

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 799 398**

51 Int. Cl.:

A61M 1/36 (2006.01)

C12Q 1/24 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

B01D 15/38 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2014 PCT/US2014/064419**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2015 WO15069942**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2014 E 14860492 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 3065796**

54 Título: **Métodos para diagnosticar enfermedades infecciosas usando medios de adsorción**

30 Prioridad:

08.11.2013 US 201361902070 P

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

17.12.2020

73 Titular/es:

**EXTHERA MEDICAL CORPORATION (100.0%)
757 Arnold Drive, Suite B
Martinez, CA 94553, US**

72 Inventor/es:

**WARD, ROBERT S. y
MCCREA, KEITH R.**

74 Agente/Representante:

DÍAZ DE BUSTAMANTE TERMINEL, Isidro

ES 2 799 398 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

Métodos para diagnosticar enfermedades infecciosas usando medios de adsorción

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud provisional de EE. UU. N° 61/902.070, presentada el 8 de noviembre de 2013, cuya divulgación se incorpora por la presente como referencia en su totalidad a todos los efectos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La detección temprana de enfermedades infecciosas es necesaria para controlar su propagación, dirigir la terapia y mejorar los desenlaces terapéuticos de los pacientes. Por ejemplo, la identificación temprana y precisa de brotes de patógenos mortales puede prevenir la aparición de pandemias globales. Actualmente, muchos métodos de diagnóstico para las infecciones del torrente sanguíneo causadas, por ejemplo, por virus (incluido el Ébola y filovirus relacionados) o bacterias resistentes a los medicamentos, requieren al menos 24 horas o más para funcionar. Existe la necesidad en la técnica de un método para minimizar el tiempo necesario para detectar la presencia de un patógeno en la muestra de un individuo. El objetivo es detectar el patógeno mientras todavía está presente a concentraciones muy bajas, si es posible, antes de que los síntomas clínicos sean evidentes. La intervención temprana puede minimizar, entonces, la intensidad y la duración de la infección, reduciendo así la morbilidad y la mortalidad.

20 En algunos casos, la presencia de células tales como células sanguíneas (por ejemplo, glóbulos rojos y glóbulos blancos) en la muestra reduce la especificidad y la sensibilidad del método de ensayo. En la actualidad, no existe ningún medio para el aislamiento y la recogida rápida de un patógeno infeccioso de una muestra biológica de manera que el patógeno pueda identificarse o analizarse cuando está presente a una concentración muy baja. Además, existe la necesidad en la técnica de tecnologías que puedan mejorar la sensibilidad de los métodos de diagnóstico existentes para detectar patógenos. La presente invención satisface estas y otras necesidades.

25 El documento WO 2008/095905 enseña el uso de una proteína receptora de la superficie celular para unirse a un patógeno. El documento WO 2008/095905 enseña la formación de un complejo proteína-patógeno. El documento US 2008/0268464 desvela un proceso y un dispositivo para determinar la actividad de las enzimas. El dispositivo para llevar a cabo el proceso tiene una columna con un portador cromatográfico para tratar una muestra. El portador se mezcla con una sustancia capaz de unirse a un inhibidor enzimático presente en la muestra. El portador se disocia en productos de escisión por la acción de la enzima, y posteriormente los productos de escisión se detectan o miden. El documento Robert Ward ET AL: SOCIETY FOR BIOMATERIALS 2013 ANNUAL MEETING AND EXPOSITION, 10 de abril de 2013 (10/04/2013), se refiere a un dispositivo terapéutico (título) y terapia de afinidad. Robert Ward, ET AL., Recita: "Esto indica a) la amplitud de los adsorbatos que pueden eliminarse de la sangre completa mediante "terapia de afinidad con heparina inmovilizada" y b) su utilidad potencial como tratamiento clínico para la bacteriemia, particularmente cuando es causada por organismos farmacorresistentes, o cuando no hay tratamientos alternativos disponibles".

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un método *in vitro* y un kit de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

40 Se desvela un método *in vitro* para concentrar una amplia gama de patógenos infecciosos y toxinas presentes en una muestra biológica obtenida de un sujeto que es sospechoso de estar infectado con dichos patógenos. El método comprende: (a) poner en contacto la muestra biológica obtenida del sujeto con un medio de adsorción de amplio espectro en condiciones que forman un complejo adherente que comprende el medio de adsorción y dichos patógenos; (b) separar el complejo adherente de los componentes de la muestra que no están incluidos en el complejo mientras se mantiene el complejo, por ejemplo, lavando el complejo adherente con una solución tampón; y (d) recoger patógenos del complejo adherente aplicando un tampón de elución al complejo, concentrando así los patógenos infecciosos en un eluyente. En algunas realizaciones, el método comprende además detectar los patógenos infecciosos aislados. En algunos casos, la detección de los patógenos infecciosos aislados comprende un ensayo colorimétrico, un inmunoensayo, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un ensayo basado en PCR, un ensayo de crecimiento de patógenos con tinción opcional, o una combinación de los mismos.

50 En algunas realizaciones, el tampón de lavado es una solución salina normal. En algunas realizaciones, el tampón de elución es una solución salina de alta fuerza iónica o hipertónica.

En algunas realizaciones, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, suero, plasma, orina, heces, esputo, lágrimas, saliva, fluido de lavado bronquial, otro fluido corporal y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el medio de adsorción es un sustrato sólido de área superficial elevada que tiene al menos un adsorbente molecular polisacarídico en la superficie del mismo. En algunas realizaciones, el al menos un adsorbente polisacarídico está unido a la superficie del sustrato sólido mediante fijación en el extremo. En algunas realizaciones, el al menos un adsorbente polisacarídico es un miembro seleccionado del grupo que consiste en heparina, sulfato de heparano, manosa, sulfato de dextrano, ácido hialurónico, ácido salicílico, quitosano y una combinación de los mismos. En algunos casos, la manosa es D-manosa o un polímero de D-manosa. En algunos casos, el al menos un adsorbente polisacarídico es heparina y manosa.

En algunas realizaciones, el sustrato sólido comprende una pluralidad de perlas de polímero rígidas. La pluralidad de perlas rígidas de polímero pueden ser perlas de polietileno rígidas.

En algunas realizaciones, los patógenos se seleccionan del grupo que consiste en *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, virus del Ébola (EBOV), filovirus no EBOV, Flaviviridae, *Streptococcus aureus*, *Escherichia coli*, bacterias *enterobacteriaceae* resistentes a carbapenem (CRE), un patógeno productor de ESBL, bacterias *enterococci* resistentes a vancomicina (VRE), *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Candida albicans*, citomegalovirus (CMV), adenovirus simple, virus del herpes simple 1 (HSV1), virus del herpes simple 2 (HSV2) y cualquier combinación de los mismos.

Se desvela un método *in vitro* para reducir o eliminar las células sanguíneas de una muestra biológica obtenida de un sujeto que es sospechoso de estar infectado con un patógeno. El método comprende: (a) poner en contacto la muestra biológica obtenida del sujeto con un medio de adsorción opcionalmente de amplio espectro en condiciones para formar un complejo adherente que comprende el medio de adsorción y un patógeno presente en la muestra; y (b) separar las células sanguíneas de la muestra y el complejo adherente mientras se mantiene el complejo adherente, reduciendo o eliminando así las células sanguíneas de la muestra. En algunas realizaciones, la etapa (b) comprende además lavar el complejo adherente con una solución salina. En algunas realizaciones, el método comprende además (c) aplicar un tampón de elución al complejo adherente; y (d) recoger el patógeno del complejo adherente. En algunas realizaciones, el método comprende además detectar los patógenos infecciosos aislados. En algunos casos, la detección de los patógenos infecciosos aislados comprende un ensayo colorimétrico, un inmunoensayo, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un ensayo basado en PCR, un ensayo de crecimiento de patógenos o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el tampón de lavado es una solución salina. En algunas realizaciones, el tampón de elución es una solución salina altamente iónica o hipertónica.

En algunas realizaciones, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, suero, plasma, orina, heces, esputo, lágrimas, saliva, fluido de lavado bronquial, otro fluido corporal y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el medio de adsorción es un sustrato sólido de área superficial elevada que tiene al menos un adsorbente polisacarídico en la superficie del mismo. En algunas realizaciones, el al menos un adsorbente polisacarídico está unido a la superficie del sustrato sólido mediante fijación en el extremo. En algunas realizaciones, el al menos un adsorbente polisacarídico es un miembro seleccionado del grupo que consiste en heparina, sulfato de heparano, manosa, sulfato de dextrano, ácido hialurónico, ácido salicílico, quitosano y una combinación de los mismos. En algunos casos, la manosa es D-manosa o un polímero de D-manosa. En algunos casos, el al menos un adsorbente polisacarídico es heparina y manosa.

En algunas realizaciones, el sustrato sólido comprende una pluralidad de perlas de polímero rígidas. La pluralidad de perlas rígidas de polímero pueden ser perlas de polietileno rígidas.

En algunas realizaciones, los patógenos se seleccionan del grupo que consiste en *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, virus del Ébola (EBOV), *Streptococcus aureus*, *Escherichia coli*, bacterias *enterobacteriaceae* resistentes a carbapenem (CRE), un patógeno productor de ESBL, bacterias *enterococci* resistentes a vancomicina (VRE), *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Candida albicans*, citomegalovirus (CMV), virus del herpes simple 1 (HSV1), virus del herpes simple 2 (HSV2) y cualquier combinación de los mismos.

Se desvela un método *in vitro* para diagnosticar malaria en un sujeto que es sospechoso de estar infectado con *Plasmodium*. El método comprende (a) poner en contacto una muestra obtenida de dicho sujeto con un medio de adsorción en condiciones para formar un complejo adherente que comprende el medio de adsorción y una célula presente en la muestra que está infectada con *Plasmodium*; (b) determinar la presencia del complejo adherente detectando un cambio físico en el medio de adsorción; y (c) predecir que el sujeto tiene malaria basándose en el cambio físico en el medio de adsorción en comparación con un medio de adsorción de referencia que se ha puesto en contacto con una muestra de control. En algunas realizaciones, el método comprende además generar una curva patrón del cambio físico respecto al medio de referencia que se ha puesto en contacto con la muestra de control.

En algunas realizaciones, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, suero,

plasma, orina, heces, esputo, lágrimas, saliva, fluido de lavado bronquial, otro fluido corporal y combinaciones de los mismos. En algunos casos, la muestra es sangre completa.

En algunas realizaciones, la muestra de control es una muestra de un sujeto sano. En algunas realizaciones, la muestra de control es una muestra de un sujeto con malaria.

5 En algunas realizaciones, el cambio físico es el color del medio de adsorción.

10 En algunas realizaciones, el medio de adsorción es un sustrato sólido de área superficial elevada que tiene al menos un adsorbente polisacárido en la superficie del mismo. En algunas realizaciones, el al menos un adsorbente polisacárido está unido a la superficie del sustrato sólido mediante fijación en el extremo. En algunas realizaciones, el al menos un adsorbente polisacárido es un miembro seleccionado del grupo que consiste en heparina, sulfato de heparano, manosa, sulfato de dextrano, ácido hialurónico, ácido salicílico, quitosano y una combinación de los mismos. En algunos casos, la manosa es D-manosa o un polímero de D-manosa. En algunos casos, el al menos un adsorbente polisacárido es heparina y manosa.

En algunas realizaciones, el sustrato sólido comprende una pluralidad de perlas de polímero rígidas. La pluralidad de perlas rígidas de polímero pueden ser perlas de polietileno rígidas.

15 Se desvela un método *in vitro* para determinar que un sujeto está infectado con un patógeno infeccioso. El método comprende (a) poner en contacto una muestra de sangre completa obtenida de dicho sujeto con un medio de adsorción para formar un complejo adherente que comprende el medio de adsorción y un patógeno presente en la muestra; (b) determinar la presencia del complejo adherente detectando un cambio físico en el medio de adsorción; y (c) predecir que el sujeto está infectado por el patógeno infeccioso basándose en el cambio físico en el medio de adsorción en comparación con un medio de adsorción de referencia que se ha puesto en contacto con una muestra de control. En algunas realizaciones, el método comprende además generar una curva patrón del cambio físico respecto al medio de referencia que se ha puesto en contacto con la muestra de control.

20

25 En algunas realizaciones, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, suero, plasma, orina, heces, esputo, lágrimas, saliva, fluido de lavado bronquial, otro fluido corporal y combinaciones de los mismos. En algunos casos, la muestra es sangre completa.

En algunas realizaciones, la muestra de control es una muestra de un sujeto sano. En algunas realizaciones, la muestra de control es una muestra de un sujeto infectado con el patógeno infeccioso.

En algunas realizaciones, el cambio físico es el color del medio de adsorción.

30 En algunas realizaciones, el medio de adsorción es un sustrato sólido de área superficial elevada que tiene al menos un adsorbente polisacárido en la superficie del mismo. En algunas realizaciones, el al menos un adsorbente polisacárido está unido a la superficie del sustrato sólido mediante fijación en el extremo. En algunas realizaciones, el al menos un adsorbente polisacárido es un miembro seleccionado del grupo que consiste en heparina, sulfato de heparano, manosa, sulfato de dextrano, ácido hialurónico, ácido salicílico, quitosano y una combinación de los mismos. En algunos casos, la manosa es D-manosa o un polímero de D-manosa. En algunos casos, el al menos un adsorbente polisacárido es heparina y manosa.

35

En algunas realizaciones, el sustrato sólido comprende una pluralidad de perlas de polímero rígidas. La pluralidad de perlas rígidas de polímero pueden ser perlas de polietileno rígidas.

40 En algunas realizaciones, los patógenos se seleccionan del grupo que consiste en *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, virus del Ébola (EBOV), *Streptococcus aureus*, *Escherichia coli*, bacterias *enterobacteriaceae* resistentes a carbapenem (CRE), un patógeno productor de ESBL, bacterias *enterococci* resistentes a vancomicina (VRE), *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Candida albicans*, citomegalovirus (CMV), virus del herpes simple 1 (HSV1), virus del herpes simple 2 (HSV2) y cualquier combinación de los mismos.

45 Estos y otros aspectos, objetos y realizaciones serán más evidentes cuando se lean con la descripción detallada que sigue.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra una realización de un concentrador de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

50 La presente divulgación proporciona métodos para la detección y el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Ventajosamente, la presente invención puede usarse para aislar bacterias, virus, citocinas y otros patógenos (por ejemplo, parásitos) a partir de la muestra de un paciente que puede usarse en la detección temprana de una infección. En la presente divulgación, las células y otros no analitos que pueden interferir en el ensayo de detección

de analitos pueden eliminarse de la muestra usando los medios de adsorción descritos en el presente documento.

También se proporcionan en el presente documento métodos de ensayo cromogénicos simples para detectar pRBC circulantes y *Plasmodium* a partir de una muestra tomada de un sujeto humano. El método también puede usarse para controlar la progresión de la malaria durante el inicio y/o la finalización de la terapia contra la malaria.

- 5 Sorprendentemente, se descubrió que la parasitemia en los pRBC se puede detectar poniendo en contacto la sangre infectada con un polisacárido (por ejemplo, heparina o sulfato de heparano) que se ha unido covalentemente a un medio de adsorción. Los parásitos y los pRBC se unen al medio de adsorción y, a su vez, alteran el color del medio. Por lo tanto, un cambio de color visible indica que el sujeto tiene una infección de malaria.

I. Definiciones

- 10 Como se usan en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuyen a menos que se especifique lo contrario.

El término "infección por malaria" se refiere a una infección causada por los protozoos parásitos del género *Plasmodium*, tal como, pero sin limitarse a, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*.

- 15 El término "medio de adsorción" se refiere a un material al que una célula, polipéptido, polinucleótido, molécula química, molécula biológica puede adherirse a la superficie del mismo.

El término "complejo adherente" se refiere a un complejo de al menos dos moléculas en el que la primera molécula está fijada (por ejemplo, enlazada, acoplada o unida) a la superficie de un sustrato y la segunda molécula está fijada a la primera molécula.

- 20 El término "cambio de color" se refiere a un cambio de un primer color a un segundo color. Si no hay una diferencia detectable en el primer color y el segundo color, entonces no se indica un cambio de color.

El término "espectro visible" se refiere a la parte del espectro electromagnético, por ejemplo, aproximadamente de 390 a 7000 nm que puede ser detectada por el ojo humano. La luz en el infrarrojo cercano, infrarrojo de longitud de onda media y espectro de longitud de onda lejana no son visibles para el ojo humano.

- 25 El término "control sano" se refiere a un individuo que no tiene una infección. El término "control positivo" se refiere a un individuo con una infección causada por el patógeno de interés.

El término "área superficial elevada" se refiere a la propiedad de tener una relación de área superficial específica respecto a volumen grande.

- 30 El término "adsorbente" se refiere a un sustrato sólido con un compuesto químico, una molécula biológica o un material que está fijado (por ejemplo, enlazado, acoplado o unido) al mismo. En ciertos casos, el adsorbente es el sustrato sólido mismo. En una realización, un adsorbente es una resina polimérica con un polisacárido unido a ella.

El término "perla de polímero rígida" se refiere a una perla, gránulo, pildorita, esfera, partícula, microcápsula, esfera, microesfera, nanoesfera, microperla, nanoperla, micropartícula, nanopartícula y similares que están hechos de una resina de polímero.

- 35 El término "carbohidrato" se refiere a una molécula que contiene átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno, y generalmente con la fórmula empírica $C_x(H_2O)_y$, donde x e y son números diferentes. Los ejemplos de carbohidratos incluyen monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos.

- 40 El término "polisacárido" se refiere a una molécula que comprende muchas unidades de monosacárido unidas por enlaces glucosídicos, y que tiene una fórmula empírica de $C_x(H_2O)_y$, donde x está entre 200 y aproximadamente 3000.

El término "terapia antipalúdica" se refiere a un tratamiento tal como un agente farmacéuticamente eficaz destinado a aliviar o remediar una infección por malaria.

II Descripción detallada de las realizaciones

A. Medio de adsorción

- 45 El medio de adsorción de la presente divulgación proporciona una superficie para fijar un adsorbente polisacárido que puede unirse a analitos/patógenos y pRBC. El medio de adsorción incluye un sustrato sólido con un área superficial elevada que tiene al menos un adsorbente polisacárido en la superficie del mismo. El sustrato sólido puede estar hecho, por ejemplo, pero sin limitarse a, polietileno, poliestireno, polipropileno, polisulfona, poliacrilonitrilo, policarbonato, poliuretano, sílice, látex, vidrio, celulosa, acetato de celulosa, dextrano reticulado, agarosa reticulada, quitina, quitosano, dextrano reticulado, alginato reticulado, silicona, Teflon®, fluoropolímero y
- 50

otros polímeros sintéticos. El sustrato sólido con un área superficial elevada puede ser una pluralidad de monocapas de adsorbente, filtros, membranas, fibras sólidas, fibras huecas, partículas o perlas. Opcionalmente, el sustrato sólido puede estar presente en otras formas o perfiles o artículos configurados que proporcionan un área superficial grande, suficiente para unir una cantidad detectable de analito.

5 Los sustratos útiles para crear los medios incluyen, pero sin limitarse a, perlas rígidas no porosas, partículas o relleno, espumas reticuladas, un lecho monolítico rígido (por ejemplo, formado de perlas o partículas sinterizadas), una columna rellena de tela tejida o no tejida, una columna rellena con un hilo o fibras de monofilamento densas sólidas o huecas (no microporosas), una película plana o membrana de barrera, un cartucho enrollado en espiral
10 formado a partir de película plana o membrana densa, o una combinación de medios tales como un cartucho mixto de perlas/tela.

En ciertos casos, un sustrato adecuado es uno que es inicialmente microporoso, pero se vuelve esencialmente no poroso cuando la superficie se trata antes, durante o después de la creación de sitios de adsorción, por ejemplo, mediante uno o más adsorbentes polisacarídicos fijados en el extremo. En una realización, el sustrato está en forma de perlas o partículas sólidas.

15 En ciertos casos, el sustrato sólido es una pluralidad de perlas de polímeros rígidos tales como polietileno, poliestireno, polipropileno, polisulfona, poliacrilonitrilo, policarbonato, poliuretano, sílice, látex, vidrio, celulosa, agarosa reticulada, quitina, quitosano, dextrano reticulado, alginato reticulado, silicona, fluoropolímero y perlas de polímero sintéticas. Preferentemente, las perlas de polímero rígidas son perlas de polietileno.

20 El tamaño del sustrato sólido se puede seleccionar de acuerdo con el volumen de la muestra de prueba usada en el ensayo u otros parámetros. En algunas realizaciones, la pluralidad de perlas de polímero rígidas tienen un diámetro externo promedio de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 1 mm, por ejemplo, 1 μm , 2 μm , 3 μm , 4 μm , 5 μm , 6 μm , 7 μm , 8 μm , 9 μm , 10 μm , 15 μm , 20 μm , 25 μm , 30 μm , 35 μm , 45 μm , 55 μm , 60 μm , 65 μm , 70 μm , 75 μm , 80 μm , 85 μm , 90 μm , 95 μm , 100 μm , 200 μm , 300 μm , 400 μm , 500 μm , 600 μm , 700 μm , 800 μm , 900 μm y 1 mm. En otras realizaciones, la pluralidad de perlas de polímero rígidas tienen un diámetro promedio de
25 aproximadamente 10 μm a aproximadamente 200 μm , por ejemplo, 10 μm , 15 μm , 20 μm , 25 μm , 30 μm , 35 μm , 45 μm , 55 μm , 60 μm , 65 μm , 70 μm , 75 μm , 80 μm , 85 μm , 90 μm , 95 μm , 100 μm , 105 μm , 110 μm , 115 μm , 120 μm , 125 μm , 130 μm , 135 μm , 140 μm , 145 μm , 150 μm , 155 μm , 160 μm , 165 μm , 170 μm , 175 μm , 180 μm , 185 μm , 190 μm 195 μm y 200 μm . Las perlas útiles tienen un tamaño que varía de aproximadamente 100 a más de 500 micras de diámetro, tal como 100, 200, 300, 400 o 500 micras. El tamaño promedio de las perlas puede ser de 150 a 450 micras. Véase, por ejemplo, el documento WO 2011/068897, cuyo contenido completo se incorpora por la
30 presente como referencia.

La superficie del sustrato sólido puede funcionalizarse para permitir la fijación covalente del adsorbente polisacarídico descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, la superficie del sustrato sólido tiene al menos un grupo químico, tal como un grupo amina.

35 El medio de adsorción puede estar contenido dentro de una carcasa, tal como una jeringa, una columna, cartucho, tubo, tubo de centrifuga y similares, o cualquier recipiente. En algunas realizaciones, el recipiente tiene una forma y un tamaño particulares de modo que los glóbulos rojos que no estén capturados en el medio de adsorción unido a polisacáridos puedan eliminarse sin alterar los glóbulos rojos parasitados fijados a los medios.

40 La carcasa que comprende el medio de adsorción puede contener más de un tipo de medio de adsorción. En algunas realizaciones, los diferentes medios se colocan en capas en una disposición de tipo Parfait dentro de la carcasa de modo que la muestra, por ejemplo, sangre completa, entre en contacto con los diferentes medios en flujo en serie o en paralelo. Una disposición de los diferentes medios dentro de un cartucho es colocar un primer medio de adsorción en la entrada y/o la salida del cartucho, con una región opcionalmente mezclada que contiene el segundo medio de adsorción interpuesta entre las regiones de entrada y salida. En el caso de medios en forma de
45 fibra, se puede preparar una estructura mixta tejida, tricotada o no tejida por métodos bien conocidos en la industria textil para formar tela a partir de la fibra mixta. Como alternativa, se puede preparar un hilo a partir de un hilo multifilamento más fino o un monofilamento hecho de dos o más fibras con diferentes químicas de superficie, siempre que un tipo de fibra contenga una superficie que evite activamente la coagulación de la sangre al contacto. El hilo de fibra mixta se puede usar para preparar la tela para el contacto sanguíneo.

50 **B. Adsorbentes polisacarídicos**

En algunas realizaciones, el adsorbente polisacarídico es heparina, sulfato de heparano, manosa, sulfato de dextrano, ácido hialurónico, ácido siálico, quitosano y una combinación de los mismos. En algunos casos, uno o más adsorbentes polisacarídicos diferentes, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más adsorbentes polisacarídicos diferentes, se fijan al sustrato sólido del medio de adsorción. En algunas realizaciones, el adsorbente es heparina. En algunas
55 realizaciones, el adsorbente es sulfato de heparano. En otras realizaciones, el adsorbente es manosa. En otra realización, el adsorbente es sulfato de dextrano. En algunos casos, los adsorbentes polisacarídicos son heparina y manosa. En algunos casos, los adsorbentes polisacarídicos son sulfato de heparano y manosa. En otros casos, los adsorbentes polisacarídicos son heparina y sulfato de dextrano. En otros casos, los adsorbentes polisacarídicos son

manosa y sulfato de dextrano.

En algunos casos, más de 1 adsorbente, por ejemplo, 2 adsorbentes, se fijan a un solo sustrato sólido. En algunos casos, la relación de los dos adsorbentes (A y B) está en el intervalo de 1:99 a 99: 1. En otros casos, el sustrato está recubierto con aproximadamente el 1-50 % de adsorbente A y aproximadamente el 1-50 % de adsorbente B.

5 En algunos casos, la manosa usada como adsorbente es un azúcar reductor o es un azúcar no reductor (por ejemplo, un manósido). Las manosas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, D-manosa, L-manosa, p-aminofenil- α -D-manopiranosido, un polisacárido que contiene manosa, y manano. El término "manosa" también incluye un polímero de manosa tal como manano. Manano se refiere a un polisacárido vegetal que es un polímero lineal del azúcar manosa. Los mananos vegetales tienen enlaces $\beta(1-4)$. Manano también puede referirse a un polisacárido de la pared celular que se encuentra en las levaduras. Este tipo de manano tiene una cadena principal con enlaces $\alpha(1-6)$ y ramas con enlaces $\alpha(1-2)$ y $\alpha(1-3)$.

En algunos casos, la manosa está unida por la fijación en el extremo al sustrato sólido. En otros casos, la manosa se fija al sustrato mediante fijación multipunto.

15 En otros casos, la manosa es un polímero de manosa tal como manano. Manano se refiere a un polisacárido vegetal que es un polímero lineal del azúcar manosa. Los mananos vegetales tienen enlaces $\beta(1-4)$. Manano también puede referirse a un polisacárido de la pared celular que se encuentra en las levaduras. Este tipo de manano tiene una cadena principal con enlaces $\alpha(1-6)$ y ramas con enlaces $\alpha(1-2)$ y $\alpha(1-3)$.

20 Los glóbulos rojos infectados por *P. falciparum* expresan la proteína 1 de la membrana eritrocitaria (PfEMP1) que puede unirse a moléculas de unión específicas presentes en la superficie de las células endoteliales y otros glóbulos rojos. El método proporcionado en el presente documento se basa en parte en la capacidad de los glóbulos rojos parasitados para unirse a moléculas de unión seleccionadas, tales como polisacáridos. Además, cuando estas moléculas de unión se unen a la superficie de un medio de adsorción, el medio se puede usar para separar los pRBC de una muestra del paciente, lo que a su vez altera el color del medio de adsorción. Por lo tanto, la presencia de una infección por malaria puede determinarse poniendo en contacto una muestra de paciente con una molécula de unión unida a un medio de adsorción.

25 Las moléculas que pueden unirse a pRBC y en particular PfEMP1 incluyen, pero no se limitan a, polisacáridos, tales como glucoaminoglucanos, por ejemplo, heparina, sulfato de heparano y sulfato de condroitina A (CSA), ácido sialílico, el receptor del complemento 1 (CR1), los antígenos A y B del grupo sanguíneo ABO, ICAM-1, CD36, trombospondina (TSP), receptor de proteína C endotelial (EPCR), E-selectina, molécula de citoadhesión vascular 1 (VCAM-1), molécula de citoadhesión endotelial plaquetaria 1 (PECAM -1), molécula de adhesión leucocitaria endotelial 1 (ELAM-1), proteínas séricas IgG/IgM y fibrinógeno, carbohidratos con grupos manosa, lectinas y quitosanos. Las moléculas de unión a pRBC adicionales incluyen hialuronato, peptidoglucanos, glucoproteínas, glucolípidos, glucanos, glucosilfosfatidilinositol (GPI), y ácido hialurónico y otros ácidos neuramínicos.

30 Las moléculas de unión proporcionadas anteriormente se pueden usar para adsorber pRBC sobre una superficie. En algunas realizaciones, al menos un adsorbente polisacárido se fija a un sustrato sólido de área superficial elevada para formar un medio de adsorción. En algunas realizaciones, el adsorbente polisacárido es heparina, sulfato de heparano, ácido hialurónico, ácido siálico, carbohidratos con secuencias de manosa, y quitosano. En una realización, el adsorbente polisacárido es heparina.

35 Además de los carbohidratos mixtos, es posible incluir restos de unión adicionales específicos para el analito. Estos incluyen proteínas, péptidos, anticuerpos, aficuerpos, ácidos nucleicos y otros restos de unión específicos (véase, la publicación de patente de EE. UU. 2003/0044769, incorporada como referencia en el presente documento).

C. Fijación de adsorbentes polisacáridos a la superficie del medio de adsorción

40 Los polisacáridos pueden enlazarse a la superficie del medio de adsorción mediante una fijación en el extremo de enlace covalente único (por ejemplo, fijación covalente a través del residuo terminal de la molécula de heparina). Una única fijación covalente en el grupo terminal de la molécula a fijar, en comparación con la fijación no covalente o la fijación multipunto, proporciona ventajosamente un mejor control de la orientación de las moléculas inmovilizadas mientras maximiza su densidad superficial. En particular, la fijación en el extremo de estos carbohidratos de cadena larga proporciona una arquitectura de superficie molecular de tipo cepillo que conduce a una mayor concentración de posiciones accesibles en los oligómeros de carbohidratos disponibles para la unión de analito/patógeno. En algunos casos, los pRBC se fijan a las superficies recubiertas de heparina de longitud completa (por ejemplo, heparina con un peso molecular medio de más de 10 kDa) mucho más eficientemente que a las superficies convencionales recubiertas con fragmentos de heparina, como se emplea generalmente en la técnica anterior.

45 La fijación covalente de un carbohidrato (por ejemplo, un polisacárido) a un sustrato sólido proporciona control de parámetros tales como la densidad superficial y la orientación de las moléculas inmovilizadas en comparación con la fijación no covalente. Se ha demostrado que estos parámetros proporcionan la unión de adsorbato a las moléculas de carbohidratos inmovilizadas. En ciertas realizaciones, la concentración superficial del carbohidrato sobre el

5 sustrato sólido está en el intervalo de 0,01 a aproximadamente 0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, tal como 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19 o 0,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. En otras realizaciones, la concentración superficial de los absorbentes sobre el sustrato sólido está en el intervalo de 0,001-2,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. En otra realización, la concentración superficial del o de los absorbentes sobre el sustrato sólido está en el intervalo de 0,005-0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

10 En algunos casos, la concentración superficial del adsorbente sobre el sustrato sólido está en el intervalo de 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ a 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, por ejemplo, 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 11 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 12 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 13 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 14 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 17 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 18 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 19 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. En otras realizaciones, la concentración superficial del adsorbente sobre el sustrato sólido está en el intervalo de 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ a 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, por ejemplo, 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 11 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 12 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 13 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 14 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

15 En algunos casos, manosa, derivados de manosa y oligómeros de manosa se acoplan de forma reductora a aminas primarias en sustratos aminados tales como perlas aminadas por aminación reductora. El acoplamiento de la forma abierta de aldehído de una manosa reductora a una perla da como resultado una amina secundaria estable. Las manosas no reductoras que tienen una amina reactiva se pueden acoplar a una perla con un intermedio que tiene una funcionalidad aldehído. Por ejemplo, la manosa se fija a un sustrato que contiene amina (a) poniendo en contacto un sustrato aminado con una solución acuosa que contiene una manosa para formar un intermedio de base de Schiff; y (b) poner en contacto la base de Schiff con un agente reductor para fijar la manosa. En algunas realizaciones, si la manosa es una manosa no reductora, se fija un aldehído intermedio (por ejemplo, glutardialdehído) al sustrato de amina antes de la manosa no reductora.

20 La manosa se puede disolver en solución acuosa tal como una solución acuosa ácida. La solución acuosa de manosa se pone en contacto con un sustrato aminado tal como una perla aminada. Se genera una base de Schiff. La base de Schiff se reduce posteriormente con un agente reductor. El agente reductor puede ser, por ejemplo, cianoborohidruro de sodio o borohidruro de sodio. En ciertos casos, el sustrato sólido también se hace reaccionar con heparina que tiene una funcionalidad aldehído reactiva.

25 Para la fijación de heparina, se puede lograr una función aldehído más reactiva en el residuo terminal reductor mediante degradación parcial de ácido nitroso. Esto acorta el tiempo de reacción, pero la heparina inmovilizada tendrá un peso molecular más bajo. El acoplamiento se realiza en solución acuosa, por aminación reductora (cianoborohidruro).

30 La fijación covalente de moléculas de heparina de longitud completa a una superficie se puede lograr mediante la reacción de un grupo aldehído de la molécula de heparina con un grupo amino primario presente en la superficie del medio de adsorción. Una propiedad inherente de todos los carbohidratos es que tienen un hemiacetal en su extremo reductor. Este acetal está en equilibrio con la forma aldehído y puede formar las bases de Schiff con aminas primarias. Estas bases de Schiff pueden reducirse después a aminas secundarias estables. En algunas realizaciones, la heparina de longitud completa se inmoviliza superficialmente sobre el sustrato sólido mediante conjugación covalente. En otras realizaciones, la heparina de longitud completa se fija covalentemente a dicho medio de adsorción a través de un grupo amino secundario estable.

35 En algunos casos, las moléculas de heparina de longitud completa inmovilizadas tienen un peso molecular medio de más de 10 kDa. En otras realizaciones, las moléculas de heparina inmovilizadas tienen un peso molecular medio de más de 15 kDa. En otra realización, las moléculas de heparina inmovilizadas tienen un peso molecular medio de más de 21 kDa. En otra realización más, las moléculas de heparina inmovilizadas tienen un peso molecular medio de más de 30 kDa. Preferentemente, las moléculas de heparina inmovilizadas tienen un peso molecular medio dentro del intervalo de 15-25 kDa. El peso molecular medio también puede ser mayor, tal como en el intervalo de 25-35 kDa.

45 En ciertos casos, se desvelan diversos métodos de fabricación de adsorbentes y los adsorbentes per se en las patentes de los Estados Unidos números 8.663.148 y 8.758.286; y las publicaciones de solicitud de EE. UU. No. 2009/0136586, 2012/0305482 y US 2014/231357.

D. Analitos/patógenos que se une unen a adsorbentes unidos al medio de adsorción

50 Los adsorbentes fijados al medio de adsorción se pueden usar para unirse a un analito/patógeno de interés en una muestra. En algunas realizaciones, la muestra se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, suero, plasma, orina, heces, esputo, lágrimas, saliva, fluido de lavado bronquial, otro fluido corporal y combinaciones de los mismos. En algunos casos, la muestra es sangre completa de un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano.

55 El analito/patógeno puede incluir, pero sin limitarse a, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, virus del Ébola (EBOV), *Streptococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, bacterias *enterobacteriaceae* resistentes a carbapenem (CRE) (por ejemplo, *Escherichia coli* resistente a carbapenem y *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenem), un patógeno productor de ESBL (por ejemplo, *E. coli* productora

de ESBL, *K. pneumoniae* productora de ESBL y *K. oxytoca* productora de ESBL), enterococos resistentes a vancomicina (VRE) (por ejemplo, *E. faecalis* resistente a vancomicina y *E. faecium* resistente a vancomicina), *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Candida albicans*, citomegalovirus (CMV), virus del herpes simple 1 (HSV1), virus del herpes simple 2 (HSV2) y cualquier combinación de los mismos.

En ciertos otros casos, el analito/patógeno de interés incluye, pero sin limitarse a, el virus de la hepatitis A (HAV), el virus de la hepatitis B (HBV), el virus de la hepatitis C (HCV), el virus de la hepatitis D (HDV), el virus de la hepatitis G/Virus GB-C (HGV/GBV-C), virus de inmunodeficiencia humana tipos 1 y 2 (HIV-1/2), virus linfotrópico de células T humanas tipos I y II (HTLV-I/II), citomegalovirus (CMV), Virus Epstein-Barr (EBV), Virus TT (TTV), Virus del herpes humano tipo 6 (HHV-6), Virus SEN (SEN-V) y Parvovirus humano (HPV-B19).

Virus de interés adicionales incluyen, pero sin limitarse a, virus del herpes humano tipo 7 (HHV-7), virus del herpes humano tipo 8 (HHV-8), virus de la gripe tipo A, incluidos los subtipos H1N1 y H5N1, síndrome respiratorio agudo severo (SARS) coronavirus y virus de ARN que causan fiebre hemorrágica, tales como Arenaviridae (por ejemplo, virus de la fiebre de Lassa (LFV)), Filoviridae (por ejemplo, virus del Ébola (EBOV) y virus de Marburg (MBGV)); Bunyaviridae (por ejemplo, el virus de la fiebre del Valle del Rift (RVFV) y el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (CCHFV)); y Flaviviridae (virus del Nilo Occidental (WNV), virus de la fiebre del dengue (DENV), virus de la fiebre amarilla (YFV) y (virus GB C (GBV-C), anteriormente conocido como virus de la hepatitis G (HGV)).

En ciertos casos, las bacterias incluyen, pero sin limitarse a, *Treponema pallidum* (TP, el agente de la sífilis), *Yersinia enterocolitica* y especies de *Staphylococcus* y *Streptococcus* (agentes comunes de contaminación bacteriana) y parásitos tales como especies de *Plasmodium* (el agente de la malaria), *Trypanosoma cruzi* (agente de la enfermedad de Chagas) y *Babesia microti* (el agente de la babesiosis). Bacterias adicionales incluyen, pero sin limitarse a, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Eikenella corrodens*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Bacteroides fragilis*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Pseudomonas fluorescens* y *Deinococcus radiodurans*.

Además, pueden detectarse patógenos emergentes transmitidos por la sangre, tales como *Candida sp.*, incluyendo *Candida albicans*, *Aspergillus sp.*, incluyendo *Aspergillus fumigatus*, virus de la hepatitis E (HEV), virus del herpes humano tipo 8 (HHV-8), *Borrelia burgdorferi* (agente de la enfermedad de Lyme), y el agente desconocido de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD).

Los patógenos que se sabe que se unen a heparina/sulfato de heparano pueden usarse en los métodos descritos en el presente documento. Entre los ejemplos no limitantes de dichos patógenos se incluyen bacterias, por ejemplo, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella pertussis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Haemophilus influenzae* no tipificable, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Orientia tsutsugamushi*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*; virus, por ejemplo, virus adenoasociado tipo 2, adenovirus, coronavirus, coxsackievirus, citomegalovirus, virus del dengue, FMDV, HSV1, HSV2, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, HHV8, VIH1, HPV, HTLV1, virus de la encefalitis japonesa, virus de la seudorrabia, virus sincitial respiratorio, rinovirus, virus sindbis, virus vaccinia, virus del Nilo Occidental, virus de la fiebre amarilla; parásitos, por ejemplo, *Giardia lamblia*, *Leishmania spp.*, *Encephalitozoon spp.*, *Neospora caninum*, *Plasmodium spp.*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* y priones. Véase, por ejemplo, Barlett y Park, "Chapter 2 Heparan Sulfate Proteoglycans in Infection" en M.S.G. Pavao, ed. Glycans in Diseases and Therapeutics, Biology of Extracellular Matrix, Heidelberg:Spring-Verlag, 2011.

E. Métodos para detectar analitos/patógenos

En el presente documento se proporciona un método para reducir las células sanguíneas en una muestra biológica de un individuo que está infectado o se sospecha que está infectado con dicho analito/patógeno. El método puede usarse para eliminar células sanguíneas que pueden interferir en la sensibilidad de técnicas convencionales usadas para detectar el analito/patógeno de interés. El método puede incluir exponer la muestra que incluye células sanguíneas al medio de adsorción descrito en el presente documento en condiciones para formar un complejo adherente que incluye el analito/patógeno y el medio de adsorción. Las células sanguíneas de la muestra se pueden separar del complejo adherente, por ejemplo, por gravedad u otros medios que mantengan el complejo adherente. En algunos casos, se aplica una solución salina, tal como una solución salina normal, por ejemplo, una solución de aproximadamente el 0,90 % p/v de NaCl, aproximadamente 300 mOsm/l, una solución salina 0,01 N o una solución similar, al complejo adherente que incluye el medio de adsorción para eliminar por lavado las células sanguíneas restantes.

También se proporciona en el presente documento un método para concentrar analitos/patógenos infecciosos en una muestra obtenida de un individuo que está infectado o se sospecha que está infectado con dichos analitos/patógenos. La muestra puede exponerse al medio de adsorción descrito en el presente documento bajo condiciones para formar un complejo adherente que incluye el medio de adsorción y los analitos/patógenos. Los

componentes de la muestra que no forman parte del complejo adherente pueden separarse, por ejemplo, por gravedad, sin alterar el complejo adherente. El complejo adherente que incluye el medio de adsorción, se puede lavar con un tampón de lavado, como una solución salina normal o una solución que mantiene (conserva) el complejo. En algunos casos, una solución salina normal es una solución de aproximadamente el 0.90 % p/v de NaCl, aproximadamente 300 mOsm/l, una solución salina 0,01 N o una solución similar. El complejo se puede alterar para separar los analitos/patógenos del medio de adsorción aplicando un tampón de elución, tal como una solución salina con alto contenido iónico, al complejo. En algunos casos, una solución salina altamente iónica es una solución salina 2 N. En otros casos, el tampón de elución es un tampón que puede alterar la unión del adsorbente polisacarídico y el analito/patógeno. En algunas realizaciones, se pueden eluir diferentes analitos/patógenos del medio de adsorción en diferentes fracciones usando diversos tampones de elución seleccionados para el analito/patógeno particular de interés. Similar a una columna de cromatografía, los analitos/patógenos específicos se pueden eluir en diferentes momentos en diferentes grupos. El analito/patógeno de interés puede eluirse en una o más fracciones.

Este proceso concentra analitos/patógenos, que después pueden identificarse y analizarse usando métodos estándar conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, los agentes patógenos bacterianos, virales, fúngicos, protozoarios, parasitarios y microbianos pueden detectarse mediante ensayos, tales como ensayos colorimétricos, inmunoensayos (por ejemplo, ensayos tipo sándwich o ensayos con tira reactiva), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), ensayos basados en PCR (por ejemplo, RT-PCR, qPCR, ensayos TaqMan®), ensayos de crecimiento de patógenos (por ejemplo, ensayos de resistencia a fármacos o resistencia a antibióticos) y variantes de los mismos. Por ejemplo, el ARN del HCV se detecta mediante RT-PCR con un kit estándar, tal como la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN) y RealTime HCV Genotype II (Abbott Molecular, Abbott Park, IL). El virus del Ébola se puede detectar usando, por ejemplo, el FilmArray de BioFire Diagnostics y el ensayo Ebola Virus VP40 Real-time RT-PCR Assay del CDC.

Los patógenos resistentes a los fármacos se pueden detectar cultivando el patógeno en presencia del fármaco. Por ejemplo, un patógeno sospechoso de ser *Klebsiella* o *E. coli* resistente a carbapenem puede usarse para inocular un medio de crecimiento que contiene ertapenem o meropenem. Después de un cultivo apropiado, el cultivo en caldo incubado puede subcultivarse en una placa de agar MacConkey. Al día siguiente, se puede examinar la placa de agar para detectar colonias de fermentación de lactosa (rosa-rojo). Además, las colonias aisladas se pueden cribar usando una prueba fenotípica para la producción de carbapenemasas, tal como la Prueba de Hodge Modificada (MHT).

En ciertos casos, el analito de interés puede detectarse y/o identificarse usando técnicas de laboratorio típicas tales como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), el radioinmunoensayo (RIA) y la cromatografía por afinidad. Por ejemplo, en ciertos casos, se puede usar un kit de ELISA disponible en el mercado, o se puede desarrollar fácilmente. En el ELISA, un anticuerpo específico se absorbe pasivamente en una placa. Los sitios no específicos se bloquean con una solución de proteína que no tiene parte activa en la reacción inmunoquímica específica de un ensayo particular. Un anticuerpo/patógeno específico es capturado por el anticuerpo en la superficie y luego detectado por otro anticuerpo con un marcador enzimático. El marcador enzimático se hace reaccionar con reactivos específicos y se detecta e identifica la presencia del analito.

En ciertos otros casos, se puede usar una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) para detectar el analito adsorbido a la superficie. Una microbalanza de cristal de cuarzo es un detector/sensor muy sensible y económico que produce un cambio de frecuencia en la vibración del cristal de cuarzo cuando las moléculas interactúan con su superficie. La QCM detecta un cambio físico como tal una masa por unidad de área midiendo el cambio en la frecuencia de un resonador de cristal de cuarzo. En líquido, la QCM es altamente efectiva para determinar la afinidad de las moléculas a las superficies funcionalizadas con sitios de reconocimiento. También se pueden reconocer entidades más grandes como virus y microbios. Por ejemplo, las QCM se pueden acoplar a anticuerpos, lo que permite la detección selectiva de un conjugado de anticuerpos. En ciertos casos, el eluyente contiene un analito o patógeno de interés. La QCM ha conjugado a él un anticuerpo específico para el analito. Al poner en contacto la QCM con el eluyente que contiene el analito/patógeno, el analito se une a la superficie de la QCM, y la QCM detecta la unión, la presencia y su identidad. Otras moléculas de afinidad también pueden unirse a la superficie, tales como ácidos nucleicos, carbohidratos, péptidos, proteínas y similares.

En otros casos, pueden usarse técnicas de resonancia del plasmón superficial (SPR) para detectar la presencia o identidad del analito/patógeno. El plasmón superficial es un nombre cuántico para una onda de densidad de carga eléctrica que se propaga en una interfaz entre un metal y un dieléctrico, al igual que el fotón es un nombre cuántico para una onda de luz. Los plasmones superficiales resuenan tras la excitación por radiación electromagnética que entra en una interfaz de material metálico y un material dieléctrico. El plasmón superficial responde a los cambios en el entorno cerca de la interfaz. Este hecho hace que la resonancia del plasmón superficial sea útil para la detección de interacciones biomoleculares. Al igual que la QCM, es posible marcar la superficie de SPR con un anticuerpo o un resto de unión, tal como un antígeno de un analito/patógeno de interés.

El método para concentrar analitos/patógenos a partir de sangre, por ejemplo, sangre completa o suero, o para reducir las células sanguíneas de la sangre puede incluir poner en contacto la sangre con un sustrato sólido,

esencialmente no microporoso, que ha sido tratado superficialmente con un adsorbente polisacárido que tiene una afinidad de unión por los analitos/patógenos a eliminar (los adsorbatos). El tamaño de los canales intersticiales dentro de dichos medios se equilibra con la cantidad de área superficial de los medios y la concentración superficial de los sitios de unión en los medios para proporcionar una capacidad de adsorción adecuada y al mismo tiempo permitir caudales de sangre relativamente altos a través de los medios adsorbentes. El resultado es que el transporte de adsorbatos a los sitios de unión en los medios se produce principalmente por convección forzada, no por difusión lenta. Por convección (forzada) se entiende, por ejemplo, el flujo producido por un gradiente de presión generado por una bomba o una jeringa mediante la aplicación de presión externa a un recipiente flexible (o presión interna a un recipiente rígido), por una presión por gravedad/diferencia de elevación, o por la diferencia en la presión arterial y la presión venosa en el paciente que está siendo tratado con un dispositivo extracorpóreo.

F. Método para diagnosticar una infección por malaria

En el presente documento se proporcionan métodos de uso de un medio de adsorción que comprende un sustrato sólido inmovilizado con heparina para determinar la presencia de una infección por malaria. Una muestra tomada de un individuo sospechoso de tener malaria puede analizarse para detectar glóbulos rojos (RBC) infectados o eritrocitos parasitados utilizando el método descrito en el presente documento. Este método se basa en la observación de que las proteínas de unión a sulfato de heparano ubicadas en la superficie celular de los glóbulos rojos parasitados pueden adherirse a heparina, sulfato de heparano u otros polisacáridos que están unidos en una superficie sólida. Además, el método puede utilizarse para determinar si el individuo debe recibir una terapia contra la malaria. Además, el método puede usarse para monitorizar la progresión de la malaria en un individuo que recibe dicha terapia.

Se puede obtener una muestra de un sujeto (por ejemplo, un individuo humano) sospechoso de tener una infección de malaria. En algunas realizaciones, la muestra es un miembro seleccionado del grupo que consiste en sangre completa, suero, plasma, orina, esputo, fluido de lavado bronquial, lágrimas, aspirado de pezón, linfa, saliva, líquido cefalorraquídeo, tejido y combinaciones de los mismos. Preferentemente, la muestra es sangre completa.

La muestra se pone en contacto después con el medio de adsorción en condiciones para permitir que el adsorbente polisacárido en la superficie del sustrato sólido se una a un glóbulo rojo parasitado si está presente en la muestra, para formar un complejo adherente.

En algunos casos, después de la formación del complejo adherente, la muestra y el medio de adsorción se separan sin interrumpir o separar el complejo del medio.

La presencia del complejo adherente se detecta inspeccionando el color del medio de adsorción dentro del espectro de luz visible. (por ejemplo, longitud de onda de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 700 nm). En algunos casos, el color detectable está dentro del intervalo de longitud de onda de aproximadamente 625 nm a 740 nm, o el intervalo correspondiente al color rojo o variaciones del mismo. El color del medio de adsorción puede determinarse usando un detector óptico de luz visible o el ojo humano.

En ciertos casos, es posible concentrar el analito (por ejemplo, virus, patógeno, bacteria, citocina o complejo adherente) en el medio y detectar el analito mediante un cambio de color del medio. En una realización alternativa, es posible concentrar el analito a detectar eluyendo el analito de la columna, concentrando el analito y midiendo un cambio de color del medio. También son posibles otras formas de detección.

En algunos casos, el color del medio de adsorción de prueba se compara con un medio de adsorción de control. En algunos casos, el medio de control (por ejemplo, control negativo de infección) es un medio de adsorción que ha sido expuesto a una muestra tomada de un control sano, tal como un sujeto que no tiene una infección por malaria. En otros casos, el medio de control (por ejemplo, control positivo) es un medio de adsorción que ha sido expuesto a una muestra tomada de un sujeto que tiene una infección por malaria (por ejemplo, Infección por malaria grave o no complicada).

Si el medio de adsorción del sujeto de prueba tiene un color similar al del control sano, entonces el ensayo indica la ausencia del complejo adherente. Sin embargo, si el medio de adsorción del sujeto de prueba tiene un color similar al del control positivo, entonces el ensayo indica la presencia del complejo adherente y, por lo tanto, una infección por malaria.

Si se detecta la presencia del complejo adherente, al sujeto se le puede administrar una terapia antipalúdica. Los ejemplos no limitantes de una terapia antipalúdica incluyen cloroquina (Aralen), sulfato de quinina (Qualaquin), hidroxiclороquina (Plaquenil), atovacuona-proguanil (Malarone), arteméter-lumefantrina (Coartem), mefloquina (Lariam), primaquina, amodiaquina, quinina, quinidina, doxiciclina, clindamicina, sulfonamidas, tales como sulfadoxina y sulfametoxipiridazina, pirimetamina, halofantrina, artemisinina, derivados de artemisinina de las mismas y combinaciones de las mismas. Los derivados de artemisinina incluyen arteméter, artesunato, dihidroartemisinina, arteminol, artemotil y arteéter. Otros derivados de la artemisinina que son fármacos antipalúdicos adecuados se encuentran, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. No. 8.722.910; 8.481.757; 8.304.440; 7.851.512; 7.776.911; 7.084.132; 6.586.464; 6.362.219; y 6.306.896; y las publicaciones de solicitud de

patente de EE. UU. No. 2012/0258945, 2013/0072513, 2013/071474, 2014/011829, 2014/011830 y 2014/256761.

G. Los glóbulos rojos infectados pueden fijarse a las moléculas de unión de glóbulos rojos en la superficie del medio de adsorción

Los glóbulos rojos infectados pueden ser retenidos en la superficie de un medio de adsorción unido por un polisacárido tal como, pero sin limitación, sulfato de heparano, heparina, sulfato de condroitina y derivados de los mismos. Ejemplos no limitantes de agentes infecciosos, tales como virus y patógenos (por ejemplo, bacterias y parásitos) que pueden unirse al sulfato de heparano, heparina y análogos de los mismos incluyen bacterias, por ejemplo, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella pertusis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Hemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*, *Orientia tsutsugamushi*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y *Yersinia enterocolitica*, virus vaccinia, por ejemplo, virus de la viruela de las vacas, virus de la viruela del conejo, virus del mixoma y virus del fibroma de Shope, HIV-1, HPV, HTLV1, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis B, virus adenoasociados (AAV), adenovirus, coronavirus, coxsackievirus, citomegalovirus, herpesvirus por ejemplo, Herpesvirus Múrido 4 (MuHv-4), virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV), virus de Epstein-Barr (EBV), FMDV, virus del herpes simple, por ejemplo, HSV-1 y HSV-2, virus de la seudorrabia (PrV), virus de la seudorrabia, virus sincitial respiratorio, rinovirus, virus sidbis, flavivirus, por ejemplo, virus del dengue (dengue 1, 3, 4), virus de la encefalitis japonesa, virus kunjin, virus de la encefalitis del valle de Murray, virus powassan, virus de la encefalitis de San Luis, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus del Nilo Occidental, virus de la fiebre amarilla, pestivirus, por ejemplo, virus que causan enfermedades fronterizas, diarrea viral bovina, peste porcina clásica, virus de la fiebre hemorrágica, por ejemplo, virus del Ébola, virus de Marburg, virus de la fiebre de Lassa, virus del Valle del Rift, otros virus arenaviridae, otros virus bunyaviridae y otros virus filoviridae y parásitos, por ejemplo, *Giardia lamblia*, *Leishmania ssp.*, *Encephalitozoon spp.*, *Neospora caninum*, *Plasmodium ssp.*, *Toxoplasma gondii* y *Trypanosoma cruzi*.

H. Concentradores y kits

Se describe un concentrador en una forma que se asemeja a una jeringa hipodérmica. La figura 1 es una realización del concentrador de la presente invención. El concentrador 100 tiene un cilindro 118 lleno de medio de adsorción 105. En ciertos casos, el cilindro es una parte de cilindro cilíndrico hueco 118 con adsorbato contenido en su interior 105, con un extremo que termina en un tubo de salida 117 de un diámetro menor que el diámetro de la parte de cilindro cilíndrico 118. En algunos casos, una aguja hipodérmica hueca 112 se comunica con el tubo de salida 117 de la parte de cilindro 118. En algunos casos, uno o más adsorbentes polisacarídicos diferentes, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más adsorbentes polisacarídicos diferentes, están fijados al medio de adsorción. El concentrador 100 tiene un émbolo 130 con un eje 115 que permite al usuario extraer una muestra de un sujeto usando una aguja 112 que está fijada al concentrador 100. La aguja puede ser de diversos calibres, como es típico para la muestra que se extrae de un sujeto. En ciertos aspectos, el concentrador 100 tiene un depósito opcional 110 lleno de fluido tal como solución salina, agua o un tampón. En funcionamiento, la aguja se inserta en un sujeto para extraer una muestra tal como sangre. A medida que el émbolo 130 se retira del cilindro 118 usando el eje 115, una barrera rompible 108 entre el depósito 110 y el medio 105 se rompe por la acción del émbolo retirado, permitiendo que el fluido se extraiga a través del medio para humedecer o cebar el medio. El fluido (por ejemplo, solución salina) se extrae a través del medio 105 y termina en el área 121. En ciertos casos, el depósito opcional 110 comprende una junta o barrera rompible 108 tal como papel de aluminio, un adhesivo o plástico, dispuesta entre el tubo de salida y el adsorbato 105.

A medida que se extrae una muestra (por ejemplo, sangre) a través del medio, el analito o patógeno contenido en su interior se adhiere del medio. En ciertos casos, el émbolo retirado 115 puede ser empujado por el usuario hacia el cilindro del concentrador. En ciertos casos, la muestra, tal como la sangre extraída, puede inyectarse y devolverse al sujeto. Esta operación de ida y vuelta del émbolo puede repetirse varias veces para concentrar el analito/patógeno en el medio. La operación de retirar el émbolo hacia adelante y hacia atrás se puede repetir 1, 2, 3, 4, 5, 6 o incluso más veces.

El analito/patógeno se puede eliminar del medio usando los métodos enseñados en el presente documento. Por ejemplo, en ciertos casos, se puede usar solución salina normal para eliminar las células y restos adheridos. Posteriormente, se puede usar solución salina 2 N para eliminar el analito o el patógeno. En ciertos otros casos, se usa un tampón o solución salina para eliminar todos los componentes de muestra adheridos.

En otros casos más, se usa un filtro esterilizante que puede fijarse al exterior del concentrador 100. Por ejemplo, la aguja se puede quitar y el filtro se fija, o la aguja tiene un adaptador de filtro. El filtro permite que el concentrador sea adaptable para uso en el campo. Por ejemplo, en el campo, el agua o fluido estéril puede no estar disponible. En ciertos casos, se extrae agua o fluido impuro a través del filtro y, ahora, se esteriliza a través del medio 105. En ciertos casos, el depósito 110 se retira opcionalmente y el agua esterilizada o el fluido esterilizado extraído a través del filtro esterilizante ceba o humedece el medio.

Se desvela un kit que comprende un concentrador. En ciertos aspectos, el kit incluye un envase que se puede usar

para contener el concentrador antes y después de su uso. El concentrador puede usarse como se analizó anteriormente y después enviarse para su posterior análisis. El kit incluye opcionalmente instrucciones de uso.

En un caso, el concentrador comprende:

- 5 a) una parte de cilindro cilíndrico hueco 118 con adsorbato contenido en su interior 105, un extremo que termina en un tubo de salida 117 de un diámetro menor que el diámetro de la parte de cilindro cilíndrico 118;
- b) una aguja hipodérmica hueca 112 que se comunica con el tubo de salida 117 de dicha parte de cilindro 118;
- c) un émbolo 130 que comprende un material elastomérico dispuesto dentro y adaptado para el movimiento de vaivén dentro de dicho cilindro cilíndrico 118;
- 10 d) medios de eje 115 fijados a dicho émbolo 130 y que se extienden hacia el exterior del extremo de dicha parte de cilindro 118 opuesta al tubo de salida 117 y operativos para impartir movimiento de vaivén a dicho émbolo 130 hacia y lejos del tubo de salida de dicha parte de cilindro 118; y
- f) un depósito opcional 110 con una junta rompible 108, dispuesta entre el tubo de salida y el adsorbato.

III. Ejemplos

15 Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitar, la invención reivindicada.

Ejemplo 1: diagnóstico de malaria en individuos que usan un medio de adsorción conjugado con heparina

Este ejemplo ilustra el uso de un medio de adsorción conjugado con heparina para detectar glóbulos rojos parasitados (pRBC) en una muestra de sangre de un individuo sospechoso de tener una infección de malaria.

20 Se toma una muestra de sangre completa de un individuo mediante métodos estándar y siguiendo pautas clínicas. La muestra de sangre (muestra de prueba) se pone en contacto con heparina inmovilizada en la superficie de los medios de adsorción en condiciones para permitir que los glóbulos rojos parasitados en la muestra de prueba se fijen a la heparina inmovilizada. A continuación, la muestra no unida se elimina sin alterar el complejo adherente formado por los pRBC y la heparina en el medio de adsorción de prueba. El medio de prueba se observa a simple vista para detectar cualquier cambio de color en comparación con un medio de adsorción a sangre completa libre de glóbulos rojos parasitados. Si se detecta un cambio de color (por ejemplo, el medio de prueba aparece más rojo), esto indica que es probable que el individuo tenga una infección por malaria.

25 El color del medio de prueba se compara con el color de un medio de adsorción expuesto a una muestra de sangre de un control sano, tal como un individuo que no tiene una infección por malaria. Se diagnostica que el individuo no tiene una infección por malaria si el medio de adsorción de prueba y el medio de control sano tienen un color similar.

30 El color del medio de prueba se compara con el color de un medio de adsorción expuesto a una muestra de sangre de un control positivo, tal como un paciente con malaria no complicada o malaria grave. Al individuo se le diagnostica una infección por malaria si el medio de adsorción de prueba y el medio de control positivo tienen un color similar.

Ejemplo 2: un sistema para diagnosticar una infección vírica y tratar de forma extracorpórea la infección

35 Este ejemplo ilustra un sistema de la presente invención.

El sistema comprende al menos dos cartuchos, en el que el primer cartucho es un cartucho de diagnóstico más pequeño y el segundo cartucho es un cartucho terapéutico más grande. El primer cartucho de diagnóstico contiene una columna corta entre 3-6 ml, que se llena con perlas heparinizadas. El primer cartucho se usa para la detección de una muestra de sangre sospechosa de contener el virus de la hepatitis C (HCV).

40 Se obtiene una muestra de sangre de 2 ml del sujeto. La muestra de sangre se carga en la columna de diagnóstico y forma un complejo adherente que comprende el medio de adsorción y el HCV. Posteriormente, la columna se lava y con un tampón de lavado con solución salina 0,01 N. La columna se lava después aplicando un tampón de elución de solución salina 2 N al concentrado del patógeno infeccioso.

45 El ARN del HCV se detecta usando RT-PCR usando un kit estándar, tal como la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN) y RealTime HCV Genotype II (Abbott Molecular, Abbott Park, IL).

El segundo cartucho terapéutico más grande está construido con perlas recubiertas heparinizadas. Una columna de adsorción de 300 ml se fija a un soporte vertical. Los 300 ml de perlas se añaden al cartucho y se sellan.

El paciente usa la eliminación extracorpórea del HCV usando la columna terapéutica. Se produce la unión del virus

de la hepatitis C a la heparina. La heparina es efectiva para identificar y eliminar el agente infeccioso.

Ejemplo 3: procesamiento de una muestra de un individuo sospechoso de estar infectado con el virus del Ébola antes de detectar el virus

5 Este ejemplo ilustra el uso de una realización ejemplar de la presente invención para aislar partículas de virus del Ébola a partir de una muestra biológica de un sujeto infectado con el virus del Ébola.

10 Se hace circular una muestra de sangre completa infectada con Ébola sobre una columna llena de perlas heparinizadas. En diversos puntos temporales, el flujo de la columna se recoge y se pone a prueba para detectar la presencia de Ébola. Las perlas heparinizadas se lavan suavemente con una solución salina 0,01 N sin alterar la matriz de perlas. El flujo pasante de la etapa de lavado se recoge y se pone a prueba para detectar el Ébola. El flujo pasante contiene células tales como las células sanguíneas que pueden interferir en la sensibilidad de los ensayos comerciales de detección viral. Se aplica un tampón de elución que contiene solución salina 2 N a la columna y se recoge el eluyente. El eluyente se analiza para detectar la presencia de Ébola utilizando el protocolo ensayo del CDC "Ebola Virus VP40 Real-Time RT-PCR Assay". Este método usa un ensayo TaqMan® para detectar la proteína viral 40 del virus del Ébola.

15 Ejemplo 4: procesamiento y concentración de patógenos a partir de una muestra de sangre usando perlas modificadas con adsorbente polisacárido

Este ejemplo ilustra el uso de una realización ejemplar de la presente invención para eliminar y concentrar 14 patógenos diferentes de una muestra biológica.

20 Aproximadamente 0,6 gramos de medio de adsorción, tal como medio de heparina sola, medio de manosa sola, medio de polietilimina PEI, un compuesto de medios de heparina y manosa, o un compuesto de medios de heparina y manosa y perlas desnudas se cargaron en jeringas de filtro de 2,5 ml (Mobicol) con placas terminales de 100 µm. Se prepararon 2 ml de las suspensiones de patógenos en sangre cultivando los patógenos (por ejemplo, *P. aeruginosa*, MRSA, *K. pneumoniae* productora de ESBL, *K. pneumoniae* resistente a carbapenem, *K. pneumoniae*, *E. coli* resistente a carbapenem, *E. coli*, *S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *E. faecalis* resistente a vancomicina, *E. faecium*, *A. baumannii*, *C. albicans* y CMV) durante una noche y diluyendo a las concentraciones apropiadas (tabla 1). Las jeringas de filtro cargadas se enjuagaron con 3 ml de PBS, seguido de hacer pasar la suspensión de patógeno sobre las jeringas tres veces. Se hizo pasar 1,0 ml de tampón de elución (solución salina 2 N) sobre las jeringas y se recogió el flujo (eluyente). Se usaron técnicas estándar de dilución y placas para enumerar los patógenos del eluyente. La prueba se repitió dos o tres veces para cada combinación de medio y patógeno que se analizó. Los resultados se muestran en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Concentración de patógeno después del paso sobre medio de adsorción modificado

Recuento de patógenos (UFC/ml o UFP/ml)						
Bacterias	Concentración de partida	Concentración de finalización				
		Heparina	Manosa	PEI	Hep/Man (0,6 g)	Hep/Man/PEI (0,6 g)
<i>P. aeruginosa</i>	4,02E+05	5,27E+05	3,79E+05	4,73E+05	4,67E+05	2,75E+05
MRSA	1,21E+05	1,02E+04	1,22E+05	1,48E+04	2,03E+04	3,07E+03
<i>K. pneumoniae</i> (ESBL)	2,82E+05	1,72E+05	1,98E+05	1,80E+05		
<i>K. pneumoniae</i> (CRE)	1,40E+05	7,83E+01	1,70E+02	2,07E+02	2,07E+02	1,88E+02
<i>K. pneumoniae</i>	4,02E+05	2,55E+05	2,66E+05	1,64E+05		
<i>E. coli</i> (CRE)	2,57E+05	1,90E+02	2,25E+02	1,83E+02	2,00E+02	2,27E+02
<i>E. coli</i>	6,15E+05	1,54E+03	8,92E+02	1,01E+03		
<i>S. pneumoniae</i>	9,80E+04	4,60E+04	5,80E+04	7,48E+04		

<i>E. faecalis</i>	6,43E+05	6,17E+03	5,83E+03	3,34E+03		
<i>E. faecalis</i> (VRE)	6,17E+05	5,40E+04	5,42E+04	4,80E+04		
<i>E. faecium</i>	9,17E+05	4,00E+05	5,67E+05	5,33E+05		
<i>A. baumannii</i>	1,83E+05	3,82E+04	1,82E+04	8,50E+04		
<i>C. albicans</i>	3,35E+05	2,15E+05				
CMV	7,59E+04	1,35E+04				

Tabla 2. Cantidad de patógeno eliminada de una muestra de sangre

UFC o UFP eliminadas por gramo de medio					
	Heparina	Manosa	PEI	Hep/Man	Hep/Man/PEI
<i>P. aeruginosa</i>	0,00E+00	7,67E+04	0,00E+00	0,00E+00	4,23E+05
MRSA	3,69E+05	-3,33E+03	3,54E+05	3,36E+05	3,93E+05
<i>K. pneumoniae</i> (ESBL)	3,67E+05	2,80E+05	3,40E+05		
<i>K. pneumoniae</i> (CRE)	4,66E+05	4,66E+05	4,66E+05	4,66E+05	4,66E+05
<i>K. pneumoniae</i>	4,90E+05	4,53E+05	7,93E+05		
<i>E. coli</i> (CRE)	8,56E+05	8,56E+05	8,56E+05	8,56E+05	8,56E+05
<i>E. coli</i>	2,04E+06	2,05E+06	2,05E+06		
<i>S. pneumoniae</i>	1,73E+05	1,33E+05	7,73E+04		
<i>E. faecalis</i>	2,12E+06	2,12E+06	2,13E+06		
<i>E. faecalis</i> (VRE)	1,88E+06	1,88E+06	1,90E+06		
<i>E. faecium</i>	1,72E+06	1,17E+06	1,28E+06		
<i>A. baumannii</i>	4,83E+05	5,49E+05	3,27E+05		
<i>C. albicans</i>	4,00E+05	1,12E+06			
CMV	2,08E+05				

- 5 Las tablas anteriores ilustran la eliminación y concentración de 14 patógenos diferentes usando los métodos desvelados en el presente documento. Por ejemplo, como se muestra en la tabla 1, una muestra de MRSA tiene una concentración inicial de $1,21 \times 10^5$ UFC/ml. La tabla 1 muestra diversas eficiencias de los adsorbatos de la presente invención. Después de una pasada o pasadas repetidas sobre una columna con heparina, manosa, perla desnuda (PEI), una mezcla de heparina/manosa, o heparina/manosa y PEI, se midieron, registraron y tabularon las concentraciones finales de cada muestra.
- 10 Las muestras se hicieron pasar repetidamente sobre las columnas de forma iterativa. Las muestras se pueden hacer pasar varias veces cada vez, reduciendo las concentraciones de bacterias en la muestra y concentrando las bacterias o el patógeno en el medio.
- 15 Una cantidad significativa de patógeno se separa de la muestra usando el medio de adsorción. La tabla 2 es una tabla resumen que notifica la eliminación de patógenos usando diversos medios. Después de que el patógeno se concentra en la columna de medio, se puede liberar de la columna y se puede determinar su presencia e identidad. El patógeno puede concentrarse aplicando un volumen de tampón de elución que sea menor que el volumen de

muestra inicial. Además, el método se puede usar para eliminar células y restos de la muestra de sangre que pueden interferir en los métodos estándar de detección de patógenos, tales como ensayos colorimétricos, inmunoensayos, ELISA, ensayos basados en PCR y similares.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para concentrar patógenos infecciosos presentes en una muestra biológica obtenida de un sujeto que es sospechoso de estar infectado con dichos patógenos, comprendiendo el método:
- 5 (a) poner en contacto la muestra biológica obtenida previamente del sujeto con un medio de adsorción en condiciones para formar un complejo adherente que comprende el medio de adsorción y dichos patógenos, en el que el medio de adsorción es un sustrato sólido de área superficial elevada que tiene al menos un adsorbente polisacárido en la superficie del mismo;
- 10 (b) separar el complejo adherente de los componentes de la muestra que no están incluidos en el complejo mientras se mantiene el complejo;
- (c) lavar el complejo adherente con un tampón de lavado; y
- (d) recoger patógenos del complejo adherente aplicando un tampón de elución al complejo, concentrando así los patógenos infecciosos en un eluyente; o como alternativa,
- 15 (i) poner en contacto la muestra biológica obtenida de dicho sujeto con un medio de adsorción para formar un complejo adherente que comprende el medio de adsorción y un patógeno presente en la muestra, en el que el medio de adsorción es un sustrato sólido de área superficial elevada que tiene al menos un adsorbente polisacárido en la superficie del mismo; y
- (ii) determinar la presencia del complejo adherente detectando un cambio físico en el medio de adsorción; y
- 20 (iii) predecir que el sujeto está infectado por el patógeno infeccioso basándose en el cambio físico en el medio de adsorción en comparación con un medio de adsorción de referencia que se ha puesto en contacto con una muestra de control.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el tampón de lavado es una solución salina.
- 25 3. El método de la reivindicación 1, en el que el tampón de elución es una solución salina de alta fuerza iónica o hipertónica.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, suero, plasma, orina, heces, esputo, lágrimas, saliva, fluido de lavado bronquial, otro fluido corporal y combinaciones de los mismos.
- 30 5. El método de la reivindicación 1, en el que el al menos un adsorbente polisacárido está fijado a la superficie del sustrato sólido por fijación en el extremo.
- 35 6. El método de la reivindicación 1, en el que dicho sustrato sólido comprende una pluralidad de perlas de polímero rígidas.
7. El método de la reivindicación 6, en el que dicha pluralidad de perlas rígidas de polímero son perlas de polietileno rígidas.
- 40 8. El método de la reivindicación 5, en el que el al menos un adsorbente polisacárido es un miembro seleccionado del grupo que consiste en heparina, sulfato de heparano, manosa, sulfato de dextrano, ácido hialurónico, ácido salicílico, quitosano y una combinación de los mismos.
- 45 9. El método de la reivindicación 1, en el que dichos patógenos se seleccionan del grupo que consiste en

- 5 *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, virus del Ébola (EBOV), filovirus, Flaviviridae, *Streptococcus aureus*, *Escherichia coli*, bacterias *enterobacteriaceae* resistentes a carbapenem (CRE), un patógeno productor de ESBL, bacterias *enterococci* resistentes a vancomicina (VRE), *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Candida albicans*, citomegalovirus (CMV), adenovirus simple, virus del herpes simple 1 (HSV1), virus del herpes simple 2 (HSV2) y cualquier combinación de los mismos.
10. El método de la reivindicación 1, que comprende además detectar los patógenos infecciosos aislados.
- 10 11. Un concentrador para su uso de acuerdo con el método de la reivindicación 1 que comprende:
- (a) una parte de cilindro cilíndrico hueco con adsorbato contenido en su interior, un extremo que termina en un tubo de salida de un diámetro menor que el diámetro de la parte de cilindro cilíndrico, en el que el adsorbato es un medio de adsorción, que es un sustrato sólido de área superficial elevada que tiene al menos un adsorbente polisacarídico en la superficie del mismo;
- 15 (b) una aguja hipodérmica hueca que se comunica con el tubo de salida de dicha parte de cilindro;
- (c) un émbolo que comprende un material elastomérico dispuesto dentro y adaptado para movimiento de vaivén dentro de dicho cilindro cilíndrico;
- (d) medios de eje fijados a dicho émbolo y que se extienden hacia el exterior del extremo de dicha parte de cilindro opuesto al tubo de salida y operativos para impartir movimiento de vaivén a dicho émbolo hacia y lejos del tubo de salida de dicha parte de cilindro; y
- 20 (f) un depósito opcional con una junta rompible, dispuesta entre el tubo de salida y el adsorbato.
12. El método de la reivindicación 1, en el que las etapas (a) y (b) reducen las células sanguíneas de la muestra.
- 25 13. El método de la reivindicación 1, en el que el método comprende predecir si el sujeto tiene malaria basándose en el cambio físico en el medio de adsorción en comparación con un medio de adsorción de referencia que se ha puesto en contacto con una muestra de control.
14. Un kit, comprendiendo el kit:
- 30 un concentrador; y envase para antes y después del uso, en el que el concentrador comprende:
- (a) una parte de cilindro cilíndrico hueco con adsorbato contenido en su interior, un extremo que termina en un tubo de salida de un diámetro menor que el diámetro de la parte de cilindro cilíndrico, en el que el adsorbato es un medio de adsorción, que es un sustrato sólido de área superficial elevada que tiene al menos un adsorbente polisacarídico en la superficie del mismo;
- 35 (b) una aguja hipodérmica hueca que se comunica con el tubo de salida de dicha parte de cilindro;
- (c) un émbolo que comprende un material elastomérico dispuesto dentro y adaptado para movimiento de vaivén dentro de dicho cilindro cilíndrico;
- (d) medios de eje fijados a dicho émbolo y que se extienden hacia el exterior del extremo de dicha parte de cilindro opuesta al tubo de salida y operativos para impartir movimiento de vaivén a dicho émbolo hacia y lejos del tubo de salida de dicha parte de cilindro; y
- 40 (f) un depósito opcional con una junta rompible, dispuesta entre el tubo de salida y el adsorbato.

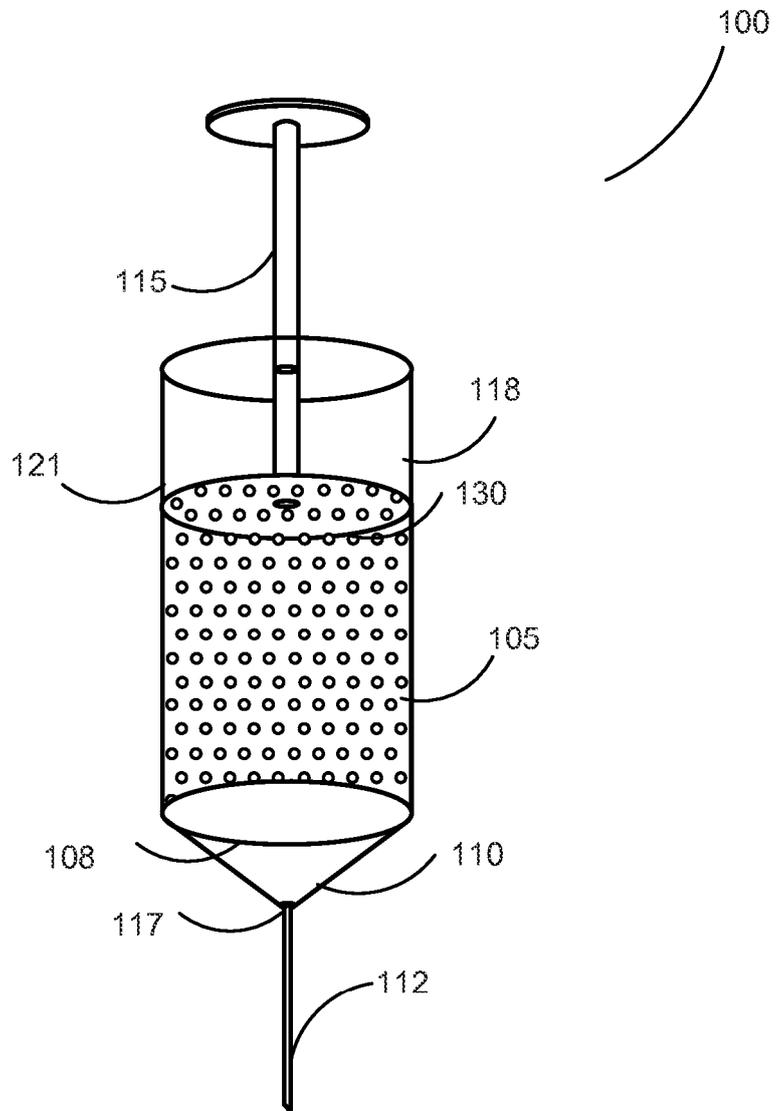


FIG. 1