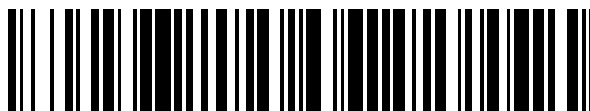


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 965**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/553** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2011 PCT/US2011/033184**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2011 WO11133630**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2011 E 11772606 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2561360**

54 Título: **Aislamiento de un analito diana a partir de un fluido corporal**

30 Prioridad:

**21.04.2010 US 326588 P**  
**04.08.2010 US 850203**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.03.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CLARIZIA, LISA-JO, ANN;**  
**ADAMS, EDDIE, W. y**  
**DRYGA, SERGEY, A.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 656 965 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

Aislamiento de un analito diana a partir de un fluido corporal

## 5 Campo de la invención

La divulgación se refiere en general al uso de partículas magnéticas e imanes para aislar un analito diana a partir de una muestra de fluido corporal.

## 10 Antecedentes

Los patógenos transmitidos por la sangre son un problema de atención sanitaria importante. Un diagnóstico tardío o inadecuado de una infección bacteriana puede causar sepsis - una respuesta inflamatoria seria y, a menudo mortal, a la infección. La sepsis es la 10<sup>a</sup> causa principal de muerte en los Estados Unidos. La detección temprana de infecciones bacterianas en sangre es la clave para prevenir la aparición de la sepsis. Los métodos tradicionales de detección e identificación de la infección transmitida por la sangre incluyen hemocultivo y ensayos de sensibilidad a antibióticos. Estos métodos requieren normalmente el cultivo de células, que puede ser costoso y puede tardar hasta 72 horas. A menudo, se producirá el choque séptico antes de que se puedan obtener los resultados del cultivo celular.

Los métodos alternativos de detección de patógenos, en particular bacterias, se han descrito por otros. Estos métodos incluyen métodos de detección molecular, métodos de detección de antígenos y métodos de detección de metabolitos. Los métodos de detección molecular, tanto si implican la captura híbrida o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), requieren altas concentraciones de ADN purificado para la detección. Ambos métodos de detección de antígeno y de detección de metabolitos también requieren una cantidad relativamente grande de bacterias y tienen un alto límite de detección (normalmente > 10<sup>4</sup> UFC/ml), requiriendo de este modo una etapa de enriquecimiento antes de la detección. Este periodo de incubación/enriquecimiento tiene por objeto permitir el crecimiento de bacterias y un aumento en el número de células bacterianas para ayudar con más facilidad a la identificación. En muchos casos, se necesita una serie de dos o tres incubaciones separadas para aislar las bacterias diana. Sin embargo, dichas etapas de enriquecimiento requieren una cantidad significativa de tiempo (p. ej., al menos durante unos días a una semana) y, potencialmente, pueden comprometer la sensibilidad del ensayo al destruir algunas de las células que se pretenden medir.

Existe una necesidad de métodos de aislamiento de analitos diana, tales como bacterias, a partir de una muestra, tal como una muestra sanguínea, sin una etapa de enriquecimiento adicional. También existe una necesidad de métodos de aislamiento de analitos diana que sean rápidos y sensibles con el fin de proporcionar datos para las decisiones del tratamiento de pacientes en un plazo clínicamente relevante.

## 40 Sumario

La presente divulgación proporciona métodos y dispositivos para el aislamiento de patógenos en una muestra biológica. La invención permite la detección rápida de patógenos a niveles muy bajos en la muestra; permitiendo de este modo la detección precoz y precisa y la identificación del patógeno. La invención se lleva a cabo con partículas magnéticas que tienen una fracción de unión específica a la diana. Los métodos de la invención implican la introducción de partículas magnéticas que incluye una fracción de unión específica de la diana a una muestra de fluido corporal con el fin de crear una mezcla, la incubación de la mezcla para permitir que las partículas se unan a una diana, la aplicación de un campo magnético para capturar complejos diana/partícula magnética sobre una superficie, y el lavado con una solución de lavado que reduce la agregación de partículas, aislando así complejos diana/partícula magnética. Una ventaja particular de los métodos de la invención es la captura y aislamiento de bacterias y hongos directamente de muestras sanguíneas a bajas concentraciones que están presentes en numerosas muestras clínicas (en el nivel más bajo posible 1 UFC/ml de bacterias en una muestra sanguínea).

La fracción de unión específica de la diana dependerá de la diana que se va a capturar. La fracción puede ser cualquier fracción de captura conocida en la técnica, tal como un anticuerpo, un aptámero, un ácido nucleico, una proteína, un receptor, un fago o un ligando. En realizaciones particulares, la fracción de unión específica de la diana es un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es específico para las bacterias. En otras realizaciones, el anticuerpo es específico para los hongos.

El analito diana se refiere a la diana que se va a capturar y aislar por métodos de la invención. La diana puede ser una bacteria, un hongo, una proteína, una célula, un virus, un ácido nucleico, un receptor, un ligando o cualquier molécula conocida en la técnica. En ciertas realizaciones, la diana es una bacteria patógena. En otras realizaciones, la diana es una bacteria gram positiva o gram negativa. Las especies bacterianas a modo de ejemplo que pueden ser capturadas y aisladas por métodos de la invención incluyen *E. coli*, *Listeria*, *Clostridium*, *Mycobacterium*, *Shigella*, *Borrelia*, *Campylobacter*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Pneumococcus*, *Streptococcus* y una combinación de las mismas.

Los métodos de la invención se pueden realizar con cualquier tipo de partícula magnética. Las partículas magnéticas se agrupan generalmente en dos amplias categorías. La primera categoría incluye partículas que son permanentemente magnetizables o ferromagnéticas; y la segunda categoría incluye partículas que demuestran un comportamiento magnético mayor solamente cuando se someten a un campo magnético. Esta última se refiere como partículas magnéticamente sensibles. Los materiales que demuestran un comportamiento magnéticamente sensible se describen en ocasiones como superparamagnéticos. Sin embargo, los materiales que exhiben propiedades ferromagnéticas mayores, p. ej., óxido de hierro magnético, se pueden caracterizar como superparamagnéticos cuando se proporcionan en cristales de aproximadamente 30 nm o menos de diámetro. Los cristales más grandes de materiales ferromagnéticos, por el contrario, conservan las características magnéticas permanentes tras la exposición a un campo magnético y tienden a agregarse posteriormente debido a la fuerte interacción partícula-partícula. En ciertas realizaciones, las partículas son perlas superparamagnéticas. En otras realizaciones, las partículas magnéticas incluyen al menos un 70 % de perlas superparamagnéticas en peso. En ciertas realizaciones, las perlas superparamagnéticas tienen un diámetro de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 250 nm. En ciertas realizaciones, la partícula magnética es una partícula magnética que contiene hierro. En otras realizaciones, la partícula magnética incluye óxido de hierro o platino de hierro.

En ciertas realizaciones, la etapa de incubación incluye la incubación de la mezcla en un tampón que inhibe la lisis celular. En ciertas realizaciones, el tampón incluye clorhidrato de Tris(hidroximetil)-aminometano en una concentración comprendida entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 100 mM, preferentemente de manera aproximada 75 mM. En otras realizaciones, los métodos de la divulgación incluyen además la retención de las partículas magnéticas en un campo magnético durante la etapa de lavado. Los métodos de la invención se pueden usar con cualquier fluido corporal. Los fluidos corporales a modo de ejemplo incluyen sangre, esputo, suero, plasma, orina, saliva, sudor y líquido cefalorraquídeo.

Otro aspecto proporciona métodos de aislamiento de un microorganismo diana a partir de una muestra de fluido corporal que incluye la introducción de partículas magnéticas que tienen una fracción de unión específica de la diana a una muestra de fluido corporal con el fin de crear una mezcla, la incubación de la mezcla para permitir que las partículas se unan a la diana, la aplicación de un campo magnético para aislar sobre una superficie las partículas magnéticas en la que se une la diana, el lavado de la mezcla en una solución de lavado que reduce la agregación de partículas, y la lisis de las bacterias capturadas y la extracción de ADN para su posterior análisis por PCR, una hibridación de micromatrices o una secuenciación.

Otro aspecto proporciona métodos de aislamiento con un nivel tan bajo como 1 UFC/ml de bacterias en una muestra sanguínea que incluye la introducción de partículas superparamagnéticas que tienen un diámetro de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 250 nm y que tienen una fracción de unión específica de bacterias a una muestra de fluido corporal con el fin de crear una mezcla, la incubación de dicha mezcla para permitir que dichas partículas se unan a una bacteria, la aplicación de un campo magnético para aislar sobre una superficie complejos de bacteria/partícula magnética, y el lavado de la mezcla en una solución de lavado que reduce la agregación de partículas, aislando de este modo un nivel tan bajo como 1 UFC/ml viables de bacterias en la muestra sanguínea.

#### Descripción detallada

La divulgación se refiere en general al uso de partículas magnéticas que capturan patógenos diana en una muestra de fluido corporal e imanes para aislar la diana. Los métodos de la divulgación implican la introducción de partículas magnéticas que incluyen una fracción de unión específica de la diana a una muestra de fluido corporal con el fin de crear una mezcla, la incubación de la mezcla para permitir que las partículas se unan a una diana, la aplicación de un campo magnético para capturar complejos diana/partícula magnética en una superficie, y el lavado de la mezcla en una solución de lavado que reduce la agregación de partículas, aislando de este modo complejos diana/partícula magnética. Ciertas tecnologías y principios fundamentales están asociados con la unión de materiales magnéticos a entidades diana y la separación posterior mediante el uso de campos magnéticos y gradientes. Dichas tecnologías fundamentales y principios son conocidos en la técnica y se han descrito previamente en Janeway (*Immunobiology*, 6ª edición, Garland Science Publishing). Los métodos de la divulgación implican la recogida de un fluido corporal que tiene un analito diana en un recipiente, tal como un tubo de recogida de sangre (p. ej., VACUTAINER, tubo de ensayo diseñado específicamente para la venopunción, disponible comercialmente en Becton, Dickinson and Company). En ciertas realizaciones, se añade una solución que previene o reduce la agregación de factores de agregación endógenos, tales como heparina en el caso de la sangre.

Un fluido corporal se refiere a un material líquido derivado de, por ejemplo, un ser humano u otro mamífero. Tales fluidos corporales incluyen, entre otros, moco, sangre, plasma, suero, derivados de suero, bilis, flema, saliva, sudor, líquido amniótico, líquido mamario, orina, esputo y líquido cefalorraquídeo (LCR), tal como LCR lumbar o ventricular. Un fluido corporal puede ser también un aspirado con aguja fina. Un fluido corporal puede ser también medios que contienen células o material biológico. En realizaciones particulares, el fluido es sangre.

Los métodos de la invención pueden usarse para detectar cualquier analito diana. El analito diana se refiere a la sustancia en la muestra que se va a capturar y aislar por métodos de la invención. La diana puede ser una bacteria,

un hongo, una proteína, una célula (tal como una célula cancerígena, un glóbulo blanco, una célula viralmente infectada o una célula fetal que circula en la circulación materna), un virus, un ácido nucleico (p. ej., ADN o ARN), un receptor, un ligando, una hormona, un fármaco, una sustancia química o cualquier molécula conocida en la técnica. En ciertas realizaciones, la diana es una bacteria patógena. En otras realizaciones, la diana es una bacteria gram positiva o gram negativa. Las especies bacterianas a modo de ejemplo que pueden ser capturadas y aisladas por métodos de la invención incluyen *E. coli*, *Listeria*, *Clostridium*, *Mycobacterium*, *Shigella*, *Borrelia*, *Campylobacter*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Pneumococcus*, *Streptococcus* y una combinación de las mismas.

La muestra se mezcla a continuación con partículas magnéticas que incluyen una fracción de unión específica de la diana para generar una mezcla que se deja incubar de modo tal que las partículas se unen a una diana en la muestra, tal como una bacteria en una muestra sanguínea. La mezcla se deja incubar durante un tiempo suficiente para permitir que las partículas se unan al analito diana. El proceso de unión de las partículas magnéticas a los analitos diana asocia un momento magnético con los analitos diana, y por tanto permite a los analitos diana que se manipulen por fuerzas generadas por campos magnéticos sobre el momento magnético adjunto.

En general, el tiempo de incubación dependerá del grado deseado de unión entre el analito diana y las perlas magnéticas (p. ej., la cantidad de momento que se uniría deseablemente a la diana), la cantidad del momento por diana, la cantidad de tiempo de mezcla, el tipo de mezcla, los reactivos presentes para promover la unión y el sistema de la química de unión que se está empleando. El tiempo de incubación puede ir desde aproximadamente 5 segundos a unos pocos días. Los tiempos de incubación a modo de ejemplo oscilan de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 2 horas. La unión se produce en un amplio intervalo de temperaturas, generalmente entre 15 °C y 40 °C.

Los métodos de la invención se pueden realizar con cualquier tipo de partícula magnética. La producción de partículas magnéticas y partículas para su uso con la invención es conocida en la técnica. Véase, por ejemplo Giaeever (documento U.S. 3.970.518), Senyi *et al.* (documento U.S. 4.230.685), Dodin *et al.* (documento U.S. 4.677.055), Whitehead *et al.* (documento U.S. 4.695.393), Benjamin *et al.* (documento U.S. 5.695.946), Giaeever (documento U.S. 4.018.886), Rembaum (documento U.S. 4.267.234), Molday (documento U.S. 4.452.773), Whitehead *et al.* (documento U.S. 4.554.088), Forrest (documento U.S. 4.659.678), Liberti *et al.* (documento U.S. 5.186.827), Own *et al.* (documento U.S. 4.795.698), y Liberti *et al.* (documento WO 91/02811). Las partículas magnéticas se agrupan generalmente en dos amplias categorías. La primera categoría incluye partículas que son permanentemente magnetizables o ferromagnéticas; y la segunda categoría incluye partículas que demuestran un comportamiento magnético mayor solamente cuando se someten a un campo magnético. Esta última hace referencia a partículas magnéticamente sensibles. Los materiales que exhiben un comportamiento magnéticamente sensible se describen en ocasiones como superparamagnéticos. Sin embargo, los materiales que exhiben propiedades ferromagnéticas mayores, p. ej., óxido de hierro magnético, se pueden caracterizar como superparamagnéticos cuando se proporcionan en cristales con un diámetro de aproximadamente 30 nm o menos. Los cristales más grandes de materiales ferromagnéticos, por el contrario, conservan las características magnéticas permanentes tras la exposición a un campo magnético y tienden a agregarse posteriormente debido a la fuerte interacción partícula-partícula. En ciertas realizaciones, las partículas son perlas superparamagnéticas. En ciertas realizaciones, la partícula magnética es una partícula magnética que contiene hierro. En otras realizaciones, la partícula magnética incluye óxido de hierro o platino de hierro.

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

En ciertas realizaciones, las perlas superparamagnéticas son inferiores a un diámetro de 100 nm. En otras realizaciones, las perlas superparamagnéticas tienen aproximadamente un diámetro de 150 nm, tienen aproximadamente un diámetro de 200 nm, tienen aproximadamente un diámetro de 250 nm, tienen aproximadamente un diámetro de 300 nm, tienen aproximadamente un diámetro de 350 nm, tienen aproximadamente un diámetro de 400 nm, tienen aproximadamente un diámetro de 500 nm, o tienen aproximadamente un diámetro de 1.000 nm. En una realización particular, las perlas superparamagnéticas tienen aproximadamente un diámetro de 100 nm a aproximadamente un diámetro de 250 nm.

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

material o materiales magnéticos, tal como material o materiales de nanometal. Cuando el material o materiales de nanometal o cristal o cristales, tal como  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , son superparamagnéticas, pueden proporcionar propiedades ventajosas, tales como ser capaces de magnetizarse por un campo magnético externo, y desmagnetizarse cuando el campo magnético externo ha sido eliminado. Esto puede resultar ventajoso para facilitar el transporte de la muestra dentro y fuera de un área en la que la muestra se está procesando sin agregación de perlas indebida.

Se puede emplear uno o más o numerosos nanometal o nanometales diferentes, tal como  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , FePt, o Fe, en una configuración de núcleo-envoltura para proporcionar estabilidad y/u otros que pueden ser conocidos en la técnica. En muchas aplicaciones, puede ser ventajoso tener un nanometal que tiene un momento saturado tan alto por volumen como sea posible, ya que esto puede maximizar fuerzas relacionadas con un gradiente, y/o puede potenciar una señal asociada con la presencia de las perlas. También puede ser ventajoso tener la carga volumétrica en una perla lo más alta posible, para la razón o razones idénticas o similares. Con el fin de maximizar el momento proporcionado por un nanometal magnetizable, se puede proporcionar un cierto campo de saturación. Por ejemplo, para partículas superparamagnéticas  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , este campo puede comprenderse en el orden de aproximadamente 0,3T.

El tamaño del nanometal que contiene una perla puede ser optimizado para una aplicación particular, por ejemplo, maximizando el momento cargado sobre una diana, maximizando el número de perlas en una diana con una detectabilidad aceptable, maximizando un movimiento inducido por una fuerza deseada, y/o maximizando la diferencia en un momento adjunto entre la diana marcada y dianas unidas no específicamente o agregados de perlas o perlas individuales. Mientras se maximiza como referencia por ejemplo anteriormente, se contemplan otras optimizaciones o alteraciones, tales como la minimización u otras condiciones debidamente afectables.

En una realización a modo de ejemplo, una perla polimérica que contiene 80 % en peso de partículas superparamagnéticas  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  o, por ejemplo, 90 % en peso o partículas superparamagnéticas más altas, se produce mediante la encapsulación de partículas superparamagnéticas con un recubrimiento polimérico para producir una perla que tiene un diámetro de aproximadamente 250 nm.

Las partículas magnéticas para su uso con métodos de la invención tienen una fracción de unión específica de la diana que permite que las partículas se unan específicamente a la diana de interés en la muestra. La fracción específica de la diana puede ser cualquier molécula conocida en la técnica y dependerá de la diana que se va a capturar y aislar. Las fracciones de unión específica de la diana a modo de ejemplo incluyen ácidos nucleicos, proteínas, ligandos, anticuerpos, aptámeros, y receptores.

En realizaciones particulares, la fracción de unión específica de la diana es un anticuerpo, tal como un anticuerpo que se une a una bacteria particular. Las metodologías generales para la producción de anticuerpos, incluyendo los criterios que deben considerarse al elegir un animal para la producción de antisueños, se describen en Harlow *et al.* (*Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory, págs. 93-117, 1988). Por ejemplo, un animal de tamaño adecuado, tal como cabras, perros, ovejas, ratones, o camellos es inmunizado mediante la administración de una cantidad de inmunógeno, tales como bacterias diana, eficaces para producir una respuesta inmunitaria. Un protocolo a modo de ejemplo es según se indica. Al animal se le inyectan 100 miligramos de antígeno resuspendido en adyuvante, por ejemplo adyuvante completo de Freund, dependiente del tamaño del animal, seguido de tres semanas después con una inyección subcutánea de 100 microgramos a 100 miligramos de inmunógeno con adyuvante dependiente del tamaño del animal, por ejemplo el adyuvante incompleto de Freund. Las inyecciones subcutáneas o intraperitoneales adicionales cada dos semanas con un adyuvante, por ejemplo el adyuvante incompleto de Freund, se administran hasta que se alcanza un título adecuado de anticuerpos en la sangre del animal. Los títulos a modo de ejemplo incluyen un título de al menos aproximadamente 1:5.000 o un título de 1:100.000 o más, es decir, la dilución que tiene una actividad detectable. Los anticuerpos se purifican, por ejemplo, mediante purificación de afinidad en columnas que contienen resina de proteína G o resina de afinidad específica de la diana.

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

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

- Los métodos para unir la fracción de unión específica de la diana a la partícula magnética son conocidos en la técnica. El recubrimiento de las partículas magnéticas con anticuerpos es bien conocido en la técnica, véase por ejemplo Harlow *et al.* (*Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988), Hunter *et al.* (*Immunoassays for Clinical Chemistry*, págs. 147-162, eds., Churchill Livingstone, Edinborough, 1983), y Stanley (*Essentials in Immunology and Serology*, Delmar, págs. 152-153, 2002). Dicha metodología puede modificarse fácilmente por un experto en la materia para unir otros tipos de fracciones de unión específica de la diana a las partículas magnéticas. Ciertos tipos de partículas magnéticas recubiertas con una fracción funcional están disponibles comercialmente en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).
- En ciertas realizaciones, se añade una solución tampón a la muestra junto con las perlas magnéticas. Un tampón a modo de ejemplo incluye clorhidrato de Tris(hidroximetil)-aminometano en una concentración de aproximadamente 75 mM. Se ha descubierto que la composición tampón, los parámetros de mezcla (velocidad, tipo de mezcla, tal como rotación, agitación etc., y temperatura) influyen en la unión. Es importante mantener la osmolalidad de la solución final (p. ej., sangre + tampón) para mantener una alta eficacia de etiqueta. En ciertas realizaciones, los tampones usados en los métodos de la invención están diseñados para evitar la lisis de las células sanguíneas, para facilitar la unión eficaz de dianas con perlas magnéticas y para reducir la formación de agregados de perlas. Se ha descubierto que la solución tampón que contenía NaCl 300 mM, Tris-HCl 75 mM pH 8,0 y Tween 20 al 0,1 % cumple con estos objetivos de diseño.
- Sin quedar limitado por teoría o mecanismo de acción particular alguno, se cree que el cloruro de sodio es principalmente responsable de mantener la osmolalidad de la solución y de la reducción de la unión no específica de perla magnética a través de la interacción iónica. El clorhidrato de Tris(hidroximetil)-aminometano es un compuesto tampón bien establecido usado con frecuencia en biología para mantener el pH de una solución. Se ha descubierto que la concentración de 75 mM es beneficiosa y suficiente para una alta eficacia de unión. Del mismo modo, Tween 20 se usa ampliamente como un detergente suave para disminuir la unión no específica debido a las interacciones hidrófobas. Varios ensayos usan Tween 20 a concentraciones que oscilan de 0,01 % a 1 %. La concentración de 0,1 % parece ser óptima para el etiquetado eficaz de las bacterias, mientras se mantienen intactas las células sanguíneas.
- Un enfoque alternativo para lograr una alta eficacia de unión mientras se reduce el tiempo requerido para la etapa de unión es usar un mezclador estático, u otros dispositivos de mezcla que proporcionan un mezclado eficaz de muestras viscosas a caudales altos, tales como igual o aproximadamente a 5 ml/min. En una realización, la muestra se mezcla con tampón de unión en una relación de, o aproximadamente, 1:1, usando un conector de interfase de mezcla. La muestra diluida fluye entonces a través de un conector de interfase de mezcla en el que se mezcla con nanopartículas específicas de la diana. Los conectores de interfase de mezcla adicionales que proporcionan la mezcla de la muestra y nanopartículas específicas de antígenos se pueden unir aguas abajo para mejorar la eficacia de unión. El caudal combinado de la muestra etiquetada se selecciona de manera que sea compatible con el procesamiento aguas abajo.
- Después de la unión de las partículas magnéticas al analito diana en la mezcla para formar complejos diana/partícula magnética, un campo magnético se aplica a la mezcla para capturar los complejos en una superficie. Los componentes de la mezcla que no están unidos a las partículas magnéticas no se verán afectados por el campo magnético y permanecerán libres en la mezcla. Los métodos y aparatos para la separación de complejos diana/partícula magnética de otros componentes de una mezcla son conocidos en la técnica. Por ejemplo, una malla de acero puede estar acoplada a un imán, un canal o canales lineales pueden estar configurados con imanes adyacentes, o se pueden usar imanes cuadrupolares con flujo anular. Otros métodos y aparatos para la separación de complejos diana/partículas magnética de otros componentes de una mezcla se muestran en Rao *et al.* (documento U.S. 6.551.843), Liberti *et al.* (documento U.S. 5.622.831), Hatch *et al.* (documento U.S. 6.514.415), Benjamin *et al.* (documento U.S. 5.695.946), Liberti *et al.* (documento U.S. 5.186.827), Wang *et al.* (documento U.S. 5.541.072), Liberti *et al.* (documento U.S. 5.466.574), y Terstappen *et al.* (documento U.S. 6.623.983). En ciertas realizaciones, la captura magnética se consigue con alta eficacia mediante la utilización de una celda de captura de flujo continuo con una serie de fuertes imanes de barra de tierras raras colocados de manera perpendicular al flujo de la muestra. Cuando se usa una cámara de flujo con una trayectoria de flujo de sección transversal de 0,5 mm x 20 mm (alto x ancho) y 7 imanes de barra de NdFeB, el caudal podría ser tan alto como 5 ml/min o más, mientras que se logra una eficacia de captura cercana al 100 %.
- El tipo de separación magnética descrita anteriormente produce una captura eficaz de un analito diana y la eliminación de la mayoría de los componentes restantes de una mezcla de la muestra. Sin embargo, tal proceso produce una muestra que contiene un porcentaje muy alto de partículas magnéticas que no se unen a los analitos diana ya que las partículas magnéticas se añaden normalmente en exceso, así como las entidades diana no específicas. Las entidades diana no específicas pueden por ejemplo unirse con una eficacia mucho más baja, por ejemplo 1 % de la superficie, mientras que una diana de interés puede ser cargada en el 50 % o casi en el 100 % de la superficie disponible o sitios antigénicos disponibles. Sin embargo, incluso el 1 % de carga puede ser suficiente para impartir una fuerza necesaria para atrapar en una celda de flujo de gradiente magnético o cámara de muestra.

Por ejemplo, en el caso de la unión inmunomagnética de bacterias u hongos en una muestra sanguínea, la muestra puede incluir: dianas unidas a una concentración de aproximadamente 1/ml o a una concentración inferior a aproximadamente  $10^6$ /ml; partículas de fondo a una concentración de aproximadamente  $10^7$ /ml a aproximadamente  $10^{10}$ /ml; y dianas no específicas a una concentración de aproximadamente 10/ml a aproximadamente  $10^5$ /ml.

La presencia de partículas magnéticas que no se unen a analitos diana y a entidades diana no específicas en la superficie que incluye los complejos diana/partícula magnética interfiere con la capacidad de detectar con éxito la diana de interés. La captura magnética de la mezcla resultante, y el contacto cercano de las partículas magnéticas entre sí y dianas unidas, resultan en la formación de agregado que es difícil de dispensar y que podría ser resistente o inadecuado para posteriores etapas de procesamiento o análisis. Con el fin de eliminar las partículas magnéticas que no se unen a analitos diana y a entidades diana no específicas, los métodos de la invención implican el lavado de la superficie con una solución de lavado que reduce la agregación de partículas, aislando de este modo complejos diana/partícula magnética de las partículas magnéticas que no se unen a analitos diana y a entidades diana no específicas. La solución de lavado minimiza la formación de los agregados.

Los métodos de la invención pueden usar cualquier solución de lavado que imparta una carga neta negativa a la partícula magnética que no es suficiente para alterar la interacción entre la fracción específica de la diana de la partícula magnética y el analito diana. Sin quedar limitado por teoría o mecanismo de acción particular alguno, se cree que la unión de las moléculas con carga negativa en la solución de lavado a las partículas magnéticas proporciona una carga neta negativa a las partículas y facilita la dispersión de las partículas agregadas de forma no específica. Al mismo tiempo, la carga negativa neta no es suficiente para alterar una fuerte interacción entre la fracción específica de la diana de la partícula magnética y el analito diana (p. ej., una interacción anticuerpo-antígeno). Las soluciones a modo de ejemplo incluyen heparina, Tris-HCl, Tris-borato-EDTA (TBE), Tris-acetato-EDTA (TAE), Tris-cacodilato, HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico), TFS (tampón fosfato salino), PIPES (piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico), MES (ácido 2-N-morfolino)etanosulfónico), Tricina (N-(Tri(hidroximetil)metil)glicina), y agentes de tamponamiento similares. En ciertas realizaciones, se lleva a cabo solo un único ciclo de lavado. En otras formas de realización, se lleva a cabo más de un ciclo de lavado.

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

Una vez aislados los complejos diana/partícula magnética, la diana puede ser analizada por una multitud de tecnologías existentes, tales como RMN miniatura, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), espectrometría de masas, etiquetado fluorescente y visualización mediante observación microscópica, hibridación *in situ* fluorescente (HISF), ensayos de sensibilidad a los antibióticos basados en el crecimiento, y variedad de otros métodos que pueden llevarse a cabo con una diana purificada sin contaminación significativa de otros componentes de muestra. En una realización, las bacterias aisladas se lisan con una solución caotrópica, y ADN se une a la resina de extracción de ADN. Después del lavado de la resina, el ADN bacteriano se eluye y se usa en RT-PCR cuantitativa para detectar la presencia de una especie específica, y/o subclases de bacterias.

En otra realización, las bacterias capturadas se eliminan de las partículas magnéticas a las que se unen y la muestra procesada se mezcla con anticuerpos etiquetados con fluorescencia específicos para las bacterias o tinción de Gram fluorescente. Tras la incubación, la mezcla de reacción se filtra por un filtro de 0,2  $\mu$ m a 1,0  $\mu$ m para capturar bacterias etiquetadas al tiempo que permite que la mayoría de perlas libres y etiquetas fluorescentes pase a través del filtro. Las bacterias se visualizan en el filtro usando técnicas microscópicas, p. ej., la observación microscópica directa, escaneo láser u otros métodos automatizados de captura de imágenes. La presencia de bacterias se detecta a través de un análisis de imagen. Después de la detección positiva por técnicas visuales, las bacterias se pueden caracterizar adicionalmente usando PCR o métodos genómicos.

La detección de bacterias de interés se puede realizar mediante el uso de sondas de ácido nucleico siguiendo los procedimientos que son conocidos en la técnica. Se describen procedimientos adecuados para la detección de bacterias usando sondas de ácido nucleico, por ejemplo, en Stackebrandt *et al.* (documento U.S. 5.089.386), King *et al.* (documento WO 90/08841), Foster *et al.* (documento WO 92/15883), y Cossart *et al.* (documento WO 89/06699).

Un ensayo de sonda de ácido nucleico adecuado incluye generalmente un tratamiento de la muestra y lisis, la hibridación con la sonda o sondas seleccionadas, una captura de híbridos y una detección. La lisis de las bacterias es necesaria para liberar el ácido nucleico de las sondas. Las moléculas diana de ácidos nucleicos se liberan mediante un tratamiento con cualquiera de una serie de agentes de lisis, incluyendo sales de álcali (tales como NaOH), sales de guanidina (tales como tiocianato de guanidina), enzimas (tales como lisozima, mutanolisina y proteinasa K), y detergentes. La lisis de las bacterias, por lo tanto, libera tanto ADN como ARN, particularmente ARN ribosomal y ADN cromosómico de los cuales puede ser usado como las moléculas diana con la selección apropiada de una sonda adecuada. El uso de ARNr como la molécula o moléculas diana, puede resultar ventajoso puesto que los ARNr constituyen un componente significativo de la masa celular, proporcionando de ese modo una gran cantidad de moléculas diana. El uso de sondas de ARNr también potencia la especificidad de las bacterias de

interés, es decir, la detección positiva sin reactividad cruzada indeseable que puede dar lugar a falsos positivos o a una falsa detección.

La hibridación incluye la adición de las sondas de ácido nucleico específicas. En general, la hibridación es el procedimiento por el que se combinan dos ácidos nucleicos parcial o completamente complementarios, en condiciones de reacción definidas, de una manera anti-paralela para formar enlaces de hidrógeno específicos y estables. La selección o rigurosidad de las condiciones de hibridación/reacción se define por la longitud y la composición de base del enlace doble sonda/diana, así como por el nivel y la geometría de los apareamientos erróneos entre las dos cadenas de ácido nucleico. La rigurosidad también se rige por tales parámetros de reacción como temperatura, tipos y concentraciones de agentes desnaturizantes presentes y tipo y concentración de especies iónicas presentes en la solución de hibridación.

La fase de hibridación del ensayo de la sonda de ácido nucleico se lleva a cabo con una única sonda seleccionada o con una combinación de dos, tres o más sondas. Las sondas se seleccionan por tener secuencias que son homólogas a secuencias únicas de ácidos nucleicos del organismo diana. En general, una primera sonda de captura se usa para capturar moléculas híbridas formadas. La molécula híbrida se detecta entonces mediante el uso de reacción de anticuerpo o mediante el uso de una segunda sonda detectora que puede estar marcada con un radioisótopo (tal como fósforo-32) o una etiqueta fluorescente (tal como fluoresceína) o una etiqueta quimioluminiscente.

La detección de bacterias de interés también se puede realizar mediante el uso de técnicas de PCR. Una técnica de PCR adecuada se describe, por ejemplo, en Verhoef *et al.* (documento WO 92/08805). Tales protocolos se pueden aplicar directamente a las bacterias capturadas en las perlas magnéticas. Las bacterias se combinan con un tampón de lisis y las moléculas diana de ácido nucleico recogidas se usan entonces como el molde para la reacción de PCR.

Para la detección de las bacterias seleccionadas mediante el uso de anticuerpos, las bacterias aisladas se ponen en contacto con anticuerpos específicos para la bacteria de interés. Como se ha señalado anteriormente, pueden ser usados anticuerpos policlonales o monoclonales, pero en cualquier caso, tienen afinidad por las bacterias particulares a detectar. Estos anticuerpos, se adherirán/unirán a un material de las bacterias diana específicas. Con respecto al etiquetado de los anticuerpos, éstos están etiquetados ya sea directamente o indirectamente con etiquetas usadas en otros inmunoensayos conocidos. Los marcadores directos pueden incluir moléculas fluorescentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes, radiactivas, metálicas, de biotina o enzimáticas. Los métodos de la combinación de estas etiquetas a anticuerpos u otras macromoléculas son bien conocidos por los expertos en la materia. Los ejemplos incluyen los métodos de Hijmans, W. *et al.* (1969), *Clin. Exp. Immunol.* 4, 457-, para isotiocianato de fluoresceína, el método de Goding, J. W. (1976), *J. Immunol. Meth.* 13,215-, para isotiocianato de tetrametilrodamina, y el método de Ingrassia, E. (1980), *Meth. in Enzymol.* 70, 419-439 para enzimas.

Estos anticuerpos detectores también pueden etiquetarse indirectamente. En este caso, la molécula de detección real se une a un anticuerpo secundario o a otra molécula con afinidad de unión para el anticuerpo de superficie celular anti-bacterias. Si se usa un anticuerpo secundario es preferentemente un anticuerpo general correspondiente a una clase de anticuerpo (IgG e IgM) de las especies animales usadas para elevar los anticuerpos de superficie celular anti-bacterias. Por ejemplo, el segundo anticuerpo puede estar conjugado a una enzima, fosfatasa alcalina o con peroxidasa. Para detectar la etiqueta, después de que las bacterias de interés se pongan en contacto con el segundo anticuerpo y se laven, el componente aislado de la muestra se sumerge en una solución que contiene un sustrato cromogénico, ya sea fosfatasa alcalina o peroxidasa. Un sustrato cromogénico es un compuesto que puede ser escindido por una enzima para dar lugar a la producción de algún tipo de señal detectable que solo aparece cuando el sustrato se escinde de la molécula base. El sustrato cromogénico es incoloro, hasta que reacciona con la enzima, momento en el cual se convierte en un producto intensamente colorado. De este modo, el material de las colonias de bacterias adheridas a la lámina de membrana se convertirá en un material de color azul/púrpura/negro intenso o marrón/rojo mientras que el material de otras colonias permanecerá incoloro. Los ejemplos de moléculas de detección incluyen sustancias fluorescentes, tales como 4-metilumbeliferil fosfato, y sustancias cromogénicas, tales como 4-nitrofenilfosfato, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina y 2,2'-azino-di-[3-etilbenz-tiazoliano sulfonato (6)]. Además de la fosfatasa alcalina y peroxidasa, otras enzimas útiles incluyen  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa,  $\alpha$ -glucosidasa,  $\beta$ -glucosidasa,  $\alpha$ -manosidasa, galactosa oxidasa, glucosa oxidasa y hexocinasa.

La detección de bacterias de interés usando RMN se puede realizar según se indica. En el uso de RMN como una metodología de detección, en el que se entrega una muestra a una bobina detectora centrada en un imán, la diana de interés, tal como una bacteria magnéticamente etiquetada, puede ser suministrada por un medio fluido, tal como un fluido sustancialmente compuesto de agua. En tal caso, la diana magnéticamente etiquetada puede ir desde una región con un campo magnético muy bajo a una región con un campo magnético alto, por ejemplo, un campo producido por aproximadamente 1 a aproximadamente 2 imanes Tesla. De esta manera, la muestra puede atravesar un gradiente magnético, de camino hacia el imán y a la salida del imán. Como puede apreciarse a través de las ecuaciones 1 y 2 a continuación, la diana puede experimentar una fuerza de tracción en el imán en la dirección de flujo de la muestra de camino hacia el imán, y una fuerza en el imán en la dirección opuesta del flujo a la salida del imán. La diana puede experimentar una fuerza de retención atrapando la diana en el imán si el flujo no es suficiente para superar la fuerza del gradiente.



$$m \cdot (\text{del } B) = F \quad \text{Ecuación 1}$$

$$v_t = -F / (6 \cdot \eta \cdot n \cdot r) \quad \text{Ecuación 2}$$

en la que  $\eta$  es la viscosidad,  $r$  es el diámetro de la perla,  $F$  es la fuerza del vector,  $B$  es el campo del vector, y  $m$  es el momento del vector de la perla.

5 Los campos magnéticos en una trayectoria en un imán pueden ser no uniformes en la dirección transversal con respecto al flujo en el imán. Como tal, puede producirse una fuerza transversal que tira de las dianas hacia el lado de un recipiente o de un conducto que proporciona el flujo de la muestra en el imán. Generalmente, el tiempo que tarda una diana en alcanzar la pared de un conducto está asociado con la velocidad terminal y es menor con el aumento de la viscosidad. La velocidad terminal está asociada con la fuerza de resistencia, que puede ser indicativa del flujo de fluencia en ciertos casos. En general, puede resultar ventajoso tener una alta viscosidad para proporcionar una fuerza de resistencia superior tal que una diana tenderá a ser transportada con el flujo de fluido a través del imán sin ser atrapado en el imán o contra de las paredes del conducto.

15 Los fluidos newtonianos tienen una característica de flujo en un conducto, tal como una tubería redonda, por ejemplo, que es parabólica, tal que la velocidad de flujo es cero en la pared, y máxima en el centro, y que tiene una característica parabólica con radio. La velocidad disminuye en una dirección hacia las paredes, y es más fácil atrapar magnéticamente dianas cerca de las paredes, con gradientes de fuerza transversal en la diana hacia la pared del conducto, o en gradientes longitudinales suficientes para evitar el flujo de diana en la tubería en cualquier posición. Con el fin de proporcionar una fuerza de resistencia del fluido favorable para mantener las muestras que son atrapadas en el conducto, puede resultar ventajoso tener una condición de flujo pistón, en el que la velocidad del fluido es sustancialmente uniforme como una función de la posición radial en el conducto.

25 Cuando se emplea la detección de RMN en relación con una muestra de fluido, la detección puede basarse en una perturbación de la señal de agua de RMN causada por una diana magnéticamente etiquetada (Sillerud *et al.*, *JMR (Journal of Magnetic Resonance)*, vol. 181, 2006). En tal caso, la muestra puede ser excitada en el tiempo 0, y después de un cierto retardo, tal como aproximadamente 50 ms o aproximadamente 100 ms, puede ser producida una medición aceptable (basada en una señal de RMN detectada). Alternativamente, dicha medición se puede producir inmediatamente después de la excitación, con la detección continua de una cierta duración, tal como aproximadamente 50 ms o aproximadamente 100 ms. Puede resultar ventajoso detectar la señal de RMN para duraciones de tiempo sustancialmente más largas después de la excitación.

35 A modo de ejemplo, la detección de la señal de RMN puede continuar durante un periodo de aproximadamente 2 segundos con el fin de registrar la información espectral en alta resolución. En el caso de flujo parabólico o newtoniano, la perturbación excitada en el tiempo 0, se extiende normalmente ya que el agua alrededor de la fuente de perturbación viaja a diferente velocidad, dependiendo de la posición radial en el conducto. Además, la información espectral se puede perder debido a los efectos de extensión o mezcla del movimiento diferencial del fluido de muestra durante la detección de la señal. Cuando se lleva a cabo una aplicación de detección de RMN que implica una muestra de fluido que fluye, puede resultar ventajoso proporcionar un flujo de la muestra de tipo pistón para facilitar un contraste de RMN deseable y/o una detección de la señal de RMN deseable.

40 El movimiento diferencial dentro de un fluido newtoniano que fluye puede tener efectos perjudiciales en ciertas situaciones, tales como una situación en la que se desea la detección de RMN espacialmente localizada, como en imágenes de resonancia magnética. En un ejemplo, un objeto magnético, tal como una bacteria magnéticamente etiquetada, se hace fluir a través del detector de RMN y su presencia y ubicación se detectan usando técnicas de IRM. La detección puede ser posible debido al campo magnético del objeto magnético, ya que este campo perturba el campo magnético del fluido en la proximidad del objeto magnético. La detección del objeto magnético se mejora si el líquido cerca del objeto permanece cerca del objeto. En estas condiciones, la perturbación magnética puede permitirse para actuar en cualquier elemento de volumen dado de fluido, y los elementos de volumen del fluido así afectados permanecerán en estrecha proximidad espacial. Dicha perturbación magnética más localizada más fuerte se detectará con más facilidad usando técnicas de RMN o IRM.

55 Si se utiliza un fluido newtoniano para transportar los objetos magnéticos a través del detector, la velocidad de los elementos de volumen de fluido dependerá de la posición radial en el conducto de fluido. En tal caso, el fluido cerca de un objeto magnético no permanecerá cerca del objeto magnético a medida que el objeto fluye a través del detector. El efecto de la perturbación magnética del objeto en el fluido circundante puede extenderse al espacio, y la resistencia de la perturbación en cualquier elemento de volumen de fluido puede reducirse debido a que el elemento no se queda dentro del intervalo de perturbación. La perturbación más débil menos localizada adecuadamente en el fluido de muestra puede ser indetectable usando técnicas de RMN o IRM.

60 Ciertos líquidos, o mezclas de líquidos, exhiben perfiles de flujo no parabólico en conductos circulares. Tales fluidos pueden exhibir perfiles de flujo no newtoniano en otras formas de conducto. El uso de dicho fluido puede mostrar numerosas ventajas puesto que el fluido de detección en una aplicación emplea un dispositivo de detección basado

5 en RMN. Cualquier efecto ventajoso de este tipo puede ser atribuible a la alta viscosidad del fluido, a un perfil de flujo similar a un pistón asociado con el fluido, y/u otra característica o características atribuibles al fluido que facilitan la detección. Como un ejemplo, un fluido con comportamiento pseudoplástico de alta viscosidad puede exhibir un perfil de velocidad de flujo que es esencialmente uniforme a través de las regiones centrales de la sección transversal del conducto. El perfil de velocidad de dicho fluido puede pasar a un valor cero o a un valor muy bajo cerca de las paredes del conducto o en las paredes del conducto, y esta región de transición puede estar confinada en una capa muy fina cerca de la pared.

10 No todos los fluidos, o todas las mezclas de fluidos, son compatibles con la metodología de detección de RMN. En un ejemplo, una mezcla de glicerol y agua puede proporcionar alta viscosidad, pero la medición de RMN se degrada debido a que se detectan señales de RMN distintas a partir de las moléculas de agua y glicerol que componen la mezcla. Esto puede debilitar la sensibilidad del detector de RMN. En otro ejemplo, el componente que no contiene agua de la mezcla de fluido puede seleccionarse por no tener ninguna señal de RMN, lo que puede lograrse mediante el uso de un componente de fluido perdeuterado, por ejemplo, o usando un componente de fluido perfluorado. Este enfoque puede sufrir la pérdida de intensidad de la señal puesto que una porción del fluido en la bobina de detección no produce una señal.

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

25 La mezcla de fluido usada en el detector de RMN puede incluir uno, dos, o más de dos componentes secundarios, además del componente principal de fluido. Los componentes de fluido empleados pueden actuar de manera concertada para producir las características de flujo de fluido deseado, tales como alta viscosidad y/o de flujo pistón. Los componentes de fluido pueden resultar útiles para proporcionar las características del fluido que son ventajosas para el rendimiento del detector de RMN, por ejemplo, proporcionando tiempos de relajación de RMN que permiten un funcionamiento más rápido o intensidades de señal más altas.

30 Un fluido no newtoniano puede proporcionar ventajas adicionales para la detección de objetos por técnicas de RMN o IRM. Como un ejemplo, los objetos que están siendo detectados, pueden tener esencialmente la misma velocidad a medida que avanzan a través de la bobina de detección. Esta velocidad característica puede permitir algoritmos más simples o más robustos para el análisis de los datos de detección. Como otro ejemplo, los objetos que están siendo detectados pueden tener una velocidad fija, conocida y uniforme. Esto puede resultar ventajoso en dispositivos en los que se necesita la posición del objeto detectado en momentos posteriores, tales como en un dispositivo que tiene una cámara de secuestro o cámara de detección secundaria aguas abajo de la bobina de detección de RMN o IRM, por ejemplo.

40 En una realización a modo de ejemplo, se logró con éxito la entrega de la muestra dentro y fuera de un imán cilíndrico 1.7t usando un medio de suministro de fluido que contiene 0,1 % a 0,5 % de goma xantana en agua. Tal entrega es adecuada para proporcionar esencialmente un flujo similar a un pistón, de alta viscosidad, tal como de aproximadamente 10 cP a aproximadamente 3.000 cP, y un buen contraste de RMN en relación con el agua. La goma xantana actúa como un fluido no newtoniano, que tiene características de un fluido no newtoniano que son bien conocidas en la técnica, y no compromete las características de señal de RMN deseables para una buena detección en un modo deseable de funcionamiento.

50 En ciertas realizaciones, los métodos de la invención son útiles para la detección directa de las bacterias de la sangre. Tal proceso se describe en este caso. La muestra se recoge en un tubo de heparina sódica por venopunción, un volumen de muestra aceptable es de aproximadamente 1 ml a 10 ml. La muestra se diluye con tampón de unión y las partículas superparamagnéticas que tienen fracciones de unión específicas de la diana se añaden a la muestra, seguido de incubación en una incubadora con agitación a 37 °C durante aproximadamente 30 min a 120 min. Los métodos de mezcla alternativos también pueden ser usados. En una realización particular, la muestra se bombea a través de un mezclador estático, dicho tampón de reacción y las perlas magnéticas se añaden a la muestra a medida que la muestra se bombea a través del mezclador. Este proceso permite la integración eficaz de todos los componentes en una sola parte fluidica, que evita el movimiento de las partes y los vasos de incubación separados y reduce el tiempo de incubación.

60 La captura de las dianas etiquetadas permite la eliminación de componentes sanguíneos y la reducción de volumen de muestra de 30 ml a 5 ml. La captura se lleva a cabo en una variedad de configuraciones magnéticas/flujo. En ciertas realizaciones, los métodos incluyen la captura en un tubo de muestra en una plataforma de agitación o captura en un dispositivo de flujo continuo a un caudal de 5 ml/min, resultando el tiempo total de la captura en 6 min.

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

El método de detección se basa en un detector de RMN miniatura ajustado con la resonancia magnética de agua. Cuando la muestra es magnéticamente homogénea (sin dianas unidas), la señal de RMN de agua es claramente detectable y fuerte. La presencia de material magnético en la bobina de detector perturba el campo magnético, lo que resulta en la reducción de la señal de agua. Uno de los principales beneficios de este método de detección es que no hay fondo magnético en las muestras biológicas que reducen significativamente los requisitos de rigurosidad del procesamiento de la muestra. Además, puesto que la señal detectada se genera por el agua, se produce una amplificación de la señal incorporada que permite la detección de una sola bacteria etiquetada.

Este método proporciona un aislamiento y una detección de un nivel tan bajo como o incluso inferior a 1 UFC/ml de bacterias en una muestra de sangre.

Los métodos de la invención también pueden combinarse con otros protocolos de separación y aislamiento conocidos en la técnica. En particular, los métodos de la invención pueden ser combinados con métodos mostrados en la solicitud de patente de Estados Unidos número en trámite junto con la presente y co-propiedad con número de serie 12/855.147, presentada el 12 de abril de 2010, titulado *Separating Target Analytes Using Alternating Magnetic Fields*, y que tiene un n.º de expediente del apoderado NANO-002/00US 28864/4.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Muestra

Las muestras sanguíneas procedentes de voluntarios sanos se enriquecieron con concentraciones clínicamente relevantes de bacterias (1-10 UFC/ml) que incluyen cepas de laboratorio y aislados clínicos de las especies bacterianas que se encuentran con mayor frecuencia en las infecciones del torrente sanguíneo.

### Ejemplo 2: Preparación de anticuerpos

Con el fin de generar una IgG policlonal específica de bacterias pan-Gram-positivas, una cabra se inmunizó en primer lugar por administración de antígenos bacterianos suspendidos en ganglios linfáticos de manera intra con adyuvante completo de Freund, seguido de la inyección subcutánea de antígenos bacterianos en un adyuvante incompleto de Freund en intervalos de 2 semanas. Los antígenos se prepararon para la producción de anticuerpos por el crecimiento de bacterias en fase exponencial ( $DO_{600} = 0,4-0,8$ ). Después de la recolección de las bacterias por centrifugación, las bacterias se inactivaron mediante fijación con formalina en formaldehído al 4 % durante 4 h a 37 °C. Después de 3 lavados de bacterias con TFS (15 min de lavado, centrifugación durante 20 min a 4.000 rpm), la concentración de antígenos se midió usando el ensayo BCA y se usó el antígeno a 1 mg/ml para la inmunización. Con el fin de generar IgG específica de bacterias Gram-positivas, varias especies bacterianas se usaron para la inoculación: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*.

El suero inmune se purificó usando cromatografía de afinidad en una columna de proteína G sefarosa (GE Healthcare), y la reactividad se determinó usando ELISA. Los anticuerpos de reacción cruzada con bacterias Gram-negativas y hongos se eliminaron por absorción de IgG purificada con bacterias Gram-negativas fijadas con formalina y hongos. Los organismos fijados con formalina se prepararon de modo similar a como se ha descrito anteriormente y se mezclaron con IgG. Después de la incubación durante 2 h a temperatura ambiente, la preparación se centrifugó para eliminar las bacterias. La preparación del anticuerpo final se aclaró por centrifugación y se usó para la preparación de perlas magnéticas específicas de antígeno.

### Ejemplo 3: Preparación de perlas magnéticas específicas de antígeno

Las perlas superparamagnéticas se sintetizaron mediante la encapsulación de las nanopartículas de óxido de hierro (diámetro de 5-15 nm) en un núcleo de látex y etiquetaron con IgG de cabra. Las nanopartículas que contienen ferrofluido en disolvente orgánico se precipitaron con etanol, las nanopartículas se volvieron a suspender en solución acuosa de estireno y tensioactivo Hitenol BC-10, y se emulsionaron usando sonicación. La mezcla se dejó equilibrar durante la noche con agitación y se filtró a través de filtros de 1,2 y 0,45 µm para lograr un tamaño uniforme de micelas. Estireno, ácido acrílico y divinilbenzeno se añadieron a tampón carbonato con pH 9,6. La polimerización se inició en una mezcla a 70 °C con la adición de  $K_2S_2O_8$  y la reacción se dejó completar durante la noche. Las partículas sintetizadas se lavaron 3 veces con 0,1 % de SDS usando una captura magnética, se filtraron a través de filtros de 1,2, 0,8, y 0,45 µm y se usaron para la conjugación de anticuerpos.

La producción de las perlas resultó en una distribución de tamaños que se pueden caracterizar por un tamaño medio y una desviación estándar. En el caso de etiquetado y de extracción de las bacterias de la sangre, se descubrió que el tamaño medio para un rendimiento óptimo se comprende entre 100 y 350 nm, por ejemplo entre 200 nm a 250 nm.

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

Ejemplo 4: Etiquetado de células raras usando un exceso de nanopartículas magnéticas

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

10 Ejemplo 5: Captura magnética de bacterias unidas

15 La sangre que incluye las bacterias diana magnéticamente etiquetadas y el exceso de perlas libres se inyectaron en una celda de captura de flujo continuo con una serie de fuertes imanes de barra de tierras raras colocados de manera perpendicular al flujo de la muestra. Con el uso de una cámara de flujo con la trayectoria de flujo de sección transversal de 0,5 mm x 20 mm (alto x ancho) y 7 imanes de barra de NdFeB, se alcanzó un caudal tan alto como 5 ml/min. Después de hacer fluir la mezcla a través del canal en presencia del imán, una solución de lavado que incluye heparina se hizo fluir a través del canal. Las dianas unidas se lavaron una sola vez con tampón que contiene heparina para eliminar los componentes sanguíneos y para reducir la formación de agregados de partículas magnéticas. Con el fin de lavar eficazmente las dianas unidas, el imán se retiró y el material magnético capturado se volvió a suspender en tampón de lavado, seguido por la reaplicación del campo magnético y la captura del material magnético en la misma celda de captura de flujo continuo.

20 La eliminación de las dianas etiquetadas capturadas fue posible después de mover los imanes lejos de la cámara de captura y de eluirse con flujo de solución tampón.

25

## REIVINDICACIONES

1. Un método de aislamiento de un analito diana a partir de una muestra de fluido corporal, comprendiendo el método las etapas que consiste en:
- 5           mezclar, en un recipiente, una muestra de fluido corporal y un tampón que impide esencialmente la lisis de las células sanguíneas y reduce la unión no específica a partículas magnéticas, para así formar una muestra de fluido corporal diluido, en el que el tampón comprende clorhidrato de Tris(hidroximetil)-aminometano en una concentración de 75 mM, aproximadamente NaCl 300 mM, y aproximadamente Tween 20 al 0,1 %;
- 10          introducir partículas magnéticas que comprenden una fracción de unión específica de una diana a la muestra de fluido corporal diluido en el recipiente con el fin de crear una mezcla, en la que las partículas magnéticas tienen un diámetro medio comprendido entre 200 a 250 nm;
- 15          incubar dicha mezcla en el recipiente para permitir que dichas partículas se unan a una diana para formar complejos diana/partícula magnética antes de la introducción de la mezcla en un canal, teniendo el canal una superficie sobre la que se capturan los complejos diana/partícula magnética y estando situado dentro de un dispositivo fluídico;
- 20          hacer fluir la mezcla a través del canal;
- aplicar un campo magnético para capturar los complejos diana/partícula magnética en la superficie;
- lavar con una solución de lavado que reduce la agregación de partículas;
- 25          eliminar el campo magnético;
- reintroducir la solución de lavado, volviendo a suspender de este modo los complejos diana/partícula magnética;
- y
- hacer fluir los complejos diana/partícula magnética que se vuelven a suspender sobre la superficie en presencia de un campo magnético reaplicado, capturando de este modo los complejos diana/partícula magnética.
2. El método según la reivindicación 1, en el que dicha fracción de unión específica a una diana es un anticuerpo, y, opcionalmente el anticuerpo es específico para bacterias u hongos.
3. El método según la reivindicación 1, en el que dichas partículas son perlas superparamagnéticas.
4. El método según la reivindicación 1, en el que dicho fluido corporal se selecciona entre sangre, esputo, orina, saliva, sudor y líquido cefalorraquídeo.
5. El método según la reivindicación 3, en el que dichas partículas magnéticas comprenden al menos 70 % de perlas superparamagnéticas en peso.
6. El método según la reivindicación 2, en el que las bacterias son bacterias gram positivas o bacterias gram negativas.
7. El método según la reivindicación 2, en el que dichas bacterias se seleccionan entre *E. coli*, *Listeria*, *Clostridium*, *Mycobacterium*, *Shigella*, *Borrelia*, *Campylobacter*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Pneumococcus*, *Streptococcus* y una combinación de las mismas.
8. El método según la reivindicación 1, en el que la partícula magnética es una partícula magnética que contiene hierro y la partícula comprende opcionalmente óxido de hierro o platino de hierro.
9. El método según la reivindicación 1, que comprende además la lisis de las bacterias capturadas y la extracción de ADN para su posterior análisis por PCR, una hibridación de micromatrices o una secuenciación.