como se esperaba, el diámetro del anillo observado en presencia de la reacción de afinidad esperada entre las inmunoglobulinas presentes en el reactivo de búsqueda de anticuerpo antieritrocitarios y los anticuerpos anti-Ig humanos (tira swH pocillos E) es más significativo que en ausencia de reacción de actividad entre las inmunoglobulinas presentes en el reactivo de búsqueda de anticuerpos antieritrocitarios y los anticuerpos anti-*E. coli* (tira swH pocillos D y F) después de 20 segundos de magnetización, y en los pocillos E, después de 5 minutos de magnetización (tiras swH y swE pocillos E).
- Como se observa en la figura 1, pocillos E, este efecto se amplifica cuando las dos sustancias de afinidad están presentes simultáneamente en solución y adsorbidas en los pocillos, lo que reduce fuertemente la migración de las esferas (tira swH pocillos E) con respecto a la situación, representada en la figura 1, tira swH pocillos D, donde solo una de las sustancias se presenta adsorbida sobre la superficie.
- Además, cuando las dos sustancias de afinidad, es decir, los anticuerpos, están presentes en solución, si una de las sustancias ya está adsorbida sobre la superficie, el fenómeno de reducción de la movilidad de las esferas se amplifica más (pocillos E, tira swH con respecto a swE).
- Finalmente, cuando la sustancia de afinidad no está adsorbida sobre la superficie, la realización de la reacción de afinidad en la solución es detectable observando el diámetro del anillo formado (tira swE, pocillos E, con respecto a los pocillos D y F).
- Ejemplo 2: detección de la interacción entre anticuerpos anti determinante de tipo de grupo sanguíneo y de hematíes.
- En este ejemplo, se utilizaron tres tiras de 8 pocillos con formato SBS de fondo plano (Referencia: MSW002B, BioFilm Control, Francia), indicadas, respectivamente, como swA, swB y swAB. En cada uno de los pocillos de las tiras se depositaron 70 µl de solución de anticuerpo, respectivamente, anti A (Referencia 102010153, Institut Jacques Boy, Francia), anti B (102010253, Institut Jacques Boy, Francia) y anti AB (Referencia 102010353, Institut Jacques Boy, Francia).
- Las tiras se colocaron en una estufa termostática (Referencia BC240, Firelabo, Francia) estabilizada a 37 °C durante 10 minutos.
- Se prepararon suspensiones sanguíneas indicadas, respectivamente, como hA, hB, hAB y h0, diluyendo 1 ml de tampón TS compuesto por NaCl 8 g/l (Sigma-Aldrich, USA) y triptona 1 g/l (Difco, USA), con, respectivamente, 100 µl de hematíes de tipo A, B, AB y 0 (IJB-IH Control 2, Referencia 108020257, Instituto Jacques Boy, Francia), respectivamente y 6 µl de microesferas paramagnéticas (Ton005N, BiofilmControl, Francia) y 1 µl de colorante alimentario azul (Vahiné, Francia).
- Las soluciones de anticuerpos se retiraron de los pocillos antes de depositar 70 µl de preparación respectivamente, hA, hB, hC y h0, en los pocillos respectivamente A y B, pocillos C y D, pocillos E y F, pocillos G y H de las tiras swA, swB y swAB.
- Las tiras se colocaron en una estufa termostática (Referencia BC240, Firelabo, Francia) estabilizada a 37 °C durante 10 minutos después, y después se colocaron sobre el bloque de ensayo imantado (BKT-MSW002 BioFilm Control, Francia) durante 1 minuto. A continuación se colocaron sobre un escáner de documentos (perfection V-750 PRO, Epson, USA) con el que se efectuó una toma de imágenes con el programa informático EpsonScan (Epson, USA). La imagen final se obtuvo como en el ejemplo 1 en la figura 2.
- Como se muestra en la figura 2, en los pocillos C, D, G y H de la tira swA, en los pocillos A, B, G y H de la tira swB y en los pocillos G y H de la tira swAB, se observó la formación de un disco oscuro de un diámetro de aproximadamente 2 mm +/- 1 mm que se atribuyó a una ausencia de reacción de afinidad entre los anticuerpos unidos a los pocillos y los hematíes. En los otros pocillos, no se observó ninguna forma oscura, demostrando una reacción de afinidad entre los anticuerpos unidos a los pocillos y los hematíes. En la tabla 1 siguiente se resumen las

observaciones, en la que la ausencia de disco se indica como – y la presencia de disco se indica como +:

Tabla 1: observación de pocillos de la figura 2

	A (hA)	B (hA)	C (hB)	D (hB)	E (hAB)	F (hAB)	G (h0)	H (h0)
SwA (anti A)	-	-	+	+	-	-	+	+
SwB (anti B)	+	+	-	-	-	-	+	+
SwAB (anti AB)	-	-	-	-	-	-	+	+
Tipificación deducida	A	A	B	B	AB	AB	0	0

5 Como se demuestra en este ejemplo, los resultados obtenidos muestran por tanto claramente la detección de la afinidad de anticuerpos con los hematíes correspondientes. Por otro lado, este ejemplo demuestra claramente que el procedimiento de la invención permite determinar el serotipo de una muestra de sangre.

Ejemplo 3: detección de la interacción entre anticuerpos anti-determinante de anticuerpos antieritrocitarios.

10 En este ejemplo se utilizaron dos tiras de 8 pocillos de fondo plano (Referencia: MSW002B, BioFilm Control, Francia), indicadas como swD y swK. En cada uno de los pocillos de las tiras, se depositaron 50 µl de una solución obtenida mezclando 15 µl de anticuerpos anti IgG humanos (Referencia BI2018, Paris Anticorps, Francia) en 1,5 ml de tampón TS (NaCl 8 g/l (Sigma Aldrich, USA), Triptona 1 g/l (Difco, USA)). A continuación, las tiras se incubaron durante 16 horas en una estufa termostática (Referencia BC240, Firelabo, Francia) estabilizada a 37 °C.

15 Se prepararon soluciones, respectivamente indicadas como Sp y St, que comprendían 150 µl de tampón, respectivamente PBS y TS, y 0,75 µl de Ton005N. Estas soluciones correspondían a soluciones control sin hematíes.

20 Igualmente, se prepararon suspensiones, respectivamente indicadas como Si, Sii y Siii, que comprendían 150 µl de una suspensión de hematíes de tipo I, II y III (Referencia ID-DiaCell I-II-III, Diamed, Francia) y 0,75 µl de microesferas paramagnéticas (Ton005N, BiofilmControl, Francia).

25 El proveedor verificó los antígenos presentes en la superficie de los hematíes y se distribuyeron de acuerdo con la siguiente tabla 2:

Tabla 2:

Suspensiones	Hematíes	Duffy	KEL
Si	Hematíes tipo I	+	0
Sii	Hematíes tipo II	+	0
Siii	Hematíes tipo III	0	+
+: presencia del antígeno, 0: ausencia del antígeno			

30 Igualmente, se prepararon suspensiones, respectivamente indicadas como SDi y SKi, SDii y SKii así como SDiii y SKiii, que comprendían 100 µl de una suspensión de hematíes de tipo I, II y III respectivamente (Referencia, ID-DiaCell I-II-III, Diamed, Francia), 50 µl de suero, respectivamente anti FY1 (o anti Duffy) y anti KEL1 (JJB-IH Control 3, referencia 108030357, Instituto Jacques Boy, Francia) y 0,75 µl de microesferas paramagnéticas (Ton005N, BiofilmControl, Francia) (ver tabla 3). Estas suspensiones son controles negativos que comprenden hematíes cuyos sitios de afinidad están bloqueados por los anticuerpos contenidos en los sueros, de manera que los complejos hematíes-anticuerpos no presentan más sitios de afinidades libres que puedan unirse a los anticuerpos fijos en el fondo de los pocillos.

Tabla 3:

	Hematíes	Suero
SDi	I (D)	Anti FY1 (anti D)
SKi	I (D)	Anti KEL1 (anti K)
SDii	II (D)	Anti FY1 (anti D)
SKii	II (D)	Anti KEL1 (anti K)
SDiii	III (K)	Anti FY1 (anti D)
SKiii	III (K)	Anti KEL1 (anti K)

40 La solución de anticuerpos anti IgG humanos se retiró después de las tiras swD y swK y se depositaron 150 µl de tampón TS y se retiraron por dos veces. En cada pocillo de las tiras swD y swK se depositaron, respectivamente,

50 µl de reactivos de búsqueda de anticuerpos antieritrocitarios, respectivamente anti-FY1 (o anti Duffy) y antiKEL1 (IJB_IH Control 3, referencia 108030357, Instituto Jacques Boy, Francia). Después, las tiras se colocaron durante 10 minutos en una estufa termostática (Referencia BC240, Firelabo, Francia) estabilizada a 37 °C.

5 Las soluciones de reactivos de búsqueda de anticuerpos antieritrocitarios se retiraron después de las tiras swD y swK y se depositaron 150 µl de tampón TS y se retiraron por dos veces.

Se depositaron 70 µl de suspensiones distintas como se indica a continuación en la tabla 4:

10 Tabla 4: Distribución del depósito de suspensiones distintas

	A	B	C	D	E	F	G	H
swD	Si	Sii	Siii	Sp	St	SDi	SDii	SDiii
swK	Si	Sii	Siii	Sp	St	SKi	SKii	SKiii

15 Después, las tiras se colocaron durante 20 minutos en una estufa termostática (Referencia BC240, Firelabo, Francia) estabilizada a 37 °C, y después se colocaron sobre el bloque de ensayo imantado (BKT-MSW002 BioFilm Control, Francia) durante 30 segundos. A continuación las tiras se colocaron en un escáner de documentos (perfection V-750 PRO, Epson, USA), con el cual se efectuó una toma de imágenes con el programa informático EpsonScan (Epson, USA). Estas imágenes sirvieron para analizar la tira swK. El ciclo de imantación/toma de imágenes se reprodujo una segunda vez para disponer también de una imagen después de un total de un minuto de imantación que sirve para analizar la tira swD. Las imágenes finales se obtuvieron como en el ejemplo 1 y se representan en la figura 3.

20 La figura 3 muestra que un anillo perfectamente definido es visible en los pocillos de control D y E, lo que demuestra una movilidad significativa de las esferas paramagnéticas, obteniéndose un anillo similar en los pocillos F, G y H, lo que demuestra una movilidad significativa y conservada en presencia de hematíes donde los sitios de afinidades están bloqueados por los anticuerpos contenidos en los sueros.

25 En los pocillos A, B y C se puede verificar la presencia;

- de un anillo comparable al de los pocillos F, G y H, lo que demuestra una movilidad significativa atribuida a una ausencia de unión de afinidad entre los hematíes y los anticuerpos unidos al fondo de los pocillos,
- o bien de una mancha difusa lo que demuestra una movilidad reducida de las esferas paramagnéticas atribuida a una reacción de afinidad entre los anticuerpos unidos a los pocillos y a los hematíes.

Los anillos y las manchas son visibles de acuerdo con la tabla 5 siguiente:

35 Tabla 5: imágenes obtenidas

	A	B	C	D	E	F	G	H
swD	mancha	mancha	anillo	anillo	anillo	anillo	anillo	anillo
swK	anillo	anillo	mancha	anillo	anillo	anillo	anillo	anillo

El procedimiento de la invención permite por tanto detectar la interacción molecular entre dos sustancias.

40 Ejemplo 4: detección de la interacción entre anticuerpos antibacterianos presentes en un suero y sustancias obtenidas de cultivos bacterianos

45 En este ejemplo, se utilizaron dos tiras de 8 pocillos de fondo plano (Referencia: MSW002B, BioFilm Control, Francia), indicadas, respectivamente, como swH, swE. En cada pocillo de cada una de las tiras se depositaron 70 µl de solución de anticuerpos obtenida mezclando 15 µl de anticuerpos anti IgG humanos (Referencia BI2018, Paris Anticorps, Francia) y anticuerpos anti *E.coli* (Referencia BP2298, Acris Antibodies, Alemania), respectivamente, en 1,5 ml de tampón PBS (NaCl 8 g/l (Sigma Aldrich, USA), KCl 200 mg/l (Sigma Aldrich, USA)), Na₂HPO₄ 1,44 g/l (Sigma Aldrich, USA), KH₂PO₄ 240 mg/l (Sigma Aldrich, USA)) antes de colocarlas durante 16 horas en una estufa termostática (Referencia BC240, Firelabo, Francia) estabilizada a 37 °C (véase la tabla 6).

50 Tabla 6:

	A	B	C	D	E	F	G	H
swD	Anti humano							
swK	anti							
	<i>E. coli</i>							

5 A continuación, la solución de IgG se retiró de las tiras swH y swE y se depositaron 150 µl de tampón TS y retiró por dos veces. En cada pocillo, respectivamente, A, B, C, D y E, F, G, H, de las tiras swH y swE, se depositaron 150 µl de suero humano que provenía, respectivamente, de pacientes que padecían una infección estafilocócica (suero Estaf +) y de controles que no padecían dicha infección (suero Estaf -) (ver tabla 7). A continuación, las tiras se colocaron durante 10 minutos en una estufa termostática (Referencia BC240, Firelabo, Francia) estabilizada a 37 °C.

Tabla 7:

	A	B	C	D	E	F	G	H
swH	Suero Estaf + / Anti humano	Suero Estaf - / Anti humano	Suero Estaf - / Anti humano	Suero Estaf - / Anti humano	A Suero Estaf - / Anti humano			
swE	Suero Estaf + / anti <i>E. coli</i>	Suero Estaf - / anti <i>E. coli</i>						

10 En los pocillos de las tiras se depositaron 50 µl de reactivo de detección de infección estafilocócica, que comprendía sustancias obtenidas de cultivos de estafilococos y microesferas paramagnéticas (Referencia: RDS-01 R, BioFilm Control, Francia).

15 A continuación las tiras se colocaron durante 20 minutos en una estufa termostática (Referencia BC240, Firelabo, Francia) estabilizada a 37 °C, y después se colocaron sobre el bloque de ensayo imantado (BKT-MSW002 BioFilm Control, Francia) durante 10 segundos. A continuación las tiras se colocaron en un escáner de documentos (perfection V-750, Epson, USA) con el que se efectuó una toma de imágenes con el programa informático EpsonScan (Epson, USA). El ciclo de imantación/toma de imágenes se reprodujo una segunda vez para disponer igualmente de una imagen después de un total de 5 minutos de imantación. Las imágenes finales se obtuvieron como en el ejemplo 1.

20 El diámetro del anillo observado en presencia de la reacción de afinidad esperada entre las inmunoglobulinas presentes en el suero de pacientes infectados y las sustancias contenidas en el reactivo de detección de infección estafilocócica (pocillos A, B, C y D) es más significativo que en ausencia de reacción de afinidad en el suero de pacientes no infectados (pocillos E, F, G y H).

25 Listado de referencias

1. US 3 635 678 CLOT-TIMING SYSTEM AND METHOD, Seitz, L.J. and Bowen, J.G.;
2. WO 01/86255, METHOD AND APPARATUS FOR DETERMINING LOCAL VISCOELASTICITY, Cronin-Golomb, M. Shabtai, Y. Nemet, B.;
- 30 3. EP1544596, Méthode et appareil de détermination de la viscosité, Kurowski D.; Schoen C.; Peters R.; Bartos H.; Yu Y.;
4. Catterall WA. (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 16: 521-55
5. Gerald Karp, Biologie cellulaire et moléculaire, Concepts et expériences, 2^a edición 2004
- 35 6. Dick GM y Tune JD, Role of potassium channels in coronary vasodilation, Exp Biol Med (Maywood). Ene 2010; 235(1): 10-22
7. Mostallino MC et al. Plasticity and function of extrasynaptic GABA(A) receptors during pregnancy and after delivery, Psychoneuroendocrinology. Dic 2009; 34 Sup. 1: S74-83

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección de interacciones en una solución que comprende las siguientes etapas:

5 a. introducir en una solución al menos una primera sustancia y al menos una segunda sustancia que puede interactuar con dicha primera sustancia,

10 b. introducir en la solución obtenida en la etapa a) de 2 a 10.000.000 partículas magnéticas o magnetizables, reposando dichas partículas en una superficie sumergida en dicha solución, teniendo dichas partículas un tamaño comprendido entre 10 nm a 100 µm,

15 c. determinar la interacción de dichas sustancias por aplicación de un campo eléctrico, magnético o electromagnético diseñado para poner en movimiento dichas partículas, detectándose la interacción entre dichas sustancias cuando la movilidad de dichas partículas sobre dicha superficie se modifica.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichas partículas magnéticas o magnetizables son, independientemente, una partícula cargada eléctricamente, magnética o magnetizable o recubierta con al menos una capa magnética o magnetizable.

20 3. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dichas partículas se someten a un campo electromagnético aplicado por impulso.

25 4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la modificación de la movilidad es una aceleración del movimiento de las partículas bajo el efecto de dicho campo eléctrico, magnético o electromagnético.

30 5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la modificación de la movilidad es una ralentización del movimiento de las partículas bajo el efecto de dicho campo eléctrico, magnético o electromagnético.

35 6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la modificación de la movilidad es una modificación de la trayectoria de las partículas bajo el efecto de dicho campo eléctrico, magnético o electromagnético.

40 7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la interacción se detecta por el reagrupamiento de las partículas bajo el efecto de dicho campo eléctrico, magnético o electromagnético.

45 8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la interacción se detecta por el no reagrupamiento de las partículas bajo el efecto de dicho campo eléctrico, magnético o electromagnético.

50 9. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la interacción se detecta por la dispersión de las partículas bajo el efecto de dicho campo eléctrico, magnético o electromagnético.

55 10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichas al menos dos partículas se iluminan mediante una fuente luminosa para detectar su movimiento.

60 11. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichas al menos dos partículas son generadoras de una señal.

12. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la primera sustancia seleccionada del grupo que comprende células eucariotas, células procariotas, membranas, virus, proteínas, anticuerpos, antígenos, moléculas químicas.

13. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que segunda sustancia se selecciona del grupo que comprende células eucariotas, células procariotas, membranas, virus, proteínas, anticuerpos, antígenos, moléculas químicas.

14. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el procedimiento comprende, en lugar de la etapa a) una etapa previa a') de fijación de dicha primera sustancia sobre una superficie de un envase,

a'') la introducción de una solución en dicho envase, y

a''') la introducción de al menos una segunda sustancia que puede interactuar con dicha primera sustancia.

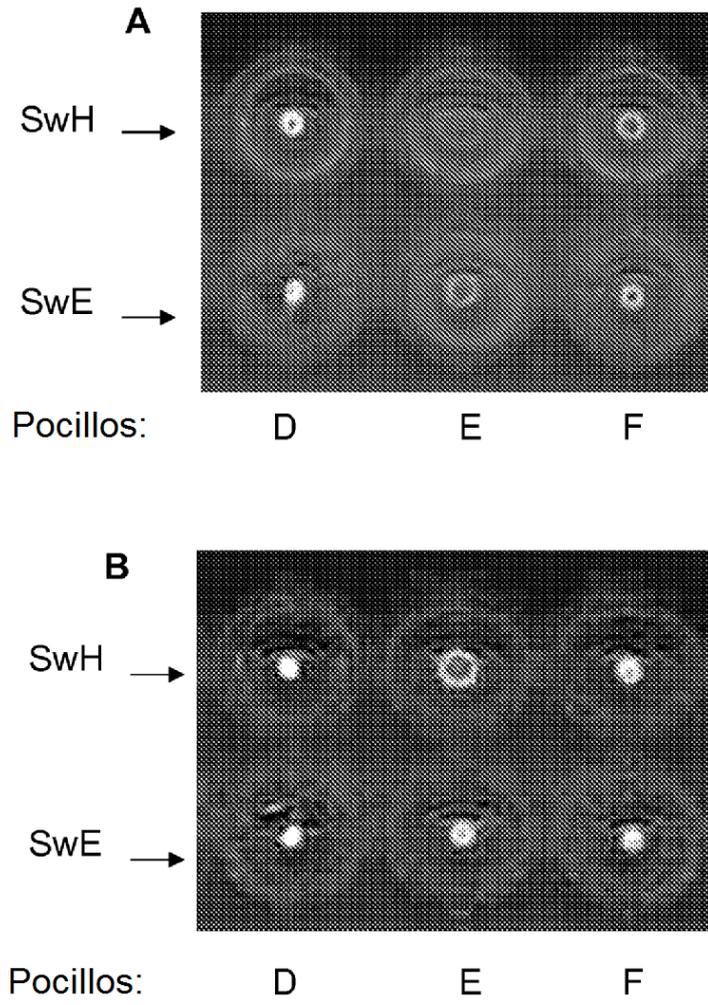


FIGURA 1

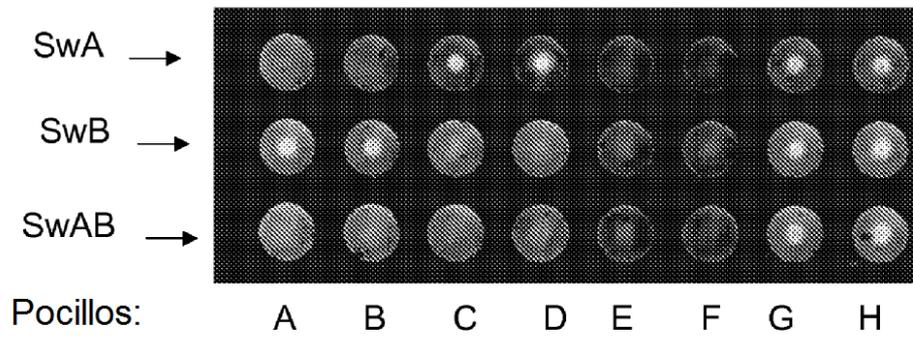


FIGURA 2

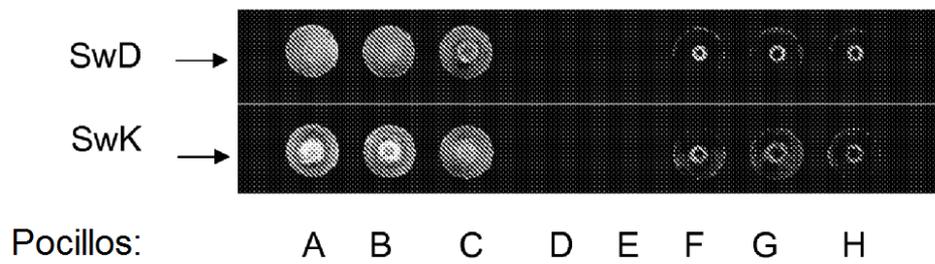


FIGURA 3