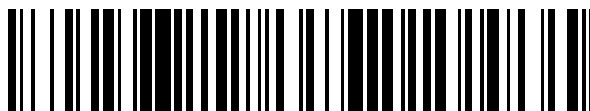


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 369**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

**G01N 33/72** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2015 PCT/EP2015/075144**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2016 WO16066754**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2015 E 15786987 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 3213077**

54 Título: **Detección de malaria**

30 Prioridad:  
**29.10.2014 GB 201419230**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.05.2020**

73 Titular/es:  
**MAGNETRAP (100.0%)  
Chaussée de Binche, 101  
7000 Mons, BE**

72 Inventor/es:  
**DUEZ, PIERRE;  
ROCH, ALAIN;  
BLANKERT, BERTRAND;  
OKUSA, PHILIPPE y  
AVAERT, RICHARD**

74 Agente/Representante:  
**RIZZO , Sergio**

ES 2 763 369 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

Detección de malaria

**[0001]** La presente invención se refiere a dispositivos y métodos para la detección en una muestra de un material diana que presenta propiedades magnéticas, especialmente para la detección de hemozoína en sangre entera o tejidos como una indicación de infección palúdica.

**[0002]** Resulta fundamental realizar un diagnóstico temprano y preciso de la malaria para la gestión efectiva de la enfermedad y la vigilancia de la malaria. La falta de métodos de diagnóstico sencillos, asequibles y precisos ha derivado en la prudente afirmación común de que «la fiebre equivale a malaria a no ser que se demuestre lo contrario». Esto da como resultado un sobrediagnóstico de la malaria, una mala gestión de las fiebres no palúdicas, un desperdicio de recursos limitados y contribuye a crear resistencia a los fármacos.

**[0003]** Una detección y cuantificación precisas de la infección palúdica mediante examen microscópico de frotis de sangre grueso y fino depende mucho de la aptitud y la formación del operario; también requiere un equipo y condiciones de trabajo que no están siempre disponibles, sobre todo en entornos rurales. Las pruebas de diagnóstico rápido (RDT, por sus siglas en inglés) basadas en reacciones antígeno-anticuerpo requieren menor formación y equipo, aunque por lo general resultan caras y carecen de la suficiente sensibilidad para la detección de malaria de nivel bajo. Otros sistemas de detección propuestos no han resultado ser adecuados en la práctica para su uso generalizado en condiciones de campo. Por ejemplo, el documento US 2012/0257199 A1 expone la adsorción de  $\beta$ -hematina en la superficie de nanopartículas magnéticas en suspensión en una muestra y el uso del enriquecimiento de campo magnético en la muestra para incrementar la señal obtenida en la espectroscopia Raman, mientras que el documento WO 2008/056171 A2 expone el uso de una señal de absorción diferencial a p y luz polarizada s de  $\beta$ -hematina en sangre sometida a un campo magnético de intensidades variables.

**[0004]** Por consiguiente, todavía resultan necesarios métodos y dispositivos mejorados para detectar la presencia de infección palúdica.

**[0005]** Según un aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar un material diana en una forma que presenta propiedades magnéticas en una muestra según se define en la reivindicación 1, comprendiendo el método:

- la separación magnética de la forma magnética del material diana de la muestra en una primera fase de separación en la que el material diana se separa magnéticamente de la muestra haciendo pasar la muestra a través de un separador magnético y conservando la forma magnética del material diana en el separador;
- la disolución de la forma magnética separada del material diana para proporcionar una solución analizable que comprende el material diana en una segunda fase de análisis en la que el material diana se extrae del separador magnético mediante disolución y elución en una solución para proporcionar la solución analizable;
- análisis espectroscópico de la solución analizable, en un analizador espectroscópico que presenta una entrada de muestra en conexión fluida con una salida de muestra del separador magnético, para detectar el material diana.

**[0006]** Otros aspectos se definen en otras reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes definen formas de realización preferidas o alternativas.

**[0007]** El material diana en una forma que presenta propiedades magnéticas puede ser un material orgánico magnético; puede ser hemozoína o  $\beta$ -hematina.

**[0008]** La hemozoína es un subproducto formado a partir de la digestión de sangre por medio de algunos parásitos que se alimentan de sangre. Estos organismos hematófagos, como los parásitos de la malaria, digieren la hemoglobina y liberan altas cantidades de hemo libre, que es el componente no proteico de hemoglobina. Un hemo es un grupo prostético que consiste en un átomo de hierro contenido en el centro de un anillo de porfirina heterocíclico. El hemo libre es tóxico para las células, así que los parásitos lo convierten en una forma cristalina insoluble denominada hemozoína. En consecuencia, en determinadas etapas del ciclo de parásitos, existe una correlación entre la concentración de hemozoína en sangre y el nivel de parasitemia, una cuantificación precisa y sensible de hemozoína en una muestra de sangre permite la detección de malaria a niveles bajos o en etapas tempranas de la infección.

**[0009]** La  $\beta$ -hematina es un material sintético análogo a la hemozoína. La  $\beta$ -hematina muestra propiedades similares a la hemozoína, incluyendo propiedades espectroscópicas y magnéticas, y se puede utilizar para simular el comportamiento de la hemozoína.

**[0010]** El método se puede utilizar para detectar o cuantificar, y/o es capaz de detectar o cuantificar, una concentración de hemozoína o  $\beta$ -hematina en la muestra que es  $\leq 0,12 \mu\text{g/ml}$ , preferiblemente  $\leq 0,10 \mu\text{g/ml}$ , más preferiblemente  $\leq 0,08 \mu\text{g/ml}$  e incluso más preferiblemente  $\leq 0,06 \mu\text{g/ml}$  o  $\leq 0,05 \mu\text{g/ml}$  y/o que está entre una de estas concentraciones y una concentración de  $2 \mu\text{g/ml}$  o  $2,5 \mu\text{g/ml}$ . La detección de una concentración de hemozoína de  $0,12 \mu\text{g/ml}$  permite una detección de parasitemia de 200 parásitos por  $\mu\text{l}$  (conforme a las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud), mientras que la detección de una concentración de

hemozoína de 0,05 µg/ml permite una detección de parasitemia de 80 parásitos por µl. Estos niveles de sensibilidad, especialmente los niveles inferiores, permiten una detección temprana de la malaria, facilitando considerablemente el tratamiento del paciente.

5 **[0011]** El volumen de la muestra utilizada para el análisis puede ser  $\leq 1$  ml, preferiblemente  $\leq 750$  µl, más preferiblemente  $\leq 500$  µl e incluso más preferiblemente  $\leq 300$  µl. Por lo tanto, solo es necesario obtener una muestra muy pequeña de sangre de una persona para analizarla. En concreto, en un sistema de microflujo, el volumen de la muestra utilizada para el análisis puede ser de entre 10 µl y 50 µl. La muestra para el análisis se puede recoger mediante venopunción o punción digital. El volumen de sangre recogida a partir de una punción de sangre puede ser suficiente para el análisis.

10 **[0012]** La duración del análisis de la muestra (por ejemplo, desde la inyección de la muestra a la recepción de datos finales) puede ser de no más de 10 minutos, preferiblemente no más de 8 minutos; más preferiblemente no más de 6 minutos o no más de 5 minutos. Esto proporciona un resultado significativamente más rápido que con microscopía.

15 **[0013]** La muestra puede comprender una solución y/o suspensión acuosa o con disolvente orgánico. La muestra puede comprender una matriz biológica o una solución y/o suspensión acuosa o con disolvente orgánico derivada de una matriz biológica. La matriz biológica puede comprender fluidos, células, tejidos, extractos, lisados, células, sobrenadantes y/o lisados de cultivo procariota o eucariota, muestras de diálisis, muestras de microdiálisis. La muestra puede comprender tejidos o fluidos corporales humanos y animales, por ejemplo, sangre entera, sangre entera lisada, suero, plasma, orina, esperma, suspensiones o lisados de eritrocitos y/o leucocitos, tejidos disociados y/o lisados, muestras para biopsia, pelos, uñas.

20

**[0014]** Durante la maduración de la malaria, cuando existe una alta concentración de esquizontes en glóbulos rojos, existe una lisis natural de las células y la hemozoína se libera en la sangre al mismo tiempo que los esquizontes infectan nuevos glóbulos rojos. Una ventaja de utilizar una muestra que comprende sangre entera (o sangre entera lisada) en lugar de glóbulos rojos separados o purificados es que este hecho permite que se analice la hemozoína total presente, incluyendo (i) la hemozoína que todavía está presente en los glóbulos rojos; (ii) la hemozoína que se ha liberado previamente desde los glóbulos rojos; y (iii) la hemozoína que se ha incorporado, normalmente a niveles altos, en macrófagos, monocitos y leucocitos.

25

**[0015]** La muestra comprende preferiblemente sangre entera lisada. Cualquier solución de lisis utilizada presenta preferiblemente un pH neutro o ligeramente ácido; este hecho evita la disolución de hemozoína o  $\beta$ -hematina en la muestra de sangre entera. Por ejemplo, una muestra de sangre entera se puede lisar con una solución tamponada de Tris (pH 7), Tritón-X 100 y saponina. La solución de lisis se puede preparar siguiendo el método descrito en «Simple and Inexpensive Fluorescence-Based Technique for High-Throughput Antimalarial Drug Screening» (M. Smikstein *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, vol. 48, p. 1803). Otras posibles soluciones de lisis incluyen tampones hipotónicos de pH variable, preferiblemente ácido o neutro. Se puede añadir DNasa en muestras (normalmente 10 - 100 µg/ml) junto con RNasa (10 - 100 µg/ml) para reducir la viscosidad debido a la liberación de material de ácido nucleico. Se pueden añadir inhibidores de nucleasa y/o proteasa en todas las muestras que se someten a lisis. Los posibles métodos de lisis incluyen: rotura mecánica, posiblemente utilizando perlas de vidrio, homogeneización líquida, congelación-descongelación, mortero y mano; todos los métodos se pueden aplicar con o sin sonicación. Preferiblemente, la muestra comprende sangre entera que se ha lisado utilizando una solución de lisis, es decir, se ha lisado químicamente, y que no se ha lisado de manera mecánica; este hecho simplifica la preparación de la muestra.

30

35

40

**[0016]** Antes de la separación magnética del material diana de la muestra, la muestra se puede purificar. Dicha purificación puede incluir cromatografía o electroforesis de filtrado, centrifugación, precipitación, de fase directa, de fase inversa, iónica, hidrofílica, de afinidad, de permeación en gel o de exclusión por tamaño, pudiéndose combinar todas ellas con la extracción de fase líquida-líquida o de fase sólida. No obstante, preferiblemente, no se necesita ni se lleva a cabo dicha purificación.

45

**[0017]** La muestra que se va a analizar se puede introducir en un fluido portador que puede comprender agua, una solución orgánica, una solución acuosa, por ejemplo, una solución acuosa de cloruro de sodio (NaCl), especialmente que presente una concentración mayor o igual a aproximadamente 0,3 %, 0,6 % o 0,9 %. Preferiblemente, el fluido portador es agua, especialmente agua purificada. Esto simplifica el proceso.

50

**[0018]** Tras la separación magnética, el material diana puede ser recogido para su análisis mediante un fluido de recogida. El fluido de recogida comprende preferiblemente un componente en el que el material diana separado se disuelve para proporcionar una solución analizable. El material diana disuelto se encuentra preferiblemente en una forma no magnetizada, es decir, la disolución da como resultado la pérdida de las propiedades magnéticas. El fluido de recogida puede comprender una solución acuosa que comprende un agente alcalinizante, como hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio, hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, hidróxidos de amonio cuaternario orgánico, amoniaco, aminas orgánicas. Un fluido de recogida preferido es la solución de hidróxido de sodio. El fluido de recogida puede presentar una concentración que sea mayor o igual a 0,1 M y/o menor o igual a 1 M; por ejemplo, se puede utilizar una solución de NaOH 0,4 M. Dichas soluciones están fácilmente disponibles, precisan solo que se realicen con la precaución habitual en el laboratorio para su uso y presentan concentraciones que

55

60

evitan el riesgo de crear precipitaciones de sales que puedan bloquear el aparato, especialmente partes del aparato que presenten secciones transversales pequeñas, por ejemplo, cualquier válvula de conmutación.

**[0019]** El fluido portador y/o de recogida puede comprender uno o varios aditivos, por ejemplo:

- 5 – antioxidantes, por ejemplo, tocoferoles, tocotrienoles, ácidos o sales ascórbicas o eritórbicas, antioxidantes sintéticos, incluyendo butilhidroxitolueno y butilhidroxianisol, o componentes fenólicos naturales, incluyendo flavanonas, flavonoles, monofenoles (timol, carvacrol, eugenol...) de aceites esenciales, ácido cafeico y ferúlico, flavonoides y procianidinas en uva y vino tinto, ácidos diterpénicos en romero, hidroxitirosol en aceite de oliva, productos de degradación de lignina y lignanos, reductonas que pueden estar adaptadas para reducir la corrosión de partes internas del dispositivo, especialmente microesferas de metal cuando se utilicen; se puede(n) añadir ácido cítrico, ácido fosfórico o ácido fumárico o quelantes metálicos para potenciar el efecto antioxidante;
- 10 – tensioactivos, por ejemplo, tensioactivos no iónicos combinados o no combinados (cetomacrogol 1000, alcohol cetosteárico, alcohol cetílico, cocamida DEA, cocamida MEA, igepal ca-630, isoceteth-20, lauril glucósido, monolaurina, etoxilato de rango estrecho, nonidet p-40, nonoxinol-9, nonoxinoles, np-40, octaetilenglicol monododecil éter, n-octil-beta-d-tioglucopiranosido, octilglucósido, alcohol oleico, pentaetilenglicol monododecil éter, poloxámero, poloxámero 407, polirricinoleato de poliglicerol, polisorbato, polisorbato 20, polisorbato 80, saponinas, monoestearato de sorbitano, triestearato de sorbitano, alcohol estearílico, Tritón-X 100), tensioactivos catiónicos (cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, bronidox, bromuro de cetrimonio, cloruro de cetrimonio, cloruro de dimetildioctadecil amonio, cloruro de lauril metil gluceth-10 hidroxipropildimonio, hidróxido de tetrametilamonio) y/o tensioactivos aniónicos (lauril sulfato de amonio, dioctil sulfosuccinato de sodio, ensayo MBAS, ácido perfluorobutanosulfónico, ácido perfluorononanoico, ácido perfluorooctanosulfónico, ácido perfluorooctanoico, lauril sulfato de potasio, saponinas, jabón, sustituto de jabón, dodecilsulfato de sodio, dodecylbenceno sulfonato de sodio, laureth sulfato de sodio, lauroil sarcosinato de sodio, mireth sulfato de sodio, pareth sulfato de sodio, estearato de sodio), especialmente tensioactivos adaptados para facilitar el enjuague de partes internas del dispositivo con el fin de reducir la contaminación que pudiera derivar con el tiempo en señales de análisis de parásitos;
- 15 – copigmentos, por ejemplo, flavonoides, antocianinas, antocianósidos y/o derivados cinámicos, especialmente sustancias químicas que deriven en una mejora de la detectabilidad de la hemozoina mediante asociación molecular;
- 20 – agentes antimicrobianos, por ejemplo, azidas, derivados de ácido benzoico, incluyendo hidroxilos, éteres, ésteres y/o sales, ácido sórbico, ácido acético, derivados azufrados, incluyendo sulfuros y sulfitos, derivados de nitrógeno, incluyendo nitritos y nitratos, sulfamidas, antibióticos, tiabendazol, especialmente agentes antimicrobianos capaces de impedir de manera adecuada el crecimiento de microorganismos en las soluciones;
- 25 – agentes viscosantes, espesantes o gelificantes, por ejemplo, goma arábica y derivados, monoglicéridos acetilados, ésteres de ácido tartárico acetilado de mono y diglicéridos, agar, algina, ácido alginico, alginato de amonio, carragenano de amonio, furcelerano de amonio, sal de amonio de glicéridos fosforilados, arabinogalactano, glicano de levadura de panadería, alginato de calcio, carragenano de calcio, carboximetilcelulosa, goma de algarrobo, carragenano, goma de celulosa, gelatina, goma gellan, goma guar, goma arábica, lecitina hidroxilada, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, gelosa de musgo irlandés, goma karaya, monoglicéridos y diglicéridos lactilados, ésteres lactílicos de ácidos grasos, lecitina, goma garrofin, metilcelulosa, metiletilcelulosa, goma de avena, pectina, ésteres de poliglicerol de ácidos grasos, ésteres de poliglicerol de ácidos grasos de aceite de ricino interesterificados, monooleato de sorbitano polioxietileno (20) (polisorbato 80), monoestearato de sorbitano polioxietileno (20) (polisorbato 60), triestearato de sorbitano polioxietileno (20) (polisorbato 65), estearato de polioxietileno (8), alginato de potasio, carragenano de potasio, alginato de propilenglicol, éter de propilenglicol de metilcelulosa, monoésteres de propilenglicol de ácidos grasos, alginato de sodio, fosfato de sodio y aluminio, carboximetilcelulosa de sodio, carragenano de sodio, glicolato de celulosa sódica, estearoil-2-lactilato de sodio, estearato de sodio, tartrato de sodio, tripolifosfato de sodio, monoestearato de sorbitano, trioleato de sorbitano, triestearato de sorbitano, citrato monoglicérido de estearilo, ésteres de sacarosa de ácidos grasos, goma tragacanto, goma xantana, especialmente sustancias químicas que deriven en una mayor viscosidad de las soluciones.

**[0020]** La separación magnética del material diana de la muestra puede comprender la separación en una columna de separación magnética, especialmente una columna de separación magnética que contenga partículas magnéticas o magnetizables, especialmente microesferas, como microesferas que contengan acero o hierro. Las microesferas pueden presentar un diámetro que sea  $\geq 0,3$  mm o  $\geq 0,1$  mm y/o que sea  $\leq 1$  mm o  $\leq 2$  mm. Dichos tamaños de partículas evitan que sea necesario mantener de manera adecuada las redes o filtros para retener las partículas en la columna, lo cual supondría un riesgo de bloqueo, especialmente cuando la muestra comprende una suspensión.

**[0021]** La columna magnética se puede desarmar y volver a armar fácilmente, por ejemplo, para facilitar la sustitución de sus partículas magnetizables. Las partículas magnetizables se pueden sustituir periódicamente para mantener la eficiencia y/o la precisión del dispositivo, por ejemplo, en caso de corrosión y/o acumulación de

depósitos y/o sustancias contaminantes. El número de análisis llevados a cabo antes de sustituir las partículas magnetizables puede ser  $\geq 10$  o  $\geq 15$ ; puede ser  $\leq 1000$ .

**[0022]** La columna magnética puede presentar un diámetro interno que sea  $\geq 0,5$  mm o  $\geq 1$  mm y/o que sea  $\leq 15$  mm o  $\leq 10$  mm. La longitud de la columna puede ser  $\geq 5$  mm o  $\geq 1$  cm y/o  $\leq 12$  cm o  $\leq 10$  cm. La columna está hecha preferiblemente de un material no magnético, por ejemplo, un material de plástico, como polipropileno.

**[0023]** Se puede aplicar un campo magnético externo en la columna de separación magnética, por ejemplo, mediante uno o varios imanes permanentes. La magnitud de un campo magnético en la columna de separación puede ser  $\geq 0,2$  T o  $\geq 1$  T; puede ser  $\leq 8$  T o  $\leq 10$  T.

**[0024]** El sistema se puede configurar como un sistema de microflujo. En consecuencia, el tamaño de la columna magnética, las microesferas, el campo magnético y la muestra que se va analizar se pueden adaptar para un sistema de microflujo. Especialmente en este caso, las partículas magnéticas pueden ser nanopartículas o nanoesferas. Las partículas magnéticas pueden ser microesferas según se han descrito anteriormente o, preferiblemente, microesferas con diámetro menor. En ese caso, las microesferas pueden presentar un diámetro que sea  $\geq 50$   $\mu\text{m}$  o  $\geq 100$   $\mu\text{m}$  y/o que sea  $500$   $\mu\text{m}$  o  $\leq 400$   $\mu\text{m}$  o  $\leq 300$   $\mu\text{m}$ . La columna magnética puede presentar la forma de un depósito de microesferas, por ejemplo, proporcionado como parte de una celda de flujo integrada. La celda de flujo integrada puede comprender un depósito de microesferas en conexión fluida con una ventana óptica.

La celda de flujo integrada puede ser de un tamaño similar a un portaobjetos de microscopio convencional. Puede presentar dimensiones de: longitud  $\geq 30$  mm o  $\geq 45$  mm o  $\geq 60$  mm o  $\geq 70$  mm y/o  $\leq 150$  mm o  $\leq 120$  mm o  $\leq 90$  mm; y/o anchura  $\geq 15$  mm o  $\geq 20$  mm y/o  $\leq 60$  mm o  $\leq 45$  mm o  $\leq 30$  mm; y/o grosor  $\geq 1$  mm o  $\geq 2$  mm o  $\geq 4$  mm y/o  $\leq 15$  mm o  $\leq 12$  mm o  $\leq 10$  mm o  $\leq 8$  mm. Las rutas o canales de conexión entre elementos de la celda de flujo integrada pueden poseer un diámetro que sea  $\geq 20$   $\mu\text{m}$  o  $\geq 50$   $\mu\text{m}$  y/o que sea  $\leq 200$   $\mu\text{m}$  o  $\leq 150$   $\mu\text{m}$ . La celda de flujo integrada puede ser considerablemente plana; puede proporcionar un dispositivo para un único uso o un dispositivo para múltiples usos, por ejemplo, adaptado para analizar al menos aproximadamente 10 muestras y/o hasta aproximadamente 50 muestras. La celda de flujo puede estar hecha de un polímero, por ejemplo, PMMA (poli(metilmetakrilato)) o PDMS (polidimetilsiloxano). La celda de flujo integrada puede comprender: una primera porción, por ejemplo, una base, en la que se proporciona un circuito de flujo, por ejemplo, como un circuito abierto en una cara, por ejemplo, mecanizado, grabado o moldeado en una superficie; y una segunda porción, por ejemplo, una cubierta, que complementa a la base, por ejemplo, superpuesta en la base, por ejemplo, para sellar una cara abierta del circuito proporcionado en la primera porción. Se puede llenar un depósito de microesferas del circuito de flujo con partículas magnetizables, por ejemplo, partículas o nanopartículas de acero, antes de ensamblar la celda de flujo situando y sellando la segunda porción sobre la primera porción. La celda de flujo se puede desmontar y volver a montarse posteriormente, por ejemplo, retirando la cubierta, para sustituir las micropartículas magnetizables.

**[0025]** El análisis espectroscópico de la solución analizable para detectar el material diana disuelto puede comprender análisis óptico; puede comprender espectroscopia de absorción. La radiación emitida desde una fuente puede pasar a través de la solución analizable para dar una señal atenuada que sea recibida por un sensor. La fuente y el sensor se eligen para abarcar longitudes de onda en las que se pueda detectar la presencia y, preferiblemente, la cantidad del material diana.

**[0026]** Preferiblemente, se utiliza luz casi monocromática para el análisis espectroscópico, es decir, luz que presenta un ancho de banda estrecho, por ejemplo, que presenta al menos un 80 % de su energía en un ancho de banda de 80 nm, 50 nm, 20 nm o 10 nm. Se puede utilizar un sensor y/o una fuente de luz casi monocromática. En una forma de realización preferida, se utiliza un diodo casi monocromático que emite en una longitud de onda de aproximadamente 380 nm, aproximadamente 405 nm o aproximadamente 620 nm. De manera alternativa, se puede utilizar luz monocromática. El espectro de absorción de hemozoína muestra varios picos (figura 1). La hemozoína absorbe intensamente la radiación con longitudes de onda comprendidas en el rango de 330 nm a 410 nm y, en menor medida, con longitudes de onda comprendidas en el rango de 600 nm a 640 nm. La primera banda resulta interesante debido a su sensibilidad, y la segunda debido a su especificidad. Por consiguiente, el uso de una correspondiente fuente de luz casi monocromática permite el uso de disposiciones y aparatos resistentes y simplificados que, a pesar de ello, proporcionan una buena sensibilidad o selectividad. Por ejemplo, el diodo emisor puede ser un diodo de bajo consumo; se puede situar adyacente al flujo del fluido analizable sin que sea necesaria la transmisión de fibras ópticas. Se puede lograr una ventaja concreta mediante la detección de hemozoína aproximadamente a 380 nm, aproximadamente a 405 nm o aproximadamente a 620 nm utilizando una muestra de sangre entera lisada; esta combinación se puede utilizar para detectar con sensibilidad la hemozoína y/o para evitar que las señales no deseadas o parásitas de la muestra interfieran o enmascaren la señal que indica hemozoína. El sensor de luz puede ser un fotosensor que permite la detección en la longitud de onda seleccionada. En consecuencia, la(s) longitud(es) de onda del análisis espectroscópico para detectar el material diana puede comprender:

longitudes de onda que sean  $\geq 300$  nm o  $\geq 320$  nm o  $\geq 340$  nm o  $\geq 350$  nm o  $\geq 360$  nm y/o que sean  $\leq 440$  nm o  $\leq 430$  nm o  $\leq 420$  nm o  $\leq 410$  nm; o bien

longitudes de onda que sean  $\geq 580$  nm o  $\geq 590$  nm o  $\geq 600$  nm y/o que sean  $\leq 650$  nm o  $\leq 640$  nm o  $\leq 630$  nm.

Se puede utilizar un emisor monocromático o casi monocromático centrado en una longitud de onda comprendida en las anteriores.

5 **[0027]** Se elige que la trayectoria de la radiación utilizada en el análisis espectroscópico a través de la solución analizable sea preferiblemente  $\geq 3$  mm,  $\geq 20$  mm,  $\geq 30$  mm o  $\geq 40$  mm; esto ayuda a mejorar la sensibilidad de la detección. La radiación puede pasar a lo largo de una porción de la trayectoria de flujo de la solución analizable, por ejemplo, al disponer una porción en «Z» en la trayectoria de flujo y que pasa la radiación a través de la porción más larga de la «Z».

**[0028]** El método puede comprender:

- 10 – una primera fase de separación en la que el material diana se separa magnéticamente de la muestra, por ejemplo, haciendo pasar la muestra a través de un separador magnético y conservando la forma magnética del material diana en el separador; y/o
- una segunda fase de análisis en la que el material diana se retira del separador magnético, por ejemplo, mediante disolución y elución en una solución, para proporcionar una solución analizable; y/o
- 15 – una tercera fase de enjuague, en la que el separador magnético se enjuaga para prepararse para su uso posterior.

**[0029]** Preferiblemente, el análisis espectroscópico se lleva a cabo en una solución de análisis que comprende el material diana en solución.

20 **[0030]** La muestra que se va a analizar se puede introducir en la trayectoria de flujo de un fluido portador, por ejemplo, mediante inyección, especialmente a través de una entrada, por ejemplo, a través de un tabique o válvula de inyección. Esto facilita la introducción de la muestra en el dispositivo sin que sea necesaria la interrupción de su funcionamiento y sin que se desmonte.

**[0031]** A continuación se describirá una forma de realización de la invención, únicamente a modo de ejemplo, con referencia al dibujo adjunto, en el cual:

- 25 La figura 1 es un espectro de absorción de hemozoina visible en UV
- La figura 2 es una forma de realización esquemática representativa de un dispositivo analítico;
- La figura 3 es un cromatograma obtenido mediante el programa Pclab2000 de una muestra de sangre entera lisada que contiene  $\beta$ -hematina; y
- La figura 4 es un cromatograma obtenido mediante el programa Pclab2000 de una muestra de sangre entera lisada contaminada con malaria.
- 30 La figura 5 es una vista de planta esquemática de un sistema microfluídico en forma de una celda de flujo integrada.

**[0032]** El dispositivo analítico de la figura 2 comprende:

- 35 1 y 2: doble bomba de jeringa de KR Analytica provista de una primera jeringa 1 que contiene agua utilizada como fluido portador y una segunda jeringa 2 que contiene una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0,4 M utilizada como fluido de recogida, disolución y elución, estando configurada la bomba de jeringa para crear, a partir de cada una de las jeringas, un flujo constante de 0,5 mL min;
- 3: tubo conector entre la jeringa 1 y una válvula de conmutación;
- 4: tubo conector entre la jeringa 2 y la válvula de conmutación;
- 5: tabique de entrada para inyectar la muestra;
- 40 6: válvula de conmutación de Rheodyne TitanMX;
- 7: tubo conector de la válvula de conmutación hasta su desecho;
- 8: tubo conector entre la válvula de conmutación y la columna;
- 9: columna de separación magnética que comprende una columna de polipropileno que presenta una longitud de aproximadamente 60 mm y un diámetro interno de aproximadamente 4 mm que contiene aproximadamente
- 45 4 g de microesferas de acero que presentan un diámetro de aproximadamente 0,5 mm);
- 10: imanes permanentes (imanes MidiMACS de Miltenyi Biotec) que generan un campo magnético que presenta una magnitud de aproximadamente 0,65 T;
- 11: tubo conector entre la columna y la celda de flujo;
- 12: diodo emisor de luz casi monocromática (405 nm) utilizada como fuente de luz;
- 50 13: celda de flujo («celda SMA-Z» de Ocean Optics, incluyendo ventanas de sílice UV-Vis para longitudes de onda superiores a 210 nm);

14: tubo conector de la celda de flujo hasta su desecho;

15: sensor de luz;

16: amplificador de señal y voltímetro

5 **[0033]** La síntesis de  $\beta$ -hematina se llevó a cabo según un método adaptado descrito en el documento «An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment» (AFG Slater *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88, pp. 325-329). Se preparó una solución madre de 45,4 mM de hematina disolviendo 0,592 g de hemina porcina con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0,4 N para obtener 20 ml de solución de dicha solución. Se diluyeron 10 ml de la solución madre con 90 ml de agua para obtener 100 ml de una solución de hematina 4,54 mM, se añadió entonces ácido propiónico al 2 % para obtener un medio de reacción con un pH de 4. En un  
10 recipiente cerrado, se dejó que la mezcla reaccionara a 70 °C en un baño termostatzado durante 18 h antes de filtrarse. El residuo de filtración se recogió y se secó en un horno a 37 °C durante 24 h. Los cristales de  $\beta$ -hematina se mantienen entonces en la nevera a 4 °C.

15 **[0034]** Con el fin de simular la detección de malaria (cristales de hemozoína) en una muestra de sangre entera humana, se puede elaborar una muestra que se va analizar como suspensión de  $\beta$ -hematina en una muestra de sangre entera no contaminada. Antes de su análisis, la muestra de sangre entera se lisó con una solución tamponada con Tris (pH 7), Tritón X-100 y saponina. La solución de lisis se preparó siguiendo un protocolo adaptado a partir de un método descrito en «Simple and Inexpensive Fluorescence-Based Technique for High-Throughput Antimalarial Drug Screening» (M. Smikstein *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother., 2004, vol. 48, p. 1803). En primer lugar, se preparó una solución de 100 ml tamponada con Tris. Tras disolver 12,11 g de  
20 Tris(hidroximetil)aminometano en 60 ml de agua y añadir HCl (ácido clorhídrico) para obtener una solución con un pH de 7, se añadió posteriormente agua para obtener 100 ml de la solución tamponada con Tris. Se obtuvieron 100 ml de la solución de lisis añadiendo el volumen necesario de solución tamponada con Tris a 10 mg de saponina y 1 ml de Tritón X-100. Esta solución de lisis se mantuvo en la nevera a 4 °C y se utilizó en un plazo de 7 días. El lisado de la muestra de sangre entera se realizó mediante una dilución 1/2 con la solución de lisis y un tiempo de  
25 reacción de 30 minutos.

**[0035]** Al principio de una primera fase de separación, el dispositivo se estabilizó con la válvula de conmutación (6) configurada de manera que el fluido portador de la jeringa (1) se dirija a la trayectoria de flujo a través de la columna magnética (9) y el fluido de recogida de la jeringa (2) se envíe desde la válvula de conmutación (6) hasta su desecho.

30 **[0036]** Se inyectaron 300  $\mu$ l de una muestra de sangre entera lisada que contenía cristales de  $\beta$ -hematina en el tabique (5). Como la muestra es una suspensión, se debería agitar justo antes de la inyección para asegurar que la muestra inyectada es homogénea. Durante esta primera fase, que dura aproximadamente 2 minutos y medio, el agua de la jeringa (1) pasa a través del tubo conector (3) y lleva la muestra inyectada a través de la válvula de conmutación (6) y a través del tubo conector (8) hasta la entrada de la columna magnética. Conforme la muestra  
35 transportada por el fluido portador pasa por las microesferas magnetizadas de acero en la columna, los cristales magnéticos de  $\beta$ -hematina en la muestra son atraídos y retenidos por las microesferas magnetizadas.

40 **[0037]** Al final de la fase de separación, el dispositivo cambia a una segunda fase de análisis, que posee una duración de aproximadamente 2 minutos y medio. En la fase de análisis, la válvula de conmutación (6) se desplaza para que el fluido portador de la jeringa (1) se envíe desde el conmutador (6) hasta su desecho y la solución de recogida de la jeringa (2) se dirige por la acción del conmutador (6) a través del tubo conector (8) hasta la entrada de la columna de separación (9). La solución de recogida se selecciona para que, conforme pase por las microesferas, recoja y eluya los cristales de  $\beta$ -hematina retenidos por las microesferas durante la fase de separación para proporcionar una solución analizable que, en esta forma de realización, comprende los cristales de  $\beta$ -hematina disueltos en la solución de recogida de hidróxido de sodio.

45 **[0038]** La salida de la columna de separación se conecta por medio de un tubo conector (11) a una celda de flujo (13) donde una luz emitida desde un diodo de ancho de banda estrecho (centrado en 405 nm) pasa a través de la solución analizable y la señal de luz transmitida atenuada se encuentra en un sensor de luz (15). La absorción de luz detectada en la señal de luz atenuada proporciona una indicación de la presencia y la cantidad de los cristales de  $\beta$ -hematina o hemozoína disueltos de la muestra. Una salida del sensor de luz (15) se conecta a un voltímetro  
50 y amplificador de señal (16) y posteriormente se conecta a un ordenador configurado para procesar y visualizar la señal.

**[0039]** La salida de fluido de la celda de flujo (13) se envía a través de un tubo conector (14) hasta su desecho.

55 **[0040]** Al final de la fase de análisis, el dispositivo pasa a una tercera fase de enjuague, durante la cual la válvula de conmutación (6) dirige el fluido de recogida desde la jeringa (2) hasta su desecho y dirige el fluido portador desde la jeringa a través del tubo conector (8) hasta la columna de separación (9).

**[0041]** La figura 3 es un cromatograma obtenido mediante el programa PcLab2000 de una muestra de sangre entera lisada que contiene  $\beta$ -hematina que muestra la amplitud de señal (en voltios en el eje y) en función del tiempo (en segundos en el eje x). La flecha (18) indica cuándo se desplaza la válvula de conmutación para pasar

de la fase de separación a la fase de análisis. El pico (19) corresponde a la detección de  $\beta$ -hematina en la solución de análisis. La superficie de este pico (19) está correlacionada con la concentración de  $\beta$ -hematina en la muestra.

**[0042]** La figura 4 es un cromatograma obtenido mediante el programa PCLab2000 de una muestra de sangre entera lisada contaminada con malaria y analizada utilizando el procedimiento descrito anteriormente.

5 **[0043]** Para determinar la cantidad de hemozoina (o  $\beta$ -hematina) en la muestra, se puede realizar una curva de calibración preliminar, especialmente utilizando muestras de calibración que contengan cantidades conocidas de  $\beta$ -hematina. Por ejemplo, la curva de calibración indica la concentración de hemozoina en función de la superficie sometida a la señal pico correspondiente a la hemozoina (que se puede determinar utilizando el *software* Graph Pad) o, en una alternativa simplificada pero menos precisa, en función de la intensidad máxima de la señal pico correspondiente a la hemozoina en la señal de absorción.

10 **[0044]** La sencillez y resistencia del dispositivo facilitan su uso en condiciones de campo. El hecho de obtener rápidamente un resultado fiable con un alto nivel de sensibilidad que no dependa de manera significativa de la aptitud del operario también resulta ventajoso.

15 **[0045]** La figura 5 es una representación esquemática de un sistema de microflujo en forma de celda de flujo integrada 26 que presenta una longitud de 76 mm y una anchura de 26 mm que comprende:

20: una entrada para el fluido portador

21: una entrada para el fluido de recogida

22: una entrada para la muestra

23: un depósito de microesferas

20 24: una ventana óptica

25: una salida/desecho

y que comprende el depósito de microesferas y la ventana óptica en forma de chip o celda de flujo plana. La celda de flujo plana está adaptada para su uso con al menos (i) su depósito de microesferas, ya sea colocado sobre un imán permanente o intercalado entre un par de imanes permanentes planos; y (ii) con un emisor de luz y un sensor de luz dispuestos en la ventana óptica. Se puede modificar la geometría de los imanes y su posicionamiento para asegurar un campo magnético adecuado. Los pasos o conductos de conexión 27 que llevan a) desde las entradas del fluido portador, el fluido de recogida y la muestra hasta una entrada del depósito de microesferas b) desde una salida del depósito de microesferas hasta una entrada de la ventana óptica y c) desde una salida de la ventana óptica hasta la salida/desecho; presentan un diámetro de 100  $\mu\text{m}$ . El depósito de microesferas contiene micropartículas de acero magnetizables que presentan un diámetro de 200  $\mu\text{m}$ .

35 El fluido portador y el fluido de recogida se proporcionan desde recipientes externos y se bombean a través de la celda de flujo, por ejemplo, utilizando una bomba peristáltica para cada fluido. El uso de bombas peristálticas que comprenden válvulas antirretorno evita que sea necesaria una circulación continua del fluido y una válvula de conmutación (6) con una salida intermedia (7), según se ha descrito para el dispositivo analítico de la figura 2. La muestra que se va analizar se puede introducir por medio de una micropipeta, por ejemplo, una micropipeta de Eppendorf®, o un capilar de vidrio.

40 El dispositivo se puede proporcionar como un kit que comprende: una o varias celdas de flujo 26 llenas de las micropartículas magnéticas, imán(es) externo(s), especialmente imanes permanentes, bombas peristálticas, un emisor de luz y un sensor de luz asociado, equipo de procesamiento de señales y una pantalla de interfaz para presentar los resultados, preferiblemente una interfaz de pantalla táctil.

El sistema de microflujo proporciona un sistema de análisis especialmente compacto, rápido y de bajo coste, adecuado para un uso de campo con pequeños volúmenes de muestras.



## REIVINDICACIONES

1. Método de detección de un material diana en una muestra comprendiendo el material diana en una forma que presenta propiedades magnéticas, comprendiendo el método:
- 5       - la separación magnética de la forma magnética del material diana de la muestra en una primera fase de separación en la que el material diana se separa magnéticamente de la muestra haciendo pasar la muestra a través de un separador magnético (9, 10) y conservando la forma magnética del material diana en el separador (9, 10);
- 10       - la disolución de la forma magnética separada del material diana para proporcionar una solución analizable comprendiendo el material diana en una segunda fase de análisis en la que el material diana se extrae del separador magnético (9, 10) mediante disolución y elución en una solución para proporcionar la solución analizable;
- 15       - análisis espectroscópico de la solución analizable, en un analizador espectroscópico (12, 15) presentando una entrada de muestra en conexión fluida con una salida de muestra del separador magnético (9, 10), para detectar el material diana.
- 15   2. Método según la reivindicación 1, donde el material diana comprende hemozoína o  $\beta$ -hematina.
3. Método según cualquier reivindicación anterior, donde el método comprende un método de detección y cuantificación de hemozoína en una muestra de sangre para detectar infección de malaria y/o para estimar y/o cuantificar la parasitemia.
- 20   4. Método según cualquier reivindicación anterior, donde la muestra comprende una muestra de sangre entera lisada.
5. Método según cualquier reivindicación anterior, donde la separación magnética de la forma magnética del material diana de la muestra comprende la aplicación de un campo magnético que presenta una intensidad en el rango de 0,2 a 10 T.
- 25   6. Método según cualquier reivindicación anterior, donde la separación magnética de la forma magnética del material diana de la muestra comprende el paso de la muestra por partículas magnéticas, especialmente partículas magnetizadas que contienen hierro, en una columna de separación magnética (9).
- 30   7. Método según cualquier reivindicación anterior, donde la disolución de la forma magnética separada del material diana para proporcionar una solución analizable comprende la disolución en una solución acuosa que comprende un agente alcalinizante seleccionado del grupo que consiste en hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio, hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, hidróxidos de amonio cuaternario orgánico, amoníaco, aminas orgánicas y combinaciones de estos.
- 35   8. Método según cualquier reivindicación anterior, donde el análisis espectroscópico comprende espectroscopia de absorción óptica, donde la luz emitida desde una fuente de luz (12) pasa a través de la solución analizable para proporcionar una luz transmitida atenuada que se recibe mediante un sensor de luz (15).
9. Método según la reivindicación 8, donde una indicación de la cantidad de material diana en la muestra se obtiene a través de la absorbancia de la luz transmitida.
- 40   10. Método según cualquier reivindicación anterior, donde el análisis espectroscópico de la solución analizable para detectar el material diana magnético disuelto comprende el análisis de una luz casi monocromática, especialmente que comprende longitudes de onda en el rango de 350 nm a 420 nm o de 600 a 640 nm.
11. Método según cualquier reivindicación anterior, donde el material diana que presenta propiedades magnéticas comprende hemozoína y el método es capaz de detectar una concentración de hemozoína en la muestra que sea inferior a 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , preferiblemente inferior a 0,08  $\mu\text{g/ml}$ .
- 45   12. Dispositivo para detectar la presencia de un material diana en una muestra líquida comprendiendo el material diana en una forma que presenta propiedades magnéticas, comprendiendo el dispositivo:
- 45       - un separador magnético (9, 10) que presenta una trayectoria de flujo de muestra entre una entrada de muestra y una salida de muestra, pasando la trayectoria de flujo del separador magnético por miembros magnéticos (10), especialmente microesferas magnetizables, mantenidos en el separador magnético (9, 10); y
- 50       - un analizador espectroscópico (12, 15) presentando una trayectoria de flujo de muestra entre una entrada de muestra y una salida de muestra, estando la salida de muestra del separador magnético (9, 10) en conexión fluida con la entrada de muestra del analizador espectroscópico (12, 15), comprendiendo la trayectoria de flujo del analizador espectroscópico una zona de detección y comprendiendo el analizador espectroscópico (12, 15) un emisor de radiación (12), especialmente un emisor de luz casi monocromática, configurado para emitir radiación en la zona de detección y un sensor (15) configurado para detectar radiación en la zona de detección.

- 5 **13.** Dispositivo según la reivindicación 12, donde el dispositivo comprende, además, uno o varios de: una entrada de tabique (5) que permite la introducción de una muestra en una trayectoria de flujo de un fluido portador; una fuente (1), especialmente una jeringa, adaptada para introducir un fluido portador en el separador magnético (9; 10); una fuente (2), especialmente una jeringa, adaptada para introducir un fluido de recogida y/o de disolución en el separador magnético (9; 10); un dispositivo de flujo de fluido, especialmente una bomba, adaptado para crear un flujo de un fluido a través del dispositivo; una fuente de radiación (12), especialmente una fuente de luz casi monocromática, adaptada para emitir radiación a través de una trayectoria de flujo de la muestra que se va a analizar; un sensor (15) adaptado para detectar la radiación que ha pasado a través de la trayectoria de flujo de la muestra que se va a analizar; equipo de procesamiento de señales (16) adaptado para proporcionar una indicación de la presencia y/o cantidad del material diana en la muestra en función de una salida del analizador espectroscópico (12, 15).
- 10 **14.** Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, donde el dispositivo está conectado a un analizador de señales configurado para proporcionar una indicación de la cantidad de material diana en la muestra en función de una señal de salida del analizador espectroscópico (12, 15).
- 15 **15.** Celda de flujo integrada (26) para su uso en un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para detectar la presencia de un material diana en una muestra líquida comprendiendo el material diana en una forma que presenta propiedades magnéticas, donde la celda de flujo integrada comprende:
- una entrada (20) para un fluido portador,
  - una entrada (21) para un fluido de recogida,
  - 20 - una entrada (22) para introducir la muestra líquida comprendiendo el material diana en una forma que presenta propiedades magnéticas en una trayectoria de flujo del fluido portador,
  - una salida (25),
  - una ventana óptica (24),
  - un depósito de microesferas (23) que contiene micropartículas de acero magnetizables, estando dicho depósito de microesferas (23) en conexión fluida con la ventana óptica (24),
  - 25 - pasos de conexión (27) que conducen:
    - a) desde las entradas del fluido portador (20), el fluido de recogida (21) y la muestra (22) a una entrada del depósito de microesferas (23),
    - b) desde una salida del depósito de microesferas (23) a una entrada de la ventana óptica (24), y
    - 30 c) desde una salida de la ventana óptica (24) a la salida (25),
- comprendiendo dicha celda de flujo integrada (26) el depósito de microesferas (23) y la ventana óptica (24) en forma de una celda de flujo plana adaptada para su uso con al menos (i) dicho depósito de microesferas (23), ya sea colocado sobre un imán permanente o intercalado entre un par de imanes permanentes planos; y (ii) con un emisor de luz y un sensor de luz dispuestos en la ventana óptica (24).
- 35

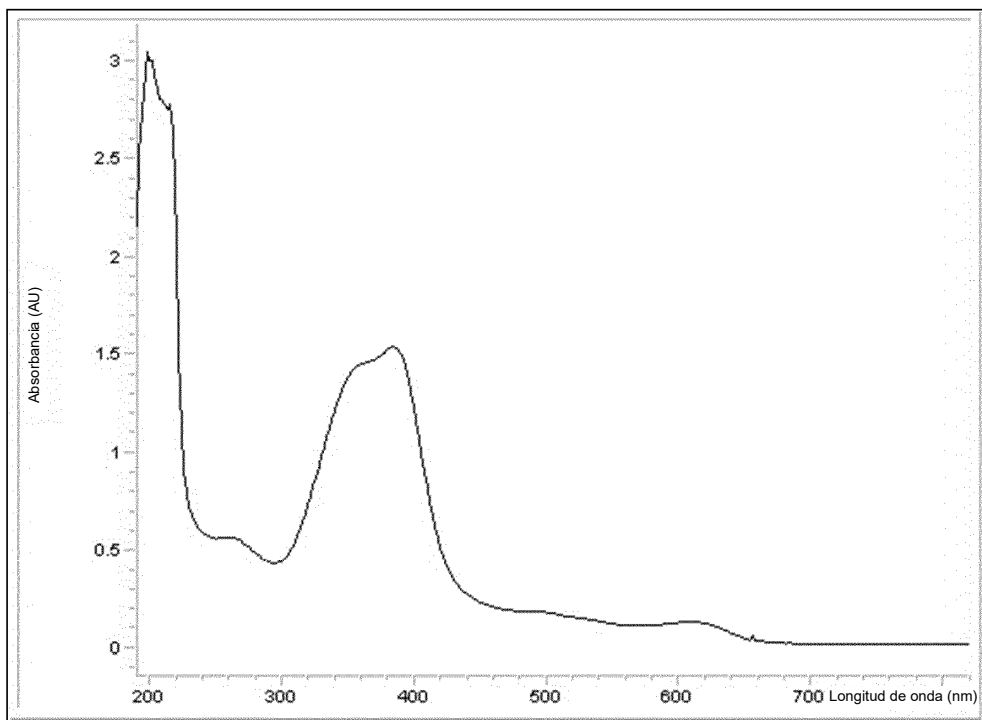


FIG. 1

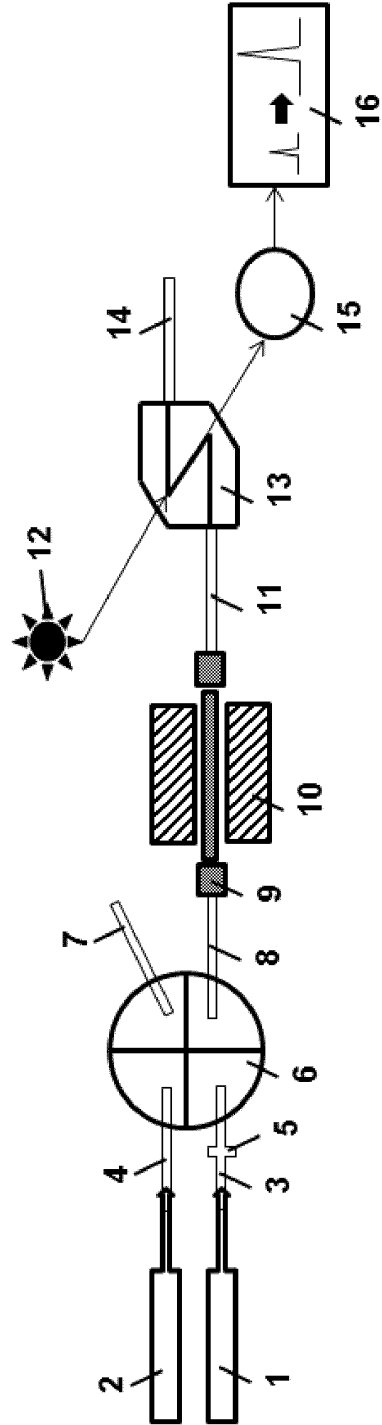


FIG. 2

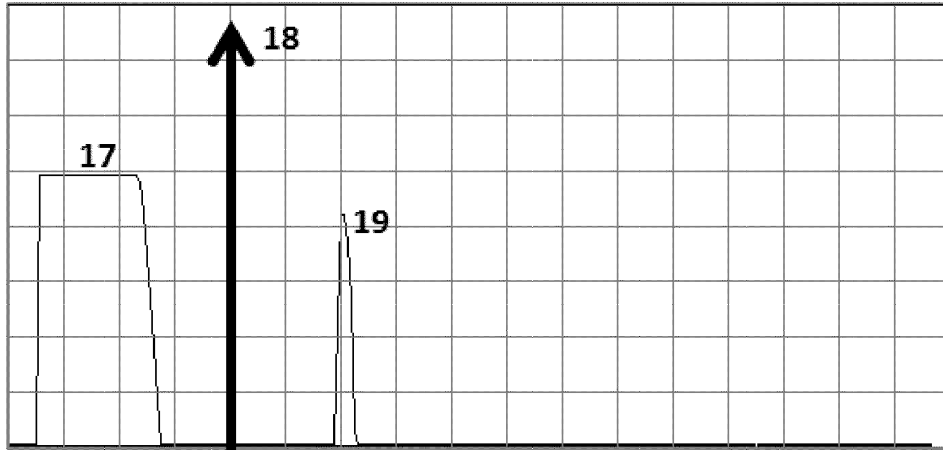


FIG. 3

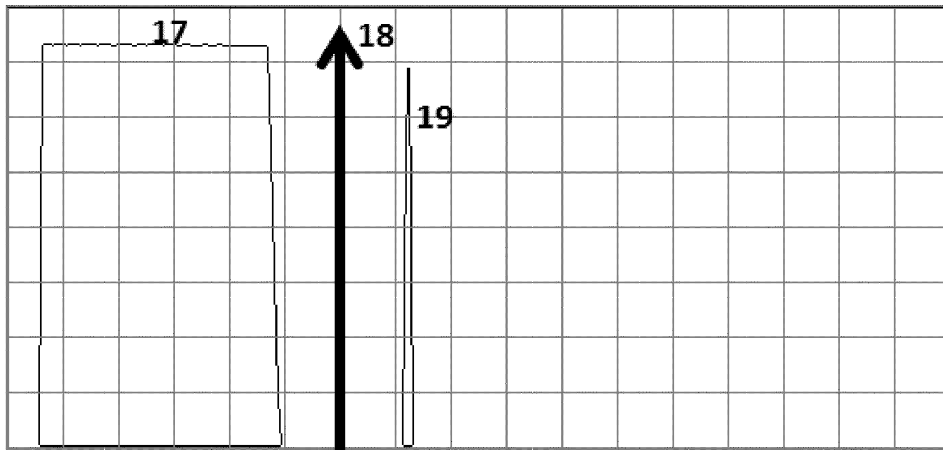


FIG. 4

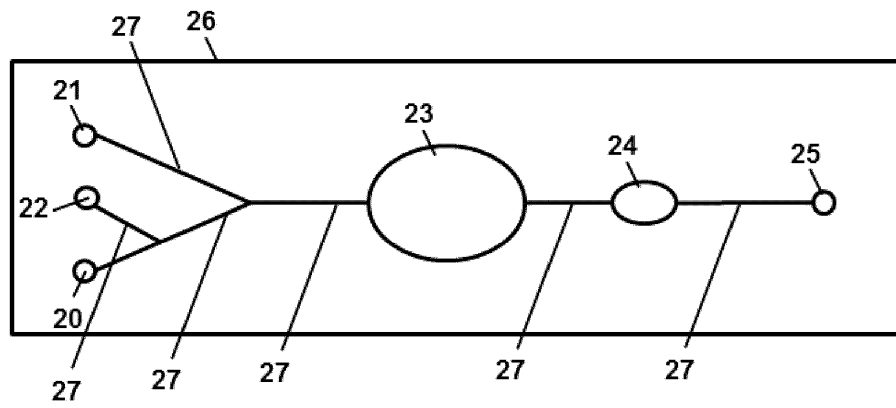


FIG. 5