

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 986**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543	(2006.01) B01L 3/00	(2006.01)
G01N 35/00	(2006.01)	
C12N 15/10	(2006.01)	
G01J 3/00	(2006.01)	
G01J 3/44	(2006.01)	
G01N 21/65	(2006.01)	
G01N 15/00	(2006.01)	
G01N 1/40	(2006.01)	
B82Y 25/00	(2011.01)	
B82Y 15/00	(2011.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2007** **E 13164976 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017** **EP 2620771**

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

30 Prioridad:

24.07.2006 US 832921 P
05.04.2007 US 910246 P
05.04.2007 US 910256 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.01.2018

73 Titular/es:

BECTON DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
1 Becton Drive
Franklin Lakes NJ 07417-1180, US

72 Inventor/es:

NORTON, SCOTT M.;
HOLLAND, EDWARD ROBERT;
WALTON, IAN D.;
CROMER, REMY y
STOERMER, REBECCA LOUISE

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 649 986 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Aparato y procedimiento para la concentración de partículas de ensayo

5 Campo técnico

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

10 Antecedentes de la invención

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

15 heterogéneos.

En un formato de ensayo homogéneo (sin separación), se mezclan y se miden reactivos de unión sin ninguna etapa posterior de lavado antes de la detección. Las ventajas de un sistema de este tipo son una rápida cinética solución-fase, un formato de ensayo simple, una instrumentación más simple, así como menores costes debido a un menor

20 número de etapas de ensayo, bajos volúmenes y pocos residuos. Los ensayos inmunológicos homogéneos no requieren una separación física del analito unido y libre y, por lo tanto, puede ser más rápido y más fácil realizar entonces ensayos inmunológicos heterogéneos. Los sistemas de ensayos inmunológicos homogéneos que utilizan un tamaño de muestra pequeño, un bajo volumen de reactivo y pequeños tiempos de incubación, proporcionan un tiempo de respuesta rápido. Los inconvenientes de este tipo de ensayo pueden ser un rango dinámico y una

25 sensibilidad limitados. Puesto que no hay separación de analito libre antes de la detección de la señal, la sensibilidad podría verse comprometida aún más. Además, las interferencias podrían provocar una elevada señal de fondo por la interacción entre la muestra y la captura o los reactivos de detección. Los ensayos homogéneos son el formato de ensayo preferido en plataformas de cribado de alto rendimiento tales como AlphaScreen, SPA, ensayos basados en polarización fluorescente y citometría de flujo, así como en ensayos de diagnóstico tales como ensayos

30 de aglutinación de partículas con nefelometría o turbidimetría como los procedimientos de detección.

Varios tipos de ensayo implican la asociación de partículas de detección marcadas ópticamente a partículas de captura magnéticas. Por ejemplo, el documento US 2006/240.572 A1 desvela una técnica de espectroscopia Raman que permite que un analito, una partícula paramagnética y una partícula de mejora espectral se combinen en

35 solución y que el producto de combinación sea localizado por un campo magnético para el análisis, teniendo que estar compuesta la partícula de mejora espectral por una partícula de metal SERS activa.

Cuando se utilizan partículas de captura magnéticas en un formato de ensayo homogéneo (sin separación), el comportamiento de las partículas en un campo magnético puede utilizarse para concentrar o diferenciar las

40 partículas magnéticas y todo aquello que pueda unirse a estas desde otros componentes del ensayo. En implementaciones de ensayo en las que las partículas de captura se unen o de otro modo se asocian a las partículas de detección marcadas ópticamente, resulta difícil utilizar tecnologías conocidas para concentrar las partículas de captura en el plano focal de un sistema de interrogación óptico. Si se desea que las partículas de captura magnéticas se concentren en un gránulo relativamente compacto y/o pequeño para la interrogación se introduce una

45 dificultad adicional.

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

Sumario de la invención

50 En un aspecto, la presente invención incluye un aparato de ensayo que comprende:

un tubo capilar (52); un depósito de muestra (64); un cartucho de muestra (62) en el que el depósito de muestra (64) está formado y en el que el tubo capilar (52) está montado, por lo que el tubo capilar (52) está en

55 comunicación fluida con el depósito (64); un soporte (66) configurado para recibir el cartucho de muestra (62); un imán (18) asociado operativamente al soporte (66) de tal modo que un campo magnético interseca con una parte del tubo capilar (52) definiendo una zona de concentración magnética (20) dentro del tubo capilar (52); y un espectrómetro (40) asociado operativamente al soporte (66) de tal modo que el foco del espectrómetro (40) está dentro de la zona de concentración magnética (20).

60 En algunas realizaciones, el espectrómetro (40) es un espectrómetro Raman.

Las diversas realizaciones del aparato de ensayo descritas en este documento son adecuadas para utilizarse con cualquier ensayo en el que partículas marcadas ópticamente lleguen a asociarse a partículas de captura

65 magnéticas, paramagnéticas o superparamagnéticas. El término partículas magnéticas, tal como se utiliza en este

documento, incluye partículas magnéticas, partículas paramagnéticas, partículas superparamagnéticas convencionales o cualquier otro tipo de partícula afectada por un campo magnético. En una realización que se describe en detalle en este documento, el espectrómetro es un espectrómetro Raman y las partículas detectoras marcadas ópticamente son nanoetiquetas SERS.

5 En algunas realizaciones, el imán (18) y el espectrómetro (40) del aparato de ensayo tal como se definen en este documento están posicionados para minimizar la cantidad de fluido de ensayo que se encuentra fuera de la zona de concentración magnética (20), pero dentro de una trayectoria óptica entre el espectrómetro (40) y la zona de concentración magnética (20). En determinadas realizaciones, el imán (18) está posicionado para provocar que la zona de concentración magnética (20) se forme de manera sustancialmente adyacente a una ubicación donde una trayectoria óptica entre el espectrómetro (40) y la zona de concentración magnética (20) interseca inicialmente el interior del tubo capilar (52).

En estas realizaciones de la presente invención se elimina una etapa intermedia de mover el recipiente de muestra desde el soporte/concentrador hacia un espectrómetro separado.

15 Con una realización con funciones combinadas se consiguen dos ventajas importantes. La primera ventaja es una precisión mejorada en la colocación de las partículas magnéticas (o en la definición de la zona de concentración magnética) dentro del recipiente de muestra, de manera que se mejora la repetibilidad de la medición, y se evita la posibilidad de resultados falsos negativos (faltando completamente el gránulo concentrado de partículas magnéticas).

20 La segunda ventaja se refiere a la eliminación de la etapa de mover el recipiente de muestra del soporte/concentrador hacia un espectrómetro separado, de modo que la lectura de la muestra se reduce a una operación de una sola etapa. Además, se elimina el riesgo asociado de movimiento del gránulo dentro del recipiente de muestra o de disociación del gránulo durante la transferencia al espectrómetro, lo cual puede producir errores en la medición.

25 En determinadas realizaciones, el aparato de ensayo puede comprender además medios para estimular la concentración compacta asociada operativamente al tubo capilar (52). Preferentemente, los medios para estimular la concentración compacta se seleccionan de un grupo que consiste en un estimulador electromagnético; un vibrador; un transductor acústico y un agitador mecánico.

30 En otro aspecto, la presente invención describe un procedimiento de llevar a cabo un ensayo que comprende:

asociar partículas de captura magnéticas a partículas de detección en un tubo capilar (52) de un cartucho de muestra (62) en el que un depósito de muestra (64) está formado y en el que el tubo capilar (52) está montado, por lo que el tubo capilar (52) está en comunicación fluida con el depósito (64);
35 colocar el cartucho de muestra (62) en un soporte (66) configurado para recibir el cartucho de muestra (62) y sujetarlo en una relación de selección con un imán (18) y un espectrómetro (40) asociado al soporte;
concentrar magnéticamente las partículas de captura magnéticas en una zona de concentración (20) del tubo capilar (52) de tal modo que el foco del espectrómetro (40) esté dentro de la zona de concentración magnética (20) y
40 obtener un espectro desde la zona de concentración magnética (20).

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

Breve descripción de los dibujos

50 La figura 1 es una representación gráfica del crecimiento de intensidad de señal en función del tiempo durante la captura de partículas magnéticas.

Las figuras 2A-C son diagramas esquemáticos de procedimientos de compactación de gránulos representativos.

55 La figura 3 es un diagrama esquemático de un aparato que incluye un tubo capilar ópticamente transparente como recipiente de muestra.

La figura 4 es un diagrama esquemático de un aparato alternativo que presenta un tubo capilar ópticamente transparente como recipiente de muestra.

60 La figura 5 es un diagrama esquemático de una realización que presenta un recipiente de muestra de tubo capilar y de soporte para cartucho.

Descripción detallada de la invención

Tal como se utiliza en toda esta solicitud, el término "partículas magnéticas" se definirá como partículas magnéticas, partículas paramagnéticas, partículas superparamagnéticas convencionales o cualquier otra partícula que se vea afectada por un campo magnético. En algunas realizaciones pueden realizarse ventajas al tener un aparato para la captura y concentración magnéticas integrado con un espectrómetro u otro dispositivo de interrogación óptica. Por ejemplo, un sistema de captura, concentración y representación totalmente integrado minimiza la posibilidad de una mala colocación o descompactación de un gránulo de partículas magnéticas concentradas ya que el recipiente de muestra no tiene que moverse entre las etapas de concentración e interrogación óptica. Por consiguiente, se describen en detalle a continuación dichas realizaciones de aparatos integrados.

Aunque en la figura 5 se muestra un imán esférico, para la aplicación de la presente invención es igualmente apropiada cualquier otra forma adecuada y tamaño relativo de los imanes, que pueden ser o bien imanes permanentes o bien electroimanes. Por ejemplo, puede utilizarse un imán lineal para proporcionar un gránulo lineal que pueda ser barrido a lo largo de la longitud. Además, puede ser deseable en ciertas implementaciones modificar el perfil del campo magnético generado utilizando una combinación de un imán más una "pieza polar" construida a partir de un material ferromagnético adecuado, por ejemplo aleaciones de acero u otros materiales adecuados conocidos por los expertos en la materia. Este enfoque puede utilizarse para optimizar el patrón de campo magnético para el propósito de concentración y localización de partículas magnéticas.

Adicionalmente, pueden utilizarse tubos capilares (52) que tengan cualquier número de formas personalizadas para poner en práctica el aparato de una manera eficaz. La forma personalizada puede incluir un resalte o una hendidura u otra estructura o forma en la zona de concentración magnética 20 que se ha descrito anteriormente o cerca de la misma. La forma personalizada puede afectar a la naturaleza del gránulo formado en la etapa de concentración. El desarrollo de un gránulo magnético concentrado, bien formado, y consistente a partir de partículas de captura magnéticas y etiquetas ópticas asociadas es una función de la arquitectura del campo magnético, así como la morfología del tubo de muestra en la zona de concentración magnética 20. De este modo, el tamaño y la forma del gránulo concentrado puede alterarse modificando la forma de la superficie de las partículas de captura magnéticas que se recogen sobre esta o dentro de la misma. Por lo tanto, la arquitectura del tubo personalizada con una hendidura (o cúspide) u otra estructura o forma conformada en la zona de concentración magnética o cerca de la misma podría ayudar en la formación de un gránulo magnético que tenga un tamaño, forma y consistencia reproducibles. Por ejemplo, puede utilizarse una cúspide cóncava para formar un gránulo esférico en la parte inferior o lateral de un recipiente de recogida personalizado.

El material de los tubos capilares (52) debe ser compatible con los reactivos y sustancias del analito destinados para utilizarse en el ensayo. Pueden aplicarse al recipiente determinados recubrimientos químicos o biológicos para evitar la unión no específica de partículas magnéticas, etiquetas ópticas o analito a las paredes del recipiente. El tubo capilar (52) debe fabricarse en un material no magnético, de manera que un campo magnético aplicado desde una fuente externa pase a través del tubo capilar (52) sin que se vea afectado. Por otra parte, debe diseñarse de manera que se tenga en cuenta la distancia máxima que recorrerían los reactivos hacia el punto de localización. Esto regula la velocidad y eficacia de la captura magnética, ya que la fuerza de atracción disminuye rápidamente a medida que aumenta la distancia desde el sistema de imanes.

La forma del tubo capilar (52) puede incluir características geométricas externas, marcadores o signos 22 para mejorar la repetibilidad de posicionamiento, y evitar una inserción incorrecta del recipiente dentro del aparato de soporte. Las características de posicionamiento podrían incluir (pero sin limitarse a estas) la inclusión de secciones planas, chavetas, puntos de referencia, etc. Estas se corresponderían con características similares en un receptáculo de recipientes diseñado específicamente asociado a localización magnética, medición espectroscópica o combinación de estas funciones, todo tal como se describe en este documento.

En realizaciones en las que la interrogación del ensayo se realiza ópticamente, típicamente se aplica una salida de láser exclusivo al gránulo concentrado. Así, el tubo capilar (52) debe ser sensiblemente transparente en la zona de longitud de onda de interrogación de láser deseada. Además, es deseable asegurar que la zona de localización tenga unas propiedades ópticas compatibles con el sistema de lentes del espectrómetro u otro dispositivo de detección. Pueden ser deseables superficies ópticas planas que permitan la entrada y salida de luz de excitación y emitida con mínima refracción, reflexión o dispersión. Alternativamente, pueden ser beneficiosas superficies con curvatura en una o más dimensiones destinadas a funcionar como lentes. Además, el diseño del recipiente debe permitir la presencia simultánea de un sistema localizador magnético y el funcionamiento del espectrómetro en caso de que ambas funciones estén incluidas en un solo instrumento. La zona de concentración magnética 20 puede encontrarse en cualquier posición en el tubo capilar (52) propicia para la capacidad de concentrar y localizar los reactivos de ensayo y realizar mediciones ópticas.

Las distintas realizaciones descritas aquí son particularmente ventajosas para la concentración de partículas de captura magnéticas asociadas a nanoetiquetas SERS o etiquetas SERS similares como partículas de detección marcadas ópticamente. Las nanoetiquetas SERS tienen un núcleo activo SERS asociado a una molécula informante

- Raman que puede ser interrogada a través de una espectroscopia Raman. En consecuencia, resulta útil en cualquier aplicación de la presente invención que presente espectroscopia Raman que el material del tubo capilar (52) sea transparente a la dispersión de luz Raman. La principal limitación respecto a la espectroscopia Raman es que el tubo capilar (52) no interfiere por la absorción tanto en las longitudes de onda de excitación de láser, incluyendo, pero sin limitarse a ello, longitudes de onda de 633 nm o 785 nm, como las longitudes de onda de emisión Raman subsiguientes. En efecto, un material ideal tampoco contribuiría en interferencia y/o fluorescencia Raman a estas longitudes de onda de excitación. Una amplia variedad de tubos de ensayo de bajo coste y de uso común cumple este criterio.
- La gráfica 46 de la figura 1 ilustra el progreso de la formación de gránulos durante la concentración magnética en función del tiempo, tal como se determina por la señal de las etiquetas SERS unidas a perlas magnéticas en un esquema de reacción inmunológica. Es deseable para el análisis espectroscópico que el tamaño de los gránulos sea tan pequeño como sea posible, ya que una parte apreciable del volumen de las partículas capturadas puede encontrarse de otro modo fuera del punto de iluminación láser que presentan instrumentos típicos, el cual es generalmente un diámetro de aproximadamente entre 70 y 200 micras. También es deseable que el tamaño de los gránulos sea tan pequeño como sea posible para un número determinado de perlas magnéticas. Esto tiene múltiples ventajas. En primer lugar, un gránulo denso se traduce en una menor área de muestreo. En la captura espectroscópica tradicional, un área de muestreo menor permite hacer corresponder con una abertura de espectrómetro más pequeña, lo que se traduce en una resolución espectral mayor para una eficacia óptica determinada (rendimiento óptico). Además, un gránulo más denso tiene como resultado una relación señal ruido más alta dado que habrá un mayor número de etiquetas por unidad de volumen de muestreo. Un gránulo más denso también debería mejorar la varianza de muestra a muestra, ya que un gránulo más pequeño debe coincidir mejor tanto con el punto de láser como con la zona de captación óptica. Por lo tanto, una zona de captación que sea ligeramente más grande que el gránulo debe ser relativamente inmune a variaciones de señal de menores diferencias de forma entre gránulos. Por último, un gránulo denso de perlas magnéticas ayuda a oscurecer el mayor volumen de la solución, que contiene una etiqueta óptica no unida. Este mecanismo de oscurecimiento podría reducir el límite de detección, aumentando así la sensibilidad y dando lugar a una mejora en el rango dinámico de la prueba.
- La formación de gránulos puede conseguirse con un posicionamiento estático entre el tubo capilar (52) y el imán 18. Sin embargo, las partículas magnéticas pueden concentrarse a un menor volumen si el imán 18 se mueve respecto a la superficie del recipiente de muestra - un desplazamiento de menos de 1 mm es suficiente para obtener una mejora de concentración medible. El movimiento del imán 18, sin embargo, puede ser poco práctico debido al requerimiento de que la posición de la zona de concentración magnética 20 esté en coincidencia con la iluminación láser desde el espectrómetro 40. Sin embargo, es posible estimular una formación ajustada de gránulos mediante el uso de técnicas o procedimientos que incluyen la estimulación mecánica, acústica o magnética del tubo capilar (52), pero sin limitarse a estos. Es suficiente una energía de vibración para desalojar las partículas que se han llegado a pegar a la pared del recipiente antes de llegar a la posición final de más baja energía potencial más cerca del imán 18 o pieza polar magnética 44. Los procedimientos prácticos mediante los cuales puede conseguirse esto incluyen los siguientes, pero sin limitarse a estos: vibración momentánea del soporte 12; vibración momentánea del tubo capilar (52) dentro del soporte de muestra 12, exposición momentánea del tubo capilar (52) y el contenido a una onda acústica de alta presión; o la aplicación de un campo magnético en movimiento u oscilante, tal como de un electroimán. Estos procedimientos introducen una perturbación suficiente para facilitar la formación de un gránulo denso de un estado de energía más bajo. Además, existe la opción adicional de hacer que el gránulo se vuelva a formar mediante la manipulación del tubo capilar (52) con el fin de que el gránulo esté obligado a volver a formarse en una ubicación diferente en la pared del recipiente 24, por ejemplo mediante la extracción del tubo del campo magnético y su sustitución en una orientación alternativa, o extrayendo y volviendo a aplicar el imán 18 o imanes en una ubicación diferente en el tubo capilar (52).
- Las figuras 2A-C ilustran esquemáticamente tres procesos representativos y no exclusivos para una formación de gránulos compactos. En cada caso, la etapa (a) es la captura inicial de reactivos desde el punto de partida de una dispersión completa en el fluido de ensayo, la etapa (b) es la finalización de la captura inicial y la formación de gránulos y la etapa (c) implica obligar al gránulo a volverse a formar y concentrarse en un segundo punto de captura sin una redispersión significativa. Esto puede conseguirse mediante:
- Un único o una combinación de múltiples imanes permanentes que se mueven respecto al recipiente de muestra con el fin de efectuar la formación y manipulación de gránulos deseadas (figura 2A).
 - Una combinación de electroimanes para lograr el mismo efecto (figura 2B).
 - Un ajuste mecánico de la posición del tubo en el receptáculo, por ejemplo un giro de 180° de un recipiente de muestra cilíndrico para forzar el reposicionamiento de los gránulos (figura 2C).

En ciertas realizaciones de una unidad de captura/interrogación integrada puede ser un reto diseñar un conjunto magnético que genera un campo magnético lo suficientemente fuerte como para arrastrar las partículas magnéticas a través de la solución de ensayo, para formar un gránulo adecuado, así como para proporcionar un espacio libre para la lectura óptica. Por lo tanto, puede ser ventajoso tener una concentración magnética que se produzca en un

lado del tubo capilar (52) mientras la lectura óptica se produce en el lado opuesto del recipiente. En una realización de este tipo, cualquier curvatura del tubo capilar (52) más los efectos ópticos de los componentes de ensayo contenidos en el mismo pueden actuar como elemento óptico. Es deseable, tal como se ha descrito anteriormente, conseguir un punto de iluminación y una zona de captación pequeños. Por consiguiente, el sistema óptico asociado al espectrómetro 40 puede diseñarse para compensar los efectos ópticos del tubo capilar (52).

Aunque las realizaciones de las figuras 3-5 muestran tubos capilares (52) individuales, pueden prepararse y realizarse fácilmente ensayos paralelos de alto rendimiento utilizando múltiples soportes de tubos capilares de ensayo paralelos e imanes. La etapa concentradora magnética y la lectura podrían producirse en paralelo o en serie.

Ha sido utilizado experimentalmente con éxito un imán esférico de NdFeB (tierras raras) de $\frac{1}{2}$ " para crear un gránulo de perlas magnéticas y etiquetas SERS asociadas en una única etapa de descenso. El tubo capilar (52) utilizado fue un tubo de microcentrifugadora de polipropileno de 200 μ L con 100 μ L o menos de reactivo. Tal como se muestra en la gráfica 46 de la figura 1, se obtuvo un descenso adecuado de partículas dando lugar a una señal óptica de estado relativamente estacionario en menos de un minuto.

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

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

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

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

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

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

rendimiento básico descritas aquí están dentro del alcance de esta divulgación.

En algunas realizaciones, una pequeña perla compuesta por un material de alta permeabilidad magnética (por ejemplo, níquel, cobalto, etc.) puede colocarse en el recipiente de reacción. La presencia de la perla de alta permeabilidad centrará las líneas de campo magnético, creando así un gradiente de campo magnético elevado para atraer las partículas magnéticas. El complejo partícula magnética/etiqueta de ensayo podría asociarse alrededor de la perla y todo el gran conjunto, que consiste en una gran "perla" con las partículas magnéticas pequeñas circundantes y se representarían etiquetas de ensayo. Esta técnica podría ayudar a obtener un gránulo esférico reproducible para una interrogación óptima.

En determinadas realizaciones puede ser deseable, ya sea en un sistema de rendimiento nominal o alto, eliminar la necesidad de volver a formar o acondicionar los gránulos. En las figuras 3 y 4 se ilustra esquemáticamente un aparato adecuado para utilizarse sin acondicionamiento de gránulos. El aparato 50 incluye un tubo capilar 52. El tubo capilar 52 está en comunicación fluida con una suspensión de partículas de ensayo 54. Cuando la suspensión de partículas 54 fluye a través del tubo capilar 52, las partículas magnéticas se concentran dentro del tubo 52 mediante un imán de captura 18 que puede o no estar asociado a una pieza polar 44. El imán de captura 18 sirve para concentrar partículas magnéticas en una zona de concentración magnética específica 20 dentro del tubo capilar 52. Un espectrómetro u otro dispositivo de interrogación que puede ser un espectrómetro Raman 40 está asociado operativamente al tubo capilar 52 y enfocado en la zona de concentración magnética 20. Tal como se muestra en las figuras 3 y 4, la interrogación óptica puede producirse a lo largo de una trayectoria óptica que es opuesta al eje magnético o simplemente desplazada del mismo.

El uso de un tubo capilar 52 como recipiente de muestra proporciona varias ventajas diferentes que incluyen, pero sin limitarse a estas:

- Una colocación precisa de partículas magnéticas respecto al área pequeña interrogada por un sistema típico basado en láser. Esto potencialmente mejorará la precisión de la medida donde se requiera una determinación cuantitativa.
- El recipiente de muestreo tiene inherentemente una elevada calidad óptica. Por ejemplo, el tubo capilar 52 puede tener lados planos y estar fabricado de un material que sea transparente a las longitudes de onda necesarias. El tubo capilar 52 también es potencialmente fijo en una posición respecto a componentes magnéticos y ópticos.
- Un aparato de tubo capilar 50 permite llevar a cabo pruebas con pequeños volúmenes de muestra de menos de 100 microlitros y pequeñas cantidades de reactivos, lo que puede resultar en una mejor sensibilidad.
- Un aparato de tubo capilar 50 permite una rápida recogida de un gránulo de muestra que no requiera acondicionamiento. El gránulo está contenido en un área pequeña e inherentemente queda firmemente empaquetado. No se requiere que el elemento magnético proporcione fuerzas de atracción a gran distancia, ya que la pared del tubo capilar y el polo magnético están dispuestos muy ajustados (por ejemplo, con una separación de no más de 1 mm). Esto es ventajoso, ya que la fuerza de atracción experimentada por las partículas magnéticas cae rápidamente al aumentar la distancia desde el polo o pieza polar 44 de un sistema de imanes.
- El volumen de fluido interrogado por el lector se reduce significativamente por el uso de un recipiente capilar estrecho. Por lo tanto, la cantidad de etiqueta no unida, que de otra manera contribuiría con una "señal de fondo" no deseada, puede hacerse muy pequeña.
- El uso de electroimanes en el mecanismo de captura puede permitir la recogida de partículas magnéticas en la zona de concentración y un posterior enjuague de las partículas de esta zona. De esta manera, el recipiente podría utilizarse en serie para leer desde múltiples reacciones de ensayo de muestra. Esto podría funcionar a petición, o de una manera semicontinua formando parte de un sistema automatizado más grande en el cual se ejecuten muchas pruebas en secuencia.
- También podría utilizarse un aparato de tubo capilar 50 para implementar un dispositivo de ensayo de flujo lateral. En una realización de ensayo de flujo lateral, un tubo capilar asociado a un imán sustituye la tira de fibra de celulosa típica u otra matriz. Puede disponerse un depósito o una almohadilla de depósito que contenga reactivos adsorbidos (por ejemplo: etiquetas SERS y partículas magnéticas) en comunicación con una abertura en el tubo capilar. La introducción de fluido analito en el depósito tiene como resultado una liberación de partículas de reactivos, a las cuales se hace fluir a lo largo del capilar con el analito en solución. El imán atrapa partículas magnéticas en una ubicación definida con precisión. Cualquier etiqueta tal como partículas SERS unidas a partículas magnéticas puede ser detectada por medio de un espectrómetro Raman dirigido en el punto de captura. La posición precisa del punto de captura respecto al espectrómetro puede efectuarse a través del sistema de imanes.

La realización de flujo lateral basado en un tubo capilar descrito inmediatamente antes es adecuado para utilizarse como sistema de ensayo integrado que, si se desea, podría desarrollarse en un factor de forma muy compacto para un uso en ensayo de campo altamente preciso y repetible. En la figura 5 se ilustra esquemáticamente un sistema integrado 60 conforme a esta realización. En la realización de la figura 5, el tubo capilar 52 está montado en un cartucho de muestra 62. El tubo capilar 52 está en comunicación con un depósito de muestra 64 formado en el

cartucho de muestra 62. La suspensión de partículas de ensayo 54 necesaria para llevar a cabo un ensayo que incluye partículas magnéticas y reactivos puede mezclarse en el depósito de muestra 64. Dado que el depósito de muestra 64 está en comunicación fluida con el tubo capilar 52, la suspensión de ensayo completamente reaccionada 54 se extrae fácilmente hacia la zona de concentración magnética 20 por acción capilar. Además, el exceso de 5 partículas de ensayo se elimina de la zona de concentración magnética 20 minimizando la señal de fondo. En la zona de captura magnética 20, un imán 18 concentrará partículas magnéticas tal como se ha descrito anteriormente en el plano focal de un espectrómetro 40, donde puede producirse la interrogación óptica de la muestra concentrada.

10 El sistema integrado 60 de la figura 5 puede fabricarse con un receptáculo de soporte para cartuchos 66 configurado para recibir y posicionar con precisión el cartucho 62 de modo que la zona de captura magnética 20 quede correctamente alineada. El sistema 60 también puede incluir elementos de procesamiento de datos 68 asociados al espectrómetro que permiten que el aparato 60 se utilice como dispositivo de ensayo portátil y potencialmente independiente y manual.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato de ensayo (60) que comprende:

- 5 un tubo capilar (52);
un depósito de muestra (64);
un cartucho de muestra (62) en el que el depósito de muestra (64) está formado y en el que el tubo capilar (52) está montado, por lo que el tubo capilar (52) está en comunicación fluida con el depósito (64);
un soporte (66) configurado para recibir el cartucho de muestra (62);
10 un imán (18) asociado operativamente al soporte (66) de manera que un campo magnético interseca con una parte del tubo capilar (52) definiendo una zona de concentración magnética (20) dentro del tubo capilar (52); y
un espectrómetro (40) asociado operativamente al soporte (66), de manera que el foco del espectrómetro (40) está dentro de la zona de concentración magnética (20);

15 2. El aparato de ensayo según la reivindicación 1, en el que el espectrómetro (40) es un espectrómetro Raman.

3. El aparato de ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además medios para estimular la concentración compacta asociada operativamente al tubo capilar (52);
preferentemente en el que los medios para estimular la concentración compacta se seleccionan de un grupo que
20 consiste en un estimulador electromagnético; un vibrador; un transductor acústico y un agitador mecánico.

4. El aparato de ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el imán (18) y el espectrómetro (40) están posicionados para minimizar la cantidad de fluido de ensayo fuera de la zona de concentración magnética (20), pero dentro de una trayectoria óptica entre el espectrómetro (40) y la zona de
25 concentración magnética (20).

5. El aparato de ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el imán (18) está posicionado para hacer que la zona de concentración magnética (20) se forme sustancialmente adyacente a una ubicación en la que una trayectoria óptica entre el espectrómetro (40) y la zona de concentración magnética (20) interseca
30 inicialmente el interior del tubo capilar (52).

6. El aparato de ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el tubo capilar (52) comprende además una pared interna, en el que una parte de la pared interna que es intersecada inicialmente por una trayectoria óptica desde el espectrómetro (40) define una interfaz y en el que la zona de concentración magnética
35 (20) se forma sustancialmente adyacente a la interfaz.

7. Un procedimiento para realizar un ensayo, que comprende:

- 40 asociar partículas de captura magnéticas a partículas de detección en un tubo capilar (52) de un cartucho de muestra (62) en el que un depósito de muestra (64) está formado y en el que el tubo capilar (52) está montado, por lo que el tubo capilar (52) está en comunicación fluida con el depósito (64);
colocar el cartucho de muestra (62) en un soporte (66) configurado para recibir el cartucho de muestra (62) y sujetarlo en una relación exclusiva con un imán (18) y un espectrómetro (40) asociado al soporte;
45 concentrar magnéticamente las partículas de captura magnéticas en una zona de concentración (20) del tubo capilar (52), de manera que el foco del espectrómetro (40) esté dentro de la zona de concentración magnética (20);
y obtener un espectro desde la zona de concentración magnética (20).

8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que el espectro obtenido desde la zona de concentración magnética (20) es un espectro Raman, preferentemente en el que el espectro Raman se obtiene a partir de una etiqueta SERS asociada a las partículas de captura magnéticas en la zona de concentración magnética (20).

9. El procedimiento para realizar un ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, que comprende además estimular la concentración compacta de las partículas de captura magnéticas en la zona de concentración
55 (20);
preferentemente en el que la etapa de estimulación comprende por lo menos una de agitar mecánicamente el tubo capilar (52); hacer vibrar el tubo capilar (52); proyectar una onda acústica a través del tubo capilar (52) y hacer pasar un campo magnético en movimiento a través de una parte del tubo capilar (52).

60 10. El procedimiento para realizar un ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que el imán (18) y el espectrómetro (40) están posicionados para minimizar la cantidad de fluido de ensayo fuera de la zona de concentración magnética (20), pero dentro de una trayectoria óptica entre el espectrómetro (40) y la zona de concentración magnética (20).

65 11. El procedimiento para realizar un ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que el imán

(18) está posicionado para hacer que la zona de concentración magnética (20) se forme sustancialmente adyacente a una ubicación en la que una trayectoria óptica entre el espectrómetro (40) y la zona de concentración magnética (20) interseca inicialmente el interior del tubo capilar (52).

- 5 12. El procedimiento para realizar un ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que el tubo capilar (52) comprende además una pared interna, en el que una parte de la pared interna, la cual se interseca inicialmente por una trayectoria óptica desde el espectrómetro (40), define una interfaz, y en el que la zona de concentración magnética (20) se forma sustancialmente adyacente a la interfaz.
- 10 13. El procedimiento para realizar un ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que la etapa de simulación comprende por lo menos una de reposicionar el tubo capilar (52) respecto al imán (18); reposicionar el imán (18) respecto al tubo capilar (52) y aplicar un campo magnético desde más de un imán (18) al tubo capilar (52).

Fig. 1

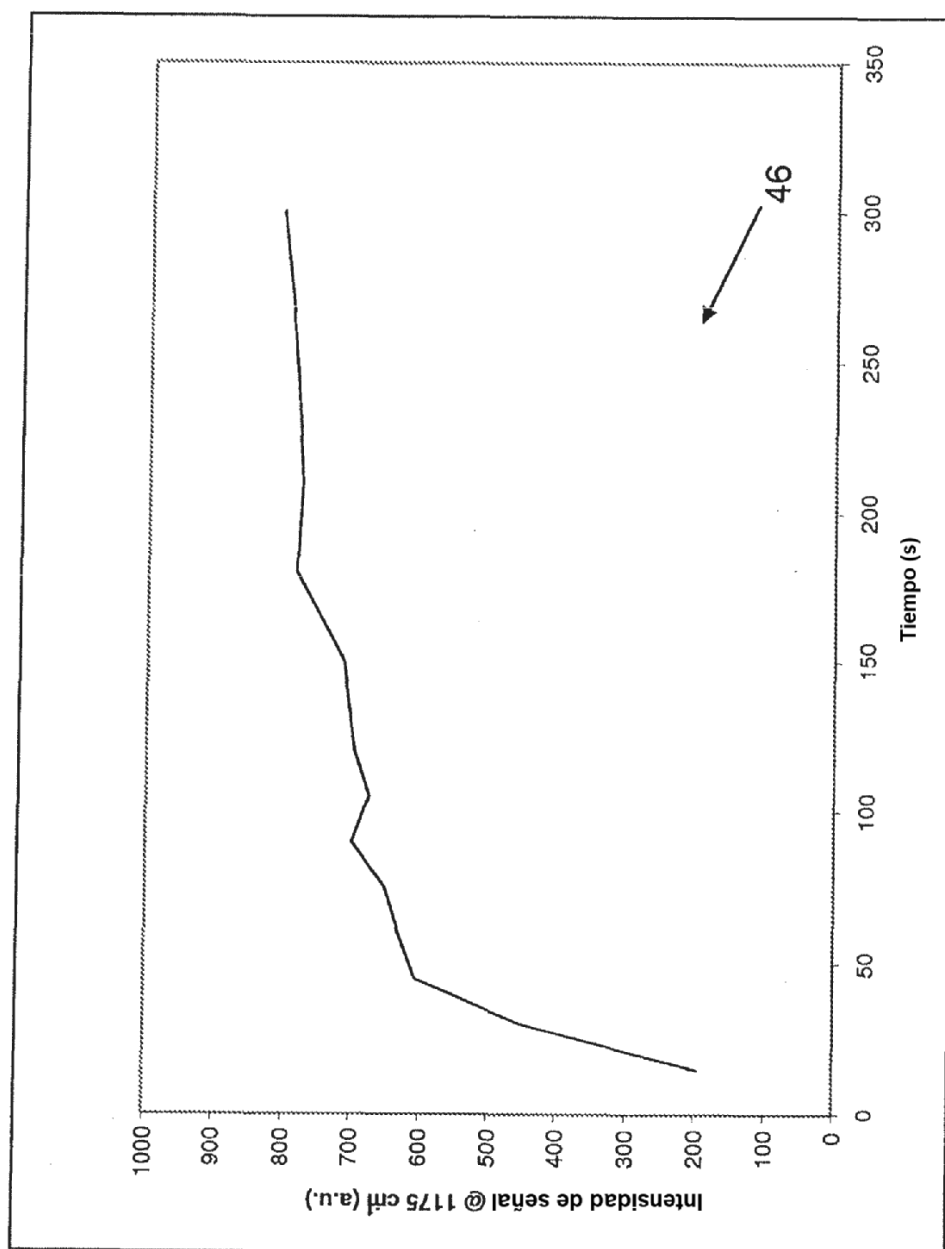


Fig. 2

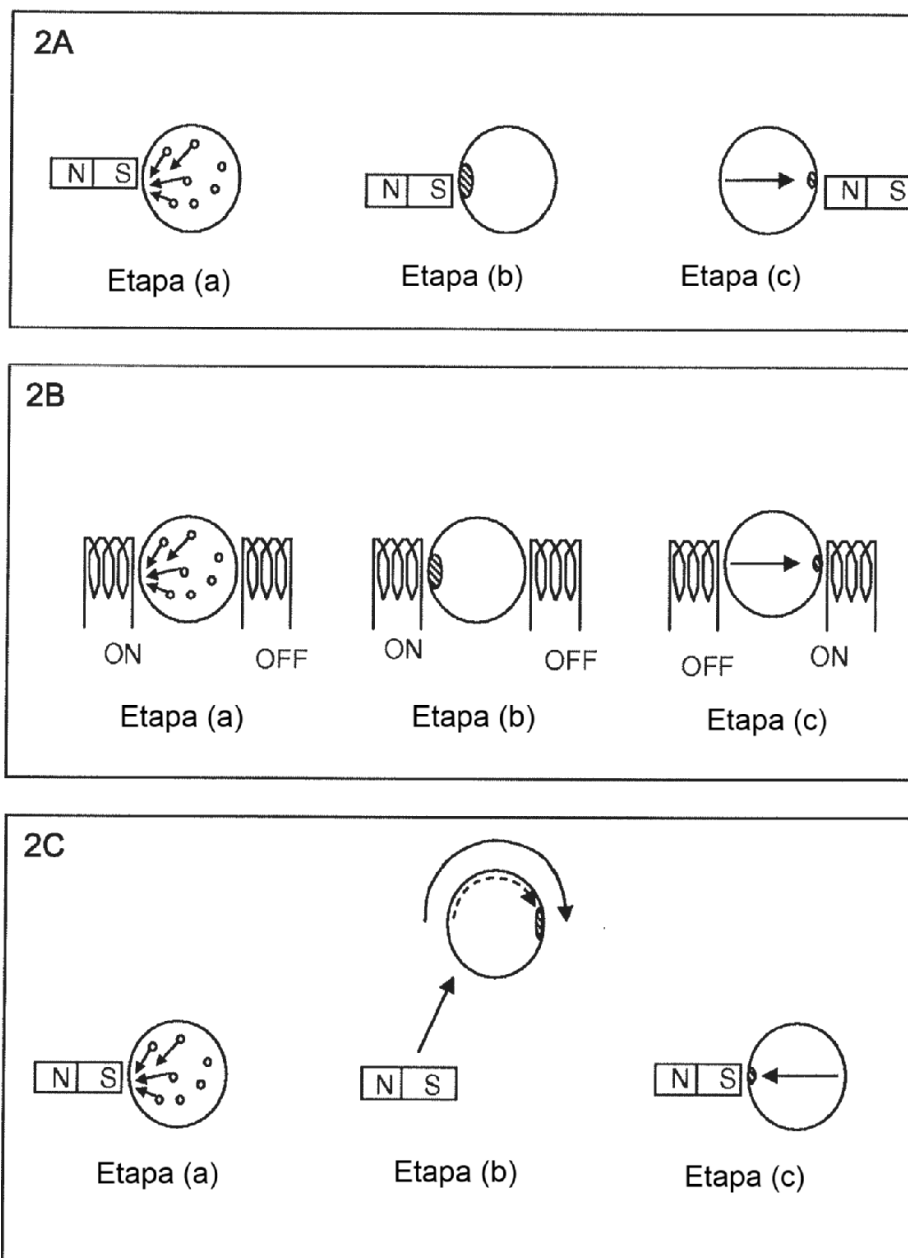


Fig. 3

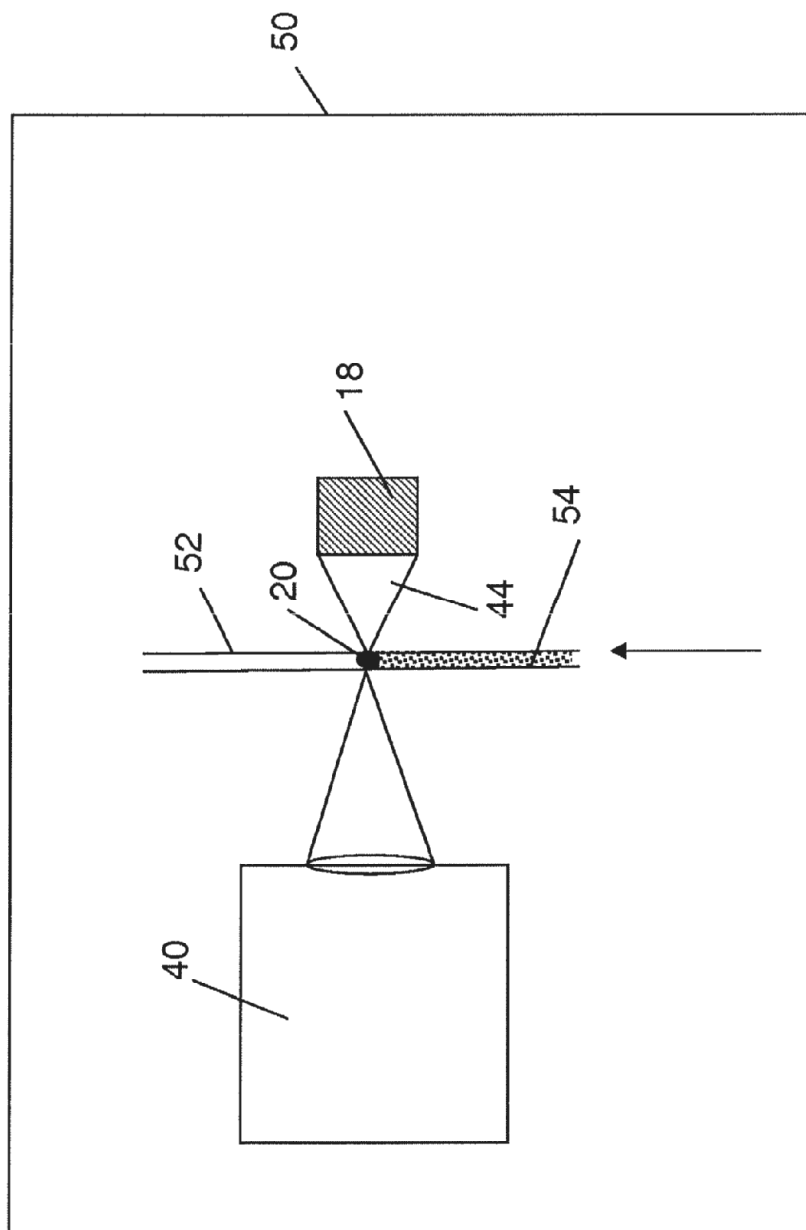


Fig. 4

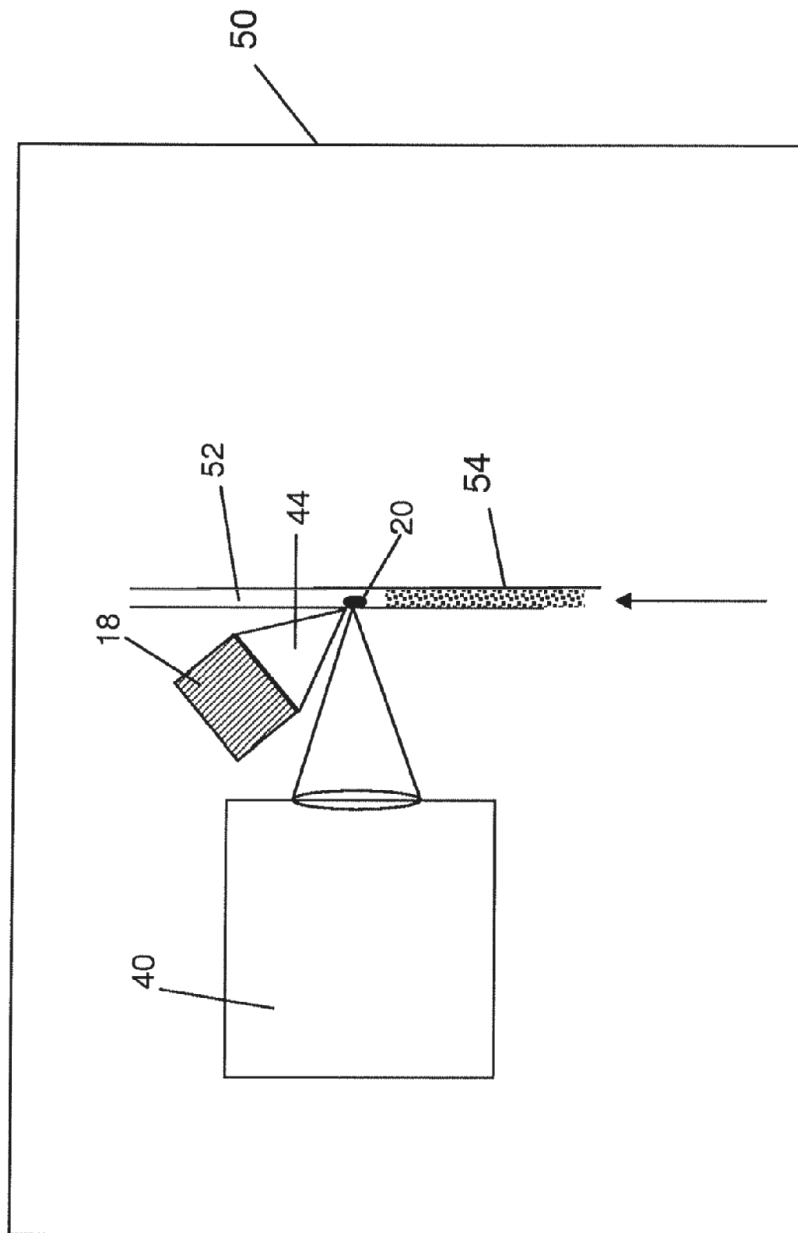
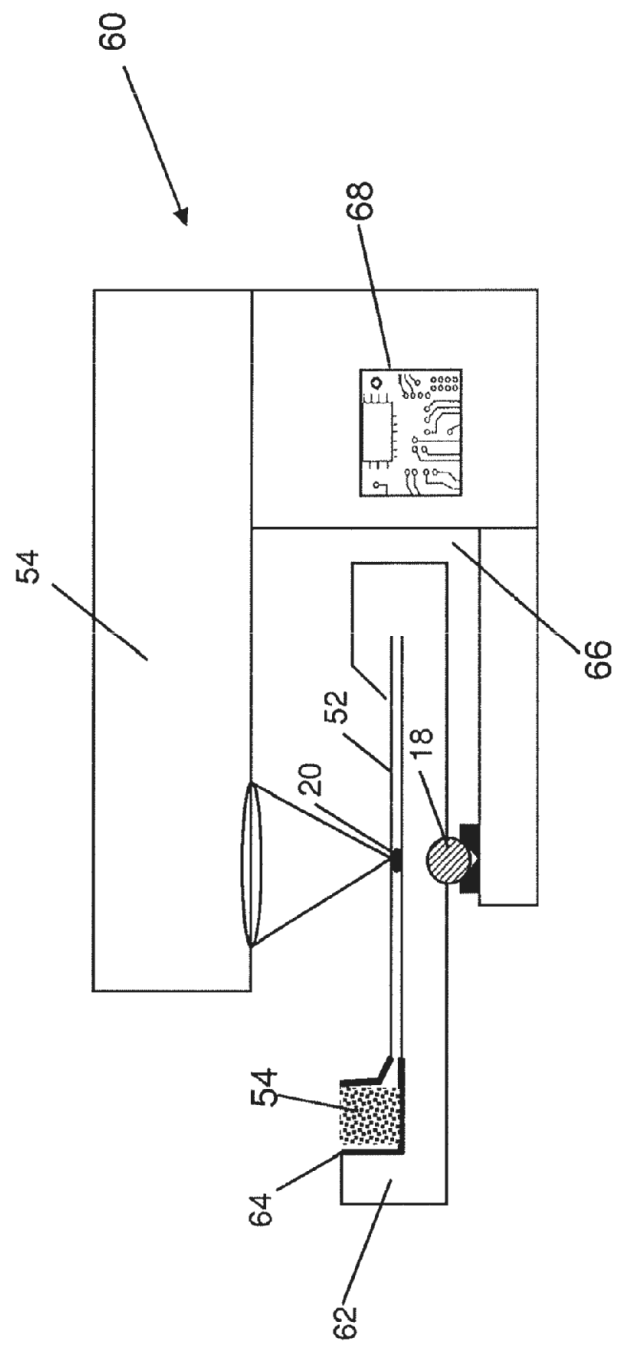


Fig. 5



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 2006240572 A1 [0004]
- US 0761878 W [0012]