

DETECCIÓN DE MALARIA

La presente invención se relaciona con dispositivos y métodos para la detección en una muestra de un material objetivo que tiene propiedades magnéticas, notablemente detección de hemozoína en sangre entera o tejidos como una indicación de infección por malaria.

El diagnóstico temprano y preciso de malaria es esencial para la gestión efectiva de la enfermedad y la vigilancia de la malaria. La falta de métodos de diagnóstico fáciles, asequibles y precisos ha llevado a la precaución común de "fiebre es igual a malaria a menos que se pruebe lo contrario". Esto conduce a una asunción excesiva de malaria, mala gestión de fiebres que no son de malaria, desperdicio de recursos limitados y contribuye a resistencia a los fármacos.

La detección y cuantificación precisa de infección por malaria por medio de examen microscópico de manchas de sangre gruesas y delgadas es altamente dependiente del entrenamiento y habilidad del operador; también requiere equipo y condiciones de trabajo que no siempre están disponibles, particularmente en entornos rurales. Las pruebas de diagnóstico rápido (RDT) basadas en reacciones de antígeno-anticuerpo requieren menos habilidad y equipo pero generalmente son costosas y carecen de suficiente sensibilidad para detección de malaria de nivel bajo. Otros sistemas de detección propuestos no se han encontrado adecuados en la práctica para uso generalizado en condiciones de campo. Por ejemplo, US 2012/0257199 A1 divulga la adsorción de β -hematina sobre la superficie de nanopartículas magnéticas en suspensión en una muestra y el uso de enriquecimiento de campo magnético en la muestra para incrementar la señal obtenida en la espectroscopía Raman mientras que WO 2008/056171 A2 divulga el uso de una señal absorbente diferencial a luz polarizada p y s de β -hematina en sangre sometida a un campo magnético de intensidades variables.

Por lo tanto, existe aún la necesidad de métodos y dispositivos mejorados para detectar la presencia de infección por malaria.

De conformidad con un aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar un material objetivo en una forma que tiene propiedades magnéticas en una muestra como se define en la reivindicación 1. Otros aspectos se definen en otras reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes definen modalidades preferidas o alternativas.

El material objetivo en una forma que tiene propiedades magnéticas puede ser un material magnético orgánico; puede ser hemozoína o β -hematina.

La hemozoína es un subproducto formado a partir de la digestión de sangre por parte de algunos parásitos que se alimentan de sangre. Estos organismos hematófagos como parásitos de malaria digieren hemoglobina y liberan altas cantidades de hemo libre, que es el componente no proteínico de la 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, de modo que los parásitos lo convierten en una forma cristalina insoluble llamada hemozoína. Debido a que, en etapas dadas del ciclo de los 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 etapas tempranas de la infección.

La β -hematina es un material sintético análogo a la hemozoína. La β -hematina exhibe propiedades similares a la hemozoína, incluyendo propiedades espectroscópicas y magnéticas, y se puede usar para simular el comportamiento de la hemozoína.

El método se puede usar para detectar o cuantificar, y/o es capaz de detectar o cuantificar, una concentración de hemozoína o β -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 $\leq 0.06 \mu\text{g mL}$ ó $\leq 0.05 \mu\text{g mL}$ y/o que está entre una de estas concentraciones y una concentración de $2 \mu\text{g mL}$ ó $2.5 \mu\text{g mL}$. La detección de una concentración de hemozoína de $0.12 \mu\text{g mL}$ permite una detección de parasitemia de 200 parásitos por μL (según lo recomendado por la Organización Mundial de la Salud) mientras que la detección de una concentración de hemozoína de $0.05 \mu\text{g mL}$ permite una detección de parasitemia de 80 parásitos por μL . Estos niveles de sensibilidad, particularmente los niveles inferiores, permiten la detección temprana de malaria facilitando en gran medida el tratamiento del paciente.

El volumen de la muestra usada para el análisis puede ser de $\leq 1 \text{ mL}$, preferiblemente $\leq 750 \mu\text{L}$, más preferiblemente $\leq 500 \mu\text{L}$, e incluso más preferiblemente $\leq 300 \mu\text{L}$. Así, sólo se necesita tomar una muestra muy pequeña de sangre de una persona a ser puesta a prueba. Particularmente en un sistema de microflujo, el volumen de la muestra usada para el análisis puede estar entre $10 \mu\text{L}$ y $50 \mu\text{L}$. La muestra para análisis se puede recolectar por medio de venopunción o pinchazo en el dedo. El volumen de sangre recolectado de un pinchazo de sangre puede ser suficiente para el análisis.

La duración del análisis de la muestra (por ejemplo, desde la inyección de la muestra hasta la recepción de los datos finales) puede ser de no más de 10 minutos, preferiblemente de no más de 8 minutos; más preferiblemente de no más de 6 minutos o no más de 5 minutos. Esto proporciona un resultado de una forma significativamente más rápida que la microscopía.

La muestra puede comprender una solución y/o suspensión de solvente acuoso u orgánico. La muestra puede comprender una matriz biológica o una solución y/o suspensión de solvente acuoso u orgánico derivado de una matriz biológica. La matriz biológica puede comprender fluidos, células, tejidos, extractos, lisados, células de cultivo procariotas o eucariotas, sobrenadantes y/o lisados, muestras de diálisis, muestras de microdiálisis. La muestra puede comprender fluidos o

tejidos 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 de biopsia, cabello, uñas.

5 Durante la maduración de la malaria, cuando existe una alta concentración de esquizontes en eritrocitos, existe una lisis natural de las células y la hemozoína se libera en la sangre al mismo tiempo que los esquizontes infectan los nuevos eritrocitos. Una ventaja de usar una muestra que comprende sangre entera (o sangre entera lisada) en lugar de eritrocitos separados o purificados es que esto permite el análisis de la hemozoína total presente, incluyendo (i) hemozoína que aún está dentro de eritrocitos; (ii) hemozoína que previamente se ha liberado de los eritrocitos; 10 y (iii) hemozoína que se ha incorporado, generalmente a altos niveles, en macrófagos, monocitos y leucocitos.

La muestra preferiblemente comprende sangre entera lisada. Cualquier solución de lisis usada preferiblemente tiene un pH neutral o es ligeramente ácida; esto evita la disolución de hemozoína o β -hematina en la muestra de sangre entera. Por ejemplo, una muestra de sangre 15 entera se puede lisar con una solución con pH regulado de Tris (pH 7), Triton 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 reguladores de pH hipotónicos de pH variable, preferiblemente ácido o neutral. La ADNasa 20 se puede agregar a las muestras (típicamente 10 a 100 $\mu\text{g/ml}$) junto con ARNasa (10 a 100 $\mu\text{g/ml}$) para reducir la viscosidad debida a la liberación de material de ácido nucleico. Los inhibidores de nucleasa y/o proteasa se pueden agregar a todas las muestras que se someten a lisis. Los métodos de lisado posibles incluyen: rompimiento mecánico, posiblemente usando perlas de cristal, homogenización líquida, congelación-descongelación, mortero; todos los métodos se pueden aplicar 25 con o sin sonicación. Preferiblemente, la muestra comprende sangre entera que se ha lisado usando una solución de lisis, es decir, se lisa químicamente, y que no se ha lisado mecánicamente; esto simplifica la preparación de la muestra.

Antes de la separación magnética del material objetivo de la muestra, la muestra se debe purificar. Tal purificación puede incluir filtrado, centrifugación, precipitación, fase directa, fase 30 reserva, iónica, hidrofílica, de afinidad, permeación en gel o cromatografía de exclusión de tamaños o electroforesis, todos combinables con extracción de líquido-líquido o fase sólida. Sin embargo, preferiblemente, tal purificación no se requiere ni se lleva a cabo.

La muestra a analizarse se puede introducir en un fluido portador que puede comprender agua, una solución orgánica, una solución acuosa, por ejemplo, una solución de cloruro 35 de sodio acuosa (NaCl) notablemente teniendo una concentración superior a o igual a

aproximadamente 0.3 %, 0.6 % ó 0.9 %. Preferiblemente el fluido portador es agua, notablemente agua purificada. Esto proporciona simplificación.

Después de la separación magnética, el material objetivo se puede recolectar para análisis por medio de un fluido recolector. El fluido recolector preferiblemente comprende un
 5 componente en el que el material objetivo separado se disuelve para proporcionar una solución analizable. El material objetivo disuelto preferiblemente está en una forma desmagnetizada, es decir, la disolución resulta en la pérdida de propiedades magnéticas. El fluido recolector 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 orgánicos,
 10 amoníaco, aminas orgánicas. Un fluido recolector preferido es solución de hidróxido de sodio. El fluido recolector puede tener una concentración que es mayor que o igual a 0.1 M y/o menor que o igual a 1 M; por ejemplo, se puede usar una solución de NaOH 0.4 M. Tales soluciones están fácilmente disponibles, requieren sólo precauciones estándar de laboratorio para usarse y tienen concentraciones que evitan el riesgo de crear precipitaciones de sales que podrían bloquear el
 15 aparato, notablemente porciones del aparato que tienen secciones transversales pequeñas, por ejemplo, cualquier válvula de cambio.

El portador y/o fluido recolector puede comprender uno o más aditivos, por ejemplo:

- antioxidantes, por ejemplo, tocoferoles, tocotrienoles, ácidos o sales ascórbico o eritórbico, antioxidantes sintéticos, incluyendo hidroxitolueno butilado e hidroxianisol butilado, o
 20 constituyentes fenólicos naturales, incluyendo flavanonas, flavonoles, monofenoles (timol, carvacrol, eugenol...) de aceites esenciales, ácidos cafeico y ferúlico, flavonoides y procianidinas de uva y vino tinto, ácidos diterpénicos de rosamarina, hidroxitirosol de aceite de oliva, productos de degradación de lignina y lignanos, reductonas que se pueden adaptar para reducir la corrosión de partes internas del dispositivo, notablemente microesferas metálicas cuando se usan; ácido cítrico, fosfórico o
 25 fumárico o quelatantes metálicos también se pueden agregar para potencializar el efecto antioxidante;

- agentes tensoactivos, por ejemplo, agentes tensoactivos combinados o no combinados no iónicos (cetomacrogol 1000, alcohol cetosteárico alcohol, alcohol cetílico, cocamida dea, cocamida mea, igepal ca-630, isocetet-20, lauril glucósido, monolaurina, etoxilato de intervalo
 30 estrecho, nonidet p-40, nonoxinol-9, nonoxinoles, np-40, octaetilen glicol monododecil éter, n-octil beta-d-tioglucopiranósido, octil glucósido, alcohol oleílico, pentaetilen glicol monododecil éter, poloxámero, poloxámero 407, poliglicerol polirricinoleato, polisorbato, polisorbato 20, polisorbato 80, saponinas, sorbitán monoestearato, sorbitán tristearato, alcohol estearílico, triton x-100), agentes tensoactivos catiónicos (cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, bronidox, bromuro de
 35 cetrimonio, cloruro de cetrimonio, cloruro de dimetildioctadecilamonio, cloruro de lauril metil glucet-

- 10 hidroxipropil dimonio, tetrametilamonio hidróxido) y/o agentes tensoactivos aniónicos (amonio lauril sulfato, dioctil sodio sulfosuccinato, ensayo mbas, ácido perfluorobutanossulfónico, ácido perfluorononanoico, ácido perfluorooctanosulfónico, ácido perfluorooctanoico, potasio lauril sulfato, saponinas, jabón, sustituto de jabón, sodio dodecil sulfato, sodio dodecilsulfonato, sodio lauret sulfato, sodio lauroil sarcosinato, sodio miret sulfato, sodio paret sulfato, sodio estearato), notablemente agentes tensoactivos adaptados para facilitar el enjuague de partes internas del dispositivo para reducir la contaminación que podría conducir a señales de análisis de parásitos con el paso del tiempo;
- 5 - co-pigmentos, por ejemplo, flavonoides, antocianinas, antocianósidos y/o derivados cinámicos, notablemente compuestos químicos que conducen a capacidad de detección potenciada de hemozoína por medio de asociación molecular;
- 10 - agentes antimicrobianos, por ejemplo, azidas, derivados de ácido benzoico, incluyendo hidroxilos, éteres, ésteres y/o sales, ácido sórbico, ácido acético, derivados de azufre, incluyendo sulfidas y sulfitos, derivados de nitrógeno, incluyendo nitritos y nitratos, sulfamidas, antibióticos, tiabendazol, notablemente agentes antimicrobianos capaces de prevenir adecuadamente el crecimiento de microorganismos en las soluciones;
- 15 - agentes de viscosidad, espesantes o gelificantes, por ejemplo, goma de acacia y derivados, mono-glicéridos acetilados, ésteres acetilados de ácido tartárico de mono- y di-glicéridos, agar, algina, ácido alginico, alginato de amonio, amonio carragenano, furcellerano de amonio, sal de amonio de glicérido fosforilado, arabino-galactano, glicano de levadura de panadero, alginato de calcio, carragenano de calcio, carboximetil celulosa, goma de algarroba, carragenano, goma de celulosa, gelatina, goma gelana, goma guar, goma arábica, lecitina hidroxilada, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metilcelulosa, musgo irlandés geloso, goma karaya, mono- y di-glicéridos lactilados, ésteres lácticos de ácidos grasos, lecitina, goma de algarroba, metilcelulosa, metil etil
- 20 celulosa, goma de avena, pectina, poliglicerol ésteres de ácidos grasos, poliglicerol ésteres de ácidos grasos de aceite de ricino interesterificado, polioxietileno (20) sorbitán monooleato (polisorbato 80), polioxietileno (20) sorbitán monoestearato (polisorbato 60), polioxietileno (20) sorbitán triestearato (polisorbato 65), polioxietileno (8) estearato, alginato de potasio, carragenano de potasio, alginato de propilenglicol, éter de propilenglicol de metilcelulosa, propilenglicol de ésteres de ácido mono
- 25 grasos, alginato de sodio, sodio aluminio fosfato, carboximetil celulosa de sodio, carragenano de sodio, celulosa glicolato de sodio, estearoil-2-lactilato de sodio, estearato de sodio, tartrato de sodio, tripolifosfato de sodio, monoestearato de sorbitán, trioleato de sorbitán, triestearato de sorbitán, citrato de estearil monogliceridil, ésteres de ácidos grasos de sacarosa, goma de tragacanto, goma xantana, notablemente compuestos químicos que conducen a viscosidad potenciada de las
- 30 soluciones.
- 35

La separación magnética del material objetivo de la muestra puede comprender separación en una columna de separación magnética, notablemente una columna de separación magnética que contiene partículas magnéticas o magnetizables, notablemente microesferas, por ejemplo, microesferas de acero o que contienen hierro. Las microesferas pueden tener un diámetro

5 que es $\geq 0.3 \text{ mm}$ ó $\geq 0.1 \text{ mm}$ y/o que es $\leq 1 \text{ mm}$ ó $\leq 2 \text{ mm}$. Tales tamaños de partícula evitan la necesidad de rejillas o filtros de retención finos para retener las partículas dentro de la columna que presentarían un riesgo de bloqueo, particularmente en donde la muestra comprende una suspensión.

La columna magnética se puede desensamblar y reensamblar fácilmente, por ejemplo, para facilitar el reemplazo de sus partículas magnetizables. Las partículas magnetizables se

10 pueden reemplazar periódicamente para mantener la eficiencia y/o precisión del dispositivo, por ejemplo, en casos de corrosión y/o acumulación de depósitos y/o contaminantes. El número de análisis llevados a cabo antes de reemplazar las partículas magnetizables puede ser ≥ 10 ó ≥ 15 ; puede ser ≤ 1000 .

La columna magnética puede tener un diámetro interno que es $\geq 0.5 \text{ mm}$ ó $\geq 1 \text{ mm}$

15 y/o que es $\leq 15 \text{ mm}$ ó $\leq 10 \text{ mm}$. La longitud de la columna puede ser $\geq 5 \text{ mm}$ ó $\geq 1 \text{ cm}$ y/o $\leq 12 \text{ cm}$ ó $\leq 10 \text{ cm}$. La columna preferiblemente está hecha de un material no magnético, por ejemplo, un material plástico como polipropileno.

Un campo magnético externo se puede aplicar a la columna de separación magnética, por ejemplo, por medio de uno o más imanes permanentes. La magnitud de un campo

20 magnético en la columna de separación puede ser $\geq 0.2 \text{ T}$ ó $\geq 1 \text{ T}$; puede ser $\leq 8 \text{ T}$ ó $\leq 10 \text{ T}$.

El sistema puede estar configurado como un sistema de microflujo. En consecuencia, el tamaño de la columna magnética, las microesferas, el campo magnético y la muestra a ponerse a prueba se pueden adaptar a un sistema de microflujo. Notablemente en este caso, las partículas magnéticas pueden ser nanopartículas o nanoesferas. Las partículas magnéticas pueden ser

25 microesferas como se describió anteriormente o, preferiblemente, microesferas de diámetro inferior. En ese caso, las microesferas pueden tener un diámetro que es $\geq 50 \text{ }\mu\text{m}$ ó $\geq 100 \text{ }\mu\text{m}$ y/o que es $\leq 500 \text{ }\mu\text{m}$ ó $\leq 400 \text{ }\mu\text{m}$ ó $\leq 300 \text{ }\mu\text{m}$. La columna magnética puede tener la forma de un depósito de microperlas, por ejemplo, proporcionado como parte de una celda de flujo integrada. La celda de flujo integrada puede comprender un depósito de microperlas en conexión fluida con una ventana

30 óptica.

La celda de flujo integrada puede ser de un tamaño similar a un portaobjetos de microscopio estándar. Puede tener las dimensiones de: longitud $\geq 30 \text{ mm}$ ó $\geq 45 \text{ mm}$ ó $\geq 60 \text{ mm}$ ó $\geq 70 \text{ mm}$ y/o $\leq 150 \text{ mm}$ ó $\leq 120 \text{ mm}$ ó $\leq 90 \text{ mm}$; y/o ancho $\geq 15 \text{ mm}$ ó $\geq 20 \text{ mm}$ y/o $\leq 60 \text{ mm}$ ó $\leq 45 \text{ mm}$ ó $\leq 30 \text{ mm}$; y/o grosor $\geq 1 \text{ mm}$ ó $\geq 2 \text{ mm}$ ó $\geq 4 \text{ mm}$ y/o $\leq 15 \text{ mm}$ ó $\leq 12 \text{ mm}$ ó ≤ 10

35 mm ó $\leq 8 \text{ mm}$. Los conductos conectores o vías entre elementos de la celda de flujo integrada

pueden tener un diámetro que es $\geq 20 \mu\text{m}$ ó $\geq 50 \mu\text{m}$ y/o que es $\leq 200 \mu\text{m}$ ó $\leq 150 \mu\text{m}$. La celda de flujo integrada puede ser sustancialmente plana; puede proporcionar un dispositivo de un solo uso o un dispositivo de usos múltiples, por ejemplo, adaptado para análisis de 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(metil metacrilato)) 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 una abertura de circuito en una cara, por ejemplo, siendo mecanizada, grabada o moldeada en una superficie; y una segunda porción, por ejemplo, una cubierta, que complementa la base, por ejemplo, sobreponiendo la base, por ejemplo, para sellar una cara abierta del circuito proporcionada sobre la primera porción. Un depósito de micropelotas del circuito de flujo se puede llenar con partículas magnetizables, por ejemplo, partículas de acero o nanopartículas, antes del ensamblaje de la celda de flujo posicionando y sellando la segunda porción sobre la primera porción. La celda de flujo se puede desensamblar y subsecuentemente reensamblar, por ejemplo, por medio de la remoción de la cubierta, para reemplazar las micropartículas magnetizables.

El análisis espectroscópico de la solución analizable para detectar el material objetivo disuelto puede comprender análisis óptico; puede comprender espectroscopía por absorción. La radiación emitida desde una fuente puede pasar a través de la solución analizable para dar una señal atenuada que se recibe por medio de un sensor. La fuente y el sensor se eligen para abarcar longitudes de onda en las que la presencia y preferiblemente la cantidad del material objetivo se puede detectar.

Preferiblemente se usa luz cuasi monocromática para el análisis espectroscópico, es decir, luz que tiene un ancho de banda estrecho, por ejemplo, que tiene al menos 80 % de su energía dentro de un ancho de banda de 80 nm, 50 nm, 20 nm ó 10 nm. Una fuente de luz y/o sensor cuasi monocromático se puede usar. En una modalidad preferida se usa un diodo cuasi monocromático que emite en una longitud de onda de aproximadamente 380 nm, aproximadamente 405 nm ó aproximadamente 620 nm. Alternativamente se puede usar luz monocromática. El espectro de absorción de hemozoina muestra varios picos (Figura 1). La hemozoina absorbe radiación fuertemente en longitudes de onda en el intervalo de 330 nm a 410 nm y en menor grado en longitudes de onda en el intervalo de 600 nm a 640 nm. La primera banda es interesante para sensibilidad, la segunda para especificidad. En consecuencia, el uso de una fuente de luz cuasi monocromática correspondiente permite el uso de disposiciones y aparatos robustos y simplificados que no obstante proporciona buena sensibilidad o selectividad. Por ejemplo, el diodo emisor puede ser un diodo de baja energía; se puede posicionar adyacente al flujo del fluido analizable sin requerir transmisión por medio de fibras ópticas. Una ventaja particular se puede lograr por medio de

detección de hemozoína en aproximadamente 380 nm, aproximadamente 405 nm o aproximadamente 620 nm usando una muestra de sangre entera lisada; esta combinación se puede usar para detectar de forma sensible hemozoína y/o para evitar señales no deseadas o de parásitos de la muestra que interfieran con o enmascaren la señal que indica hemozoína. El sensor de luz

5 puede ser un foto sensor que permite la detección en la longitud de onda seleccionada. En consecuencia, la o las longitudes de onda del análisis espectroscópico para detectar el material objetivo puede comprender:

longitudes de onda que son ≥ 300 nm ó ≥ 320 nm ó ≥ 340 nm ó ≥ 350 nm ó ≥ 360 nm y/o que son ≤ 440 nm ó ≤ 430 nm ó ≤ 420 nm ó ≤ 410 nm; ó

10 longitudes de onda que son ≥ 580 nm ó ≥ 590 nm ó ≥ 600 nm y/o que son ≤ 650 nm ó ≤ 640 nm ó ≤ 630 nm.

Un emisor monocromático o cuasi monocromático centrado sobre una longitud de onda dentro de lo anterior se puede usar.

La trayectoria de la radiación usada en el análisis espectroscópico a través de la

15 solución analizable preferiblemente se elige para ser ≥ 3 mm, ≥ 20 mm, ≥ 30 mm ó ≥ 40 mm; esto ayuda a mejorar la sensibilidad de detección. La radiación puede pasar a lo largo de una porción de la trayectoria de flujo de la solución analizable, por ejemplo, disponiendo una porción "Z" en la trayectoria de flujo y pasando la radiación a través de la porción más larga de la "Z".

El método puede comprender:

20 - una primera fase de separación en la que el material objetivo se separa de manera magnética de la muestra, por ejemplo pasando la muestra a través de un separador magnético y retener la forma magnética del material objetivo dentro del separador; y/o una segunda fase de análisis en la que se retira el material objetivo del separador magnético, por ejemplo mediante disolución y elución en una solución, para proporcionar una solución analizable;

25 y/o

- una tercera fase de enjuagado, en la que el separador magnético se enjuaga en preparación para su uso subsiguiente.

De preferencia, el análisis espectroscópico se lleva a cabo en una solución de análisis que comprende el material objetivo en solución.

30 La mezcla a analizarse puede introducirse en la ruta de flujo de un fluido portador, por ejemplo mediante inyección, de manera notable una entrada, por ejemplo a través de una válvula de inyección o tabique. Esto facilita la introducción de la muestra en el dispositivo sin requerir una interrupción en su operación o un desarmado.

Las modalidades de la invención ahora serán descritas, tan solo a modo de ejemplo,

35 con referencia a los dibujos que la acompañan en las que:

la Figura 1 es una espectro de absorción UV-visible de la hemozoina;

la Figura 2 es una modalidad representativa esquemática de un dispositivo analítico;

la Figura 3 es un cromatograma obtenido mediante el programa Pclab2000 a partir de una muestra sanguínea entera lisada que contiene β -hematina; y

5 la Figura 4 es un cromatograma obtenido mediante el programa Pclab2000 a partir de una muestra sanguínea entera lisada contaminada con malaria.

la Figura 5 es una vista plana esquemática de un sistema microfluídico en la forma de una celda de flujo integrada.

El dispositivo analítico de la Figura 2 comprende:

10 1 y 2: bomba de jeringa doble de KR Analítica equipada con una primera jeringa 1 que contiene agua utilizada como un fluido portador y una segunda jeringa 2 que contiene una solución de 0.4 M de hidróxido de sodio (NaOH) utilizada como un fluido recolector, solvente y eluyente, la bomba de jeringa se establece para crear un flujo constante de 0.5 mL/ min desde cada una de las jeringas;

15 3: tubo de conexión entre la jeringa 1 y una válvula de conmutación;

4: tubo de conexión entre la jeringa 2 y la válvula de conmutación;

5: tabique de entrada para inyectar la muestra;

6: válvula de conmutación de Rheodyne TitanMX;

7: tubo de conexión desde la válvula de conmutación a la salida de deshechos;

20 8: tubo de conexión entre la válvula de conmutación y la columna;

9: columna de separación magnética que comprende una columna de polipropileno que tiene una longitud de aproximadamente 60 mm y un diámetro interno de aproximadamente 4 mm que contiene aproximadamente 4 g de microesferas de acero que tienen un diámetro de aproximadamente 0.5 mm);

25 10: imanes permanentes (imanes MidiMACS de Miltenyi Biotec) que generan un campo magnético que tiene una magnitud de aproximadamente 0.65 T;

11: tubo de conexión entre la columna y la celda de flujo;

12: diodo emisor de luz cuasi-monocromática (405 nm) utilizado como una fuente de luz;

30 13: celda de flujo ("SMA Z-cell" de Ocean Optics que incluyen ventanas de sílice UV-visible para longitudes de onda mayores a 210 nm);

14: tubo de conexión desde la celda de flujo a la salida de deshechos;

15: sensor de luz;

16: amplificador de señal y voltímetro

35 Se llevó a cabo síntesis de β -hematina de conformidad con un método adaptado

descrito en "An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment" (AFG Slater *et al*, 1991 , Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, Vol. 88, pp. 325-329). Una solución estándar de 45.4 mM de hematina se preparó disolviendo 0.592 g de hemina porcina con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) para obtener una solución de 20 mL de dicha solución. Se diluyeron 10 mL de la solución estándar con 90 mL de agua para obtener 100 mL de una solución de 4.54 mM de hematina, después se le agregó 2 % de ácido propiónico para obtener un medio de reacción con un pH de 4. Se permitió que la mezcla reaccione a 70 °C en un baño termostatzado en un recipiente cerrado durante 18 h antes de ser filtrada. El residuo de la filtración se recolectó y secó en un horno a 37 °C durante 24 h. Los cristales de β -hematina se mantienen entonces en un refrigerador a 4 °C.

Para estimular la detección de malaria, (cristales de hemozina) en una muestra sanguínea humana entera, una muestra a probarse se preparó como una suspensión de β -hematina en una muestra sanguínea entera no contaminada. Antes de su análisis, la muestra sanguínea entera se lisó con una solución de Tritón X-100 y saponina tri-regulada de pH (pH 7). La solución de lisis se preparó siguiendo un protocolo adaptado 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). Primero se prepararon 100 mL de una solución tri-regulada de pH. Después de disolver 12.11 g de tri(hidroximetil)aminometano en 60 mL de agua y agregar HCl (ácido clorhídrico) para obtener una solución con un pH de 7, de manera subsiguiente se agregó agua para obtener 100 mL de la solución tri-regulada de pH. Se obtuvieron 100 mL de la solución de lisis se obtuvieron agregando el volumen necesario de solución tri-regulada de pH a 10 mg de saponina y 1 mL de Triton X-100. Esta solución de lisis se mantuvo en un refrigerador a 4 °C y se usa dentro de 7 días. El lisado de la muestra sanguínea entera se llevó a cabo mediante una dilución de 1/2 con la solución de lisis y un tiempo de reacción de 30 minutos.

Al principio de una primera fase de separación, el dispositivo se estabiliza con la válvula de conmutación (6) establecido de manera que el fluido portador desde la jeringa (1) se dirige a la ruta de flujo a través de la columna magnética (9) y el fluido recolector de la jeringa (2) se envía desde la válvula de conmutación (6) a la salida de desechos.

Se inyectan 300 μ L de una muestra sanguínea entera que contiene β -hematina dentro del tabique (5). Dado que la muestra es una suspensión, debe agitarse justo antes de la inyección para asegurarse que la muestra inyectada sea homogénea. Durante la primera fase, que dura aproximadamente 2 ½ minutos, el agua de la jeringa (1) pasa a través del tubo de conexión (3) y porta la muestra inyectada a través de la válvula de conmutación (6) y a través del tubo de conexión (8) a la entrada de la columna magnética. A medida que la muestra transportada por el fluido portador pasa sobre las microesferas de acero magnetizado en la columna, los cristales de β -hematina magnéticos en la muestra son atraídos hacia y retenidos por las microesferas

magnetizadas.

Al final de la fase de separación, el dispositivo se conmuta a una segunda fase de análisis, que tiene una duración de aproximadamente 2 ½ minutos. En la fase de análisis, la válvula de conmutación (6) se conmuta de manera que el fluido portador desde la jeringa (1) se envía desde el conmutador (6) a la salida de deshechos y la solución recolectora de la jeringa (2) se dirige por el conmutador (6) a través del tubo de conexión (8) a la entrada de la columna de separación (9). La solución recolectora se selecciona de manera que, a medida que pasa sobre las microesferas, recolecta y elude los cristales de β -hematina retenidos por las microesferas durante la fase de separación para proporcionar una solución analizable que, en esta modalidad, comprende los cristales de β -hematina disueltos en la solución recolectora de hidróxido de sodio.

La salida de la columna de separación se conecta mediante un tubo de conexión (11) a una celda de flujo (13) en donde una luz emitida de 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 cae en un sensor de luz (15). La absorción de luz detectada en la señal de luz atenuada proporciona una indicación de la presencia y cantidad de la β -hematina disuelta o cristales de hemozoina de la muestra. Una salida del sensor de luz (15) se conecta a un amplificador de señales y voltímetro (16) y se conecta de manera subsiguiente a una computadora configurada para procesar y visualizar la señal.

La salida de fluidos desde la celda de flujo (13) se envía a través de un tubo de conexión (14) a una salida de deshechos.

Al final de la fase de análisis el dispositivo se conmuta a una tercera fase de enjuague durante la cual la válvula de conmutación (6) dirige el fluido recolector de la jeringa (2) a la salida de deshechos y dirige el fluido portador de la jeringa a través del tubo de conexión (8) a la columna de separación (9).

La Figura 3 es un cromatograma obtenido mediante el programa pcLab2000 a partir de una muestra sanguínea entera lisada que contiene β -hematina que muestra amplitud de señal (en voltios en el eje y) como una función de tiempo (en segundos en el eje x). La flecha (18) indica cuando la válvula de conmutación conmuta para pasar de la fase de separación a la fase de análisis. El pico (19) corresponde a la detección de β -hematina en la solución de análisis. El área superficial de este pico (19) se correlaciona a la concentración de β -hematina en la muestra.

La Figura 4 es un cromatograma obtenido mediante el programa PcLab2000 a partir de una muestra sanguínea entera lisada contaminada con malaria analizada utilizando el procedimiento descrito anteriormente.

Para determinar la cantidad de hemozoina (o β -hematina) en la muestra, puede elaborarse una curva de calibración preliminar, utilizando de manera notable muestras de calibración

que contienen cantidades de β -hematina. Por ejemplo, la curva de calibración indica la concentración de hemozoina como una función de área superficial bajo la señal pico que corresponde a la hemozoina (que puede determinarse utilizando el software Graph Pad) o, en una alternativa simplificada pero menos precisa, como una función de la máxima intensidad de la señal pico que corresponde a la hemozoina en la señal de absorción.

La simplicidad y robustez del dispositivo facilita el uso en situaciones de campo. También es ventajosa la rapidez de obtener un resultado confiable con un alto nivel de sensibilidad que no depende de manera significativa de la habilidad del operador.

La Figura 5 es una representación esquemática de un sistema de microflujo en forma de una celda de flujo integrada 26 que tiene una longitud de 76 mm y un ancho de 26 mm que comprende:

- 20: una entrada para el fluido portador
- 21: una entrada para el fluido recolector
- 22: una entrada para la muestra
- 23: una reserva de micro-perlas
- 24: una ventana óptica
- 25: una salida / salida de desechos

y que comprende el depósito de micro-perlas y la ventana óptica en la forma de una celda o chip de flujo plano. La celda de flujo plano se adapta para usarse con por lo menos (i) su depósito de micro-perlas dispuestas sobre un imán permanente o intercalado entre un par de imanes permanentes planos; y (ii) con un emisor de luz dispuesto en la ventana óptica. La geometría de imanes y su posicionamiento puede modificarse para asegurar un campo magnético adecuado. Los pasadizos o conductos conectados 27 que van a) de las entradas del fluido portador, el fluido recolector y la muestra a una entrada del depósito de micro-perlas b) de una salida del depósito de micro-perlas a una entrada de la ventana óptica y c) de una salida de la ventana óptica a la salida/salida de desechos; tienen un diámetro de 100 μm . El depósito de micro-perlas contiene micropartículas de acero magnetizable que tiene un diámetro de 200 μm .

El fluido portador y el fluido recolector se proporcionan a partir de contenedores externos y se bombean a través del flujo de celda, por ejemplo utilizando una bomba peristáltica para cada fluido. EL uso de bombas peristálticas que comprenden válvulas de un solo sentido evita la necesidad de circulación de fluido continuo y una válvula de conmutación (6) con una salida de desechos (7) intermedia tal como se describe para el dispositivo analítico de la Figura 2. La muestra a analizarse puede introducirse mediante una micropipeta, por ejemplo una micropipeta Eppendorf®, o un capilar de vidrio.

El dispositivo puede proporcionarse como un kit que comprende: una o más celdas

de flujo 26 llenas de las micropartículas magnéticas, imán(es) externo(s), de manera notable imanes permanentes, bombas peristálticas, un emisor de luz y sensor de luz asociado, equipo de procesamiento y una pantalla de interfaz para presentar los resultados, de preferencia una interfaz de pantalla táctil.

- 5 El sistema de microflujo proporciona un sistema de análisis particularmente compacto, barato y rápido adecuado para su uso en el campo con muestras de bajo volumen.