



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 360 801**

(51) Int. Cl.:
B01L 3/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05723380 .1**

(96) Fecha de presentación : **18.02.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1748845**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **07.02.2007**

(54) Título: **Dispositivos y métodos para la recogida, almacenamiento y transporte de muestras biológicas.**

(30) Prioridad: **09.04.2004 US 561037 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.06.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.06.2011

(73) Titular/es: **VIVEBIO, L.L.C.**
1384 Buford Business Boulevard Suite 600
Buford, Georgia 30518-9206, US

(72) Inventor/es: **Lloyd, Robert, M., Jr.;**
Burns, Darrell, A. y
Huong, Joe, T.

(74) Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 360 801 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

Dispositivos y métodos para la recogida, almacenamiento y transporte de muestras biológicas

CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 5 Esta invención se refiere generalmente a dispositivos y métodos para la recogida, almacenamiento y transporte de una suspensión líquida de muestras biológicas que contienen analitos de interés en estado seco. La invención proporciona además métodos para recuperar las muestras biológicas que contienen analitos de interés para el análisis de investigación en el laboratorio y pruebas de ensayo clínico subsiguientes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 10 Las muestras biológicas a menudo se recogen, se transportan y se almacenan para el análisis de los niveles y concentraciones de diversos analitos contenidos en ellas. Convencionalmente, las suspensiones líquidas de muestras biológicas se almacenan bajo refrigeración en tubos cerrados herméticamente estancos al aire. La recogida, manipulación, transporte y almacenamiento de muestras líquidas tiene muchos problemas asociados con ellas, por ejemplo: el coste de la refrigeración (típicamente mediante hielo seco) en centros de recogida remotos; el riesgo de ruptura o fuga del recipiente, lo que provoca pérdida de muestra y el peligro de infección; la inestabilidad de las muestras durante el envío y almacenamiento; la negativa de los transportistas a aceptar envíos de materiales líquidos biológicamente peligrosos; y la recogida del volumen adecuado de las muestras para asegurar cantidades compatibles con métodos de laboratorio de análisis subsiguientes. Los costes para tratar los problemas anteriores son sustanciales.

- 20 La toma de muestras de mancha de sangre seca (DBS) y de mancha de plasma seco (DPS) sobre papel de filtro son métodos alternativos a los procedimientos de toma de muestras líquidos, y se han usado a nivel mundial con cierto éxito. Desde la década de 1980, los fabricantes tales como Schleicher y Schuell Corp., Bio-Rad, Boehringer Mannheim Corp., y Whatman, Inc., han estado produciendo papeles de filtro para toma de muestras de DBS y DPS. Durante el uso de estos sistemas de papeles de filtro para la toma de muestras biológicas comercialmente disponibles, se coloca una mancha de sangre de plasma en una o más áreas designadas del papel de filtro, se deja secar, y después se envía sólo con un formulario de petición de ensayo al laboratorio. Los papeles de filtro usados habitualmente son conocidos por los expertos normales en la técnica, tales como Whatman 3 MM, GF/CM30, GF/QA30, S&S 903, GB002, GB003, o GB004. Existen varias categorías de materiales de transferencia para la recogida de muestras de sangre, por ejemplo el papel de filtro de celulosa S&S 903 (derivado de madera o algodón) y el papel de filtro de fibra de vidrio Whatman. Sin embargo, se han asociado ciertas desventajas con estos papeles de filtro comercialmente disponibles. Específicamente, algunos de estos materiales comercialmente disponibles y usados normalmente carecen de características que proporcionan valores de precisión y exactitud que son preferidas para llevar a cabo ciertos ensayos biológicos.

- 35 El material genético se puede extraer y aislar a partir de los DBS en cantidades suficientes para uso en análisis genético. Por ejemplo, DBS se ha usado para la detección de la infección del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) humano mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Cassol, et al., J. Clin. Microbiol. 30 (12): 3039-42, 1992). DPS y DBS también se han usado para la detección y cuantificación de ARN del VIH (Cassol, et al., J. Clin. Microbiol. 35: 2795-2801, 1997; Fiscus, et al., J. Clin. Microbiol. 36: 258-60, 1998; O'Shea, et al., AIDS 13: 630-1, 1999; Biggar, et al., J. Infec. Dis. 180 1838-43, 1999; Brambilla, et al., J. Clin. Microbiol. 41 (5): 1888-93, 2003); para la detección y cuantificación de ADN del VIH (Panteleefe, et al., J. Clin. Microbiol. 37: 350-3, 1999; Nyambi, et al., J. Clin. Microbiol. 32: 2858-60, 1994); y para la detección de anticuerpos del VIH (Evengard, et al., AIDS 3: 591-5, 1989; Gwinn, et al., JAMA 265: 1704-08, 1991). También se da a conocer la detección y genotipado de ARN del VHC usando DBS (Solmone et al., J. Clin. Microbio. 40 (9): 3512-14, 2002). Aunque se obtiene una buena correlación con títulos usando DPS o DBS en comparación con muestras de plasma líquidas convencionales, después del almacenamiento a temperatura ambiente se puede producir una pérdida de títulos víricos (Cassol, et al., J. Clin. Microbiol. 35: 2795-2801, 1997; Fiscus, et al., J. Clin. Microbiol. 36: 258-60, 1998). Las muestras de DBS y DPS son claramente más baratas y menos peligrosas de transportar que las muestras líquidas.

- 50 Sin embargo, el procedimiento de la microextracción del analito a partir de DBS y DPS sobre papel de filtro tiene un número de desventajas. Por ejemplo, la microextracción de suficiente ADN o ARN a partir de papel de filtro implica la reconstitución en un medio líquido en ciertos procedimientos vigorosos, por ejemplo agitación en torbellino y centrifugación, que dañan los analitos genéticos de interés. Además, las fibras y otros componentes de los filtros se desprenden en la disolución de reconstitución, y se requiere una separación adicional por centrifugación y/o esto puede impedir la capacidad de aislar el material genético, tal como bloqueando el material genético para que no se adhiera a una columna de separación. Tales procedimientos previos de microextracción requieren un nivel elevado de asistencia técnica, e incluso así no proporcionan consistentemente resultados con un nivel deseado de sensibilidad y especificidad.

Además, el volumen de muestras usado para DBS y DPS sobre papel de filtro es limitado, típicamente a manchas de 50 µl, y se puede encontrar una dificultad considerable en la detección del analito, particularmente cuando la

concentración del material analito deseado es baja en la muestra. También en la técnica anterior hay una falta de inhibición deliberada de enzimas y productos químicos que degradan los analitos, tal como el material genético contenido en ellos. Incluso en presencia de un agente bacteriostático, existen condiciones que permiten la ruptura enzimática, no enzimática y autolítica del material genético. Además, la microextracción de material genético a partir de DBS o DPS sobre papeles de filtro es considerablemente más difícil si se requiere la absorción de ADN o ARN de peso molecular elevado.

El documento GB 2.383.955 describe un dispositivo de toma de muestras diseñado específicamente para recoger y secar una muestra celular. En particular, se emplea un medio de recogida, por ejemplo un cepillo, de un material capaz de recoger una muestra celular a partir de una cavidad corporal apropiada. Además, el dispositivo comprende un medio para secar la muestra celular recogida y mantenerla seca.

El documento WO 94/04078 proporciona un dispositivo de recogida de fluido oral, que comprende una almohadilla absorbente, que permite la liberación de dicho fluido oral por medio de un cilindro y una jeringuilla.

Aunque la introducción de nuevo material y métodos de transporte mejora continuamente la manera en la que las muestras son manipuladas, todavía los investigadores e igualmente los médicos están enormemente preocupados sobre la cantidad y calidad de la muestra disponible para el análisis subsiguiente.

De este modo, existe la necesidad de un dispositivo seguro, conveniente y simple para la recogida, almacenamiento y transporte de una suspensión líquida de muestras biológicas que contienen analitos de interés en un estado seco, especialmente en grandes estudios de campo y para la aplicación en marcos en los que la recogida, centrifugación, almacenamiento y envío pueden ser difíciles, como a menudo es el caso en países en desarrollo. Además, existe la necesidad de una recuperación mejorada de las muestras biológicas para el análisis subsiguiente que proporcione valores de precisión y exactitud de detección de los analitos de interés contenidos en ellas.

SUMARIO DE LA INVENCION

Esta invención satisface en parte la necesidad de proporcionar un dispositivo seguro, conveniente y simple y un método para la recogida, almacenamiento y transporte de una suspensión líquida de muestras biológicas que contienen analitos de interés. La invención también satisface en parte la necesidad de recuperar muestras biológicas que contienen analitos de interés para el análisis subsiguiente que proporcionen una sensibilidad y especificidad de detección más deseables. Más particularmente, la presente invención proporciona una nueva tecnología de muestra seca y un medio de transporte para la recogida y transporte de una suspensión líquida de muestras biológicas en un estado seco para uso en investigación y en pruebas clínicas validadas en el sitio.

La presente invención proporciona una tecnología que permite el ensayo biológico de muestras de fluidos corporales secadas al aire sin la necesidad del envío y almacenamiento refrigerado o congelado. La presente invención también proporciona una tecnología que tiene una capacidad de reducir significativamente los costes del envío a nivel mundial de materiales infecciosos, especialmente aquellos asociados con grandes ensayos clínicos. Además, la presente invención proporciona una tecnología que es aplicable a e incluye un amplio intervalo de pruebas clínicas estándares e inusuales.

La presente invención se refiere a un dispositivo para recoger, almacenar o transportar una muestra biológica, comprendiendo dicho dispositivo:

(a) un recipiente que define un espacio interior que tiene paredes laterales, un fondo y una tapa que se puede abrir que tiene una extensión de tapa para montar una matriz sobre ella;

(b) una matriz montada de forma retirable en la extensión de la tapa del recipiente, en el que la matriz se puede comprimir en al menos 20% de su volumen saturado y puede absorber un volumen de al menos 0,1 ml de una suspensión líquida que comprende la muestra biológica,

(c) un secante dentro del recipiente, separado de la matriz por una barrera permeable al aire y en comunicación vaporosa con dicha matriz, y

(d) un indicador colorimétrico del contenido de agua en el secante.

La presente invención describe un dispositivo para recoger, almacenar o transportar una muestra biológica que contiene analitos de interés. Más particularmente, el dispositivo comprende un recipiente que define un espacio interior que tiene paredes laterales, un fondo y una tapa, que se puede abrir. En una realización preferida, la invención proporciona un recipiente que tiene una tapa roscada. El dispositivo comprende además una matriz dentro del recipiente. La matriz absorbe al menos 0,1 ml de una suspensión líquida de muestras biológicas, y es capaz de ser comprimida en al menos 50% del volumen de la matriz para liberar una porción de la muestra biológica. En ciertas realizaciones, el dispositivo también tiene un secante dentro del recipiente, en comunicación vaporosa con la matriz, para secar la suspensión líquida.

En otra realización preferida, la invención incluye una matriz sólida seca para el almacenamiento de una suspensión líquida de muestras biológicas que absorbe al menos 0,5 ml de la suspensión líquida. En todavía otra realización preferida, la matriz absorbe 1 ml de la suspensión líquida de muestras biológicas.

Según otras realizaciones de la presente invención, la matriz es compresible en al menos 50% del volumen de la matriz saturada líquida, para liberar una porción de la suspensión líquida de muestra biológica almacenada en ella. En otras realizaciones, la matriz se comprime en al menos 75% del volumen de la matriz, para liberar una porción de la suspensión líquida de la muestra biológica almacenada en la matriz. En realizaciones preferidas, la matriz es porosa y tridimensional en una variedad de diferentes formas. Preferiblemente, la forma de la matriz es un cilindro, cubo, esfera, pirámide, cono, u otras formas adecuadas para la absorción y ajuste dentro de un recipiente. En una de las realizaciones preferidas, la matriz tiene forma de cilindro de alrededor de 20 mm de longitud y 8 mm de diámetro.

La invención también proporciona el hecho de que la matriz está hecha de un material absorbente. El material absorbente incluye, pero no se limita a, fibras de acetato de celulosa, celulosa derivada de madera o algodón, nitrocelulosa, carboximetilcelulosa, polímeros hidrófilos que incluyen polipropileno, poliéster, poliamida, polímeros de hidratos de carbono, politetrafluoroetileno, fibra de vidrio, nylon, y sus combinaciones.

La invención también proporciona el hecho de que el dispositivo incluye una matriz que se puede retirar del recipiente. En realizaciones preferidas, la matriz se monta de forma retirable en un soporte en la tapa de un recipiente. En una de las realizaciones preferidas, la matriz se monta de forma retirable en una extensión de una tapa de rosca que se une a las roscas del tubo recipiente.

Según la invención, los analitos de interés incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, células completas, fragmentos celulares, virus completo o fragmentos víricos. En realizaciones preferidas, los analitos de interés son ácidos nucleicos que incluyen cualquiera de moléculas de ADN y ARN, o ambas. Según la invención, las muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a, sangre completa, plasma, orina, saliva, esputo, semen, lavado vaginal, médula ósea, fluido cerebroespinal, otros líquidos corporales fisiológicos o patológicos, o cualquiera de las combinaciones de los mismos. Preferiblemente, la muestra biológica es fluido corporal humano; más preferiblemente, la muestra biológica es sangre completa; más preferiblemente, los analitos son ácidos nucleicos que incluyen moléculas de ADN y ARN o ambas. En una de las realizaciones preferidas, los analitos de interés son ácidos nucleicos, y las muestras biológicas comprenden al menos 500 ng a 1 µg de moléculas de ADN o ARN o ambas. En todavía otra realización preferida, la muestra biológica está contenida en una suspensión líquida. Según la presente invención, la suspensión líquida incluye, pero no se limita a, suspensión celular, extractos líquidos, homogenados tisulares, medios procedentes de la síntesis de ADN o ARN, disolución salina, o cualesquiera combinaciones de los mismos.

La invención proporciona además el hecho de que el dispositivo incluya un secante dentro del recipiente, en comunicación vaporosa con la matriz, para mantener seca la suspensión líquida. En realizaciones preferidas, el secante es arcilla montmorillonítica, cloruro de litio, alúmina activada, aluminosilicato alcalino, Briquetas DQ11, gel de sílice, tamiz molecular, sulfato de calcio, u óxido de calcio. En realizaciones preferidas, el secante indica su contenido de humedad por medios colorimétricos.

La invención se refiere además a un método para recoger, almacenar o transportar una muestra biológica en el dispositivo como se describe aquí, comprendiendo dicho método:

(a) aplicar una suspensión líquida que comprende la muestra biológica que contiene analitos de interés a la matriz del dispositivo; y

(b) cerrar herméticamente la tapa sobre el dispositivo de recogida, almacenamiento o transporte.

La invención proporciona además un método para recoger, almacenar o transportar una suspensión líquida de una muestra biológica que contiene analitos de interés en el dispositivo proporcionado por la presente invención. El método comprende las siguientes etapas: (a) aplicar una suspensión líquida de muestra biológica que contiene analitos de interés a la matriz del dispositivo, y (b) cerrar herméticamente la tapa sobre el dispositivo para la recogida, almacenamiento o transporte. En realizaciones preferidas, el método comprende una etapa intermedia de aplicar un líquido estabilizante a la matriz, en el que el líquido estabilizante comprende composiciones para la protección de analitos de interés del daño y degradación químicos. Las composiciones protectoras incluyen, pero no se limitan a, una base débil, un agente quelante, una trampa de radicales libres, un agente desnaturante de proteínas, y un inhibidor de nucleasas.

La invención se refiere además a un método para recuperar una muestra biológica a partir de una matriz en el dispositivo como se describe aquí, comprendiendo dicho método:

(a) aplicar un tampón de reconstitución a la matriz, para rehidratar dicha muestra biológica; y

(b) eliminar de la matriz la muestra biológica.

La presente invención proporciona además un método para recuperar una muestra biológica que contiene analitos de interés a partir de la matriz en el dispositivo proporcionado por la presente invención. En realizaciones preferidas, el método comprende las siguientes etapas: (a) aplicar un tampón de reconstitución a la matriz en el dispositivo, para rehidratar la muestra biológica unida, y (b) comprimir la matriz en el dispositivo para liberar una porción de la muestra biológica. Según la presente invención, el tampón de reconstitución comprende disolución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X o agua libre de nucleasas que comprende opcionalmente azida sódica u otro agente antimicrobiano. El tampón de reconstitución también puede incluir cualquier número o combinaciones de conservantes biológicos disponibles o anticoagulantes de la sangre, incluyendo, pero sin limitarse a, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), citrato de sodio, y heparina. En una de las realizaciones preferidas, el método comprende además una etapa de retirar la matriz del recipiente antes de comprimir la matriz. En todavía otra realización preferida, la compresión de la matriz se logra colocando la matriz en un cilindro de una jeringuilla y aplicando fuerza a un émbolo contra la matriz. Según la presente invención, la matriz en el dispositivo es capaz de comprimirse en al menos 50% del volumen de la matriz, preferiblemente al menos 75%, 80%, 85% o 90% del volumen de la matriz, para liberar una porción de la muestra biológica suspendida en la matriz.

La presente invención proporciona además un kit para recoger, almacenar o transportar una suspensión líquida de una muestra biológica que contiene analitos de interés. En realizaciones preferidas, el kit incluye el dispositivo proporcionado por la presente invención, e instrucciones para la recogida y almacenamiento de la muestra. El kit puede comprender además una disolución estabilizante, para inhibir la degradación de los analitos. El kit puede comprender además un tampón de reconstitución, un dispositivo de compresión e instrucciones adicionales para recuperar la muestra biológica. En una de las realizaciones preferidas, el dispositivo de compresión es un cilindro de jeringuilla con un émbolo, en el que la compresión de la matriz del dispositivo se logra colocando la matriz en el cilindro de la jeringuilla y aplicando fuerza al émbolo, y en el que al menos 50% a 90% o más del volumen de la matriz se comprime para liberar una porción de la muestra biológica unida.

La invención se refiere además a un kit para recuperar una muestra biológica seca, comprendiendo dicho kit:

- (a) el dispositivo como se describe aquí,
- (b) un tampón de reconstitución,
- (c) un dispositivo de compresión, y
- (d) protocolos para la preparación y recuperación de dicha muestra biológica.

La presente invención proporciona además análisis subsiguiente usando la muestra biológica recuperada que contiene analitos de interés. En realizaciones preferidas, los analitos de interés son ácidos nucleicos que incluyen moléculas de ADN y ARN, o ambas, que se detectan o analizan usando métodos analíticos y de diagnóstico conocidos en la técnica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1A es una vista en perspectiva de un dispositivo ensamblado según una realización de la presente invención.

La Fig. 1B es una vista en perspectiva de un dispositivo desensamblado según una realización de la presente invención, listo para la adición de una muestra.

La Fig. 2 ilustra la adición de la muestra a la matriz de un dispositivo según una realización de la presente invención.

La Fig. 4 es una vista en perspectiva de la preparación para transferir la matriz de un dispositivo según una realización de la presente invención a un cilindro de jeringuilla vacío.

La Fig. 5 es una vista en perspectiva del suministro completo de la matriz en el cilindro de jeringuilla.

La Fig. 6 ilustra la rehidratación de la matriz mediante una punta de pipeta colocada suavemente sobre la parte superior de la matriz y que dispensa lentamente el tampón de reconstitución.

La Fig. 7A ilustra la inserción del émbolo en el cilindro de la jeringuilla.

La Fig. 7B ilustra la aplicación de presión al émbolo de la jeringuilla.

La Fig. 7C ilustra la compresión del tapón de la matriz.

La Fig. 7D ilustra la terminación de la recuperación de la muestra.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se puede entender de forma más fácil mediante la referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención y los Ejemplos incluidos aquí. Sin embargo, antes de que se expliquen y se describan los presentes dispositivos, materiales y métodos, se ha de entender que esta invención no está limitada a realizaciones específicas de los dispositivos, materiales y métodos, puesto que tales pueden, por supuesto, variar, y las numerosas modificaciones y variaciones allí serán manifiestas para los expertos en la técnica. También se entenderá que la terminología usada aquí es con el fin de describir sólo realizaciones específicas y no pretende ser limitante.

La presente invención proporciona un dispositivo y método para la recogida, almacenamiento y transporte de una suspensión líquida de una muestra biológica que contiene un analito de interés. Más particularmente, la presente invención proporciona un dispositivo y método para la recogida, almacenamiento y transporte de una suspensión líquida que contiene una muestra biológica en un estado seco que es conveniente y simple de usar. Como se usa aquí, los términos “un” o “una” significan uno o más de uno, dependiendo del contexto en el que se usen. Por ejemplo, “un analito” en una muestra se refiere a un tipo particular de analito de interés (por ejemplo ADN de VIH), del cual pueden haber numerosas copias dentro de la muestra. Cuando se dice que una muestra contiene un analito, se entiende que la muestra puede contener también muchos otros tipos de analitos de interés.

Como se usa aquí, la frase “recogida, almacenamiento y transporte” se refiere a la conservación de una suspensión líquida de muestra biológica que contiene analitos de interés en una forma adecuada para el análisis subsiguiente. El período de tiempo durante el cual se puede conservar la muestra biológica según la presente invención puede ser tan corto como el tiempo necesario para transferir una muestra de la muestra biológica desde una fuente de recogida al lugar en el que se va a llevar a cabo el análisis subsiguiente. Por lo tanto, la invención proporciona que tal conservación se puede producir durante un período de varios minutos, horas, días, meses o más. Las condiciones de temperatura en las que se puede almacenar una muestra biológica en el dispositivo proporcionado por la presente invención no están limitadas. Típicamente, las muestras se envían y/o almacenan a temperatura ambiente, por ejemplo de alrededor de 15°C a alrededor de 40°C, preferiblemente alrededor de 15°C a 25°C. En otra realización, las muestras se pueden almacenar en un entorno frío. Por ejemplo, en el almacenamiento a corto plazo, las muestras se pueden refrigerar a alrededor de 2°C hasta alrededor de 10°C. En todavía otro ejemplo, las muestras se pueden refrigerar a alrededor de 4°C hasta alrededor de 8°C. En otro ejemplo, en el almacenamiento a largo plazo, las muestras se pueden congelar a alrededor de -80°C hasta alrededor de -10°C. En todavía otro ejemplo, las muestras se pueden congelar desde alrededor de -60°C hasta alrededor de -20°C. Además, el dispositivo se puede almacenar preferiblemente, pero no necesariamente, en condiciones secas o disecadas, o en una atmósfera inerte.

En realizaciones preferidas, la presente invención proporciona un dispositivo que comprende un recipiente que define un espacio interior que tiene paredes laterales, un fondo, y una tapa que se puede abrir. En una realización preferida, la invención proporciona un recipiente que tiene una tapa roscada. En otras realizaciones, la tapa puede quedar unida al recipiente de manera abatible. En otras realizaciones, la tapa también puede ser de tipo corcho. La tapa proporciona preferiblemente una estanqueidad frente al aire cuando el recipiente está cerrado. La forma del recipiente no está limitada, sino que puede ser, por ejemplo, cilíndrica, rectangular o tubular. Los materiales para la construcción del recipiente no están limitados, sino que pueden ser, por ejemplo, plástico, papel metálico, laminado que comprende papel metálico, película metalizada, vidrio, películas revestidas con óxido de silicio, películas revestidas con óxido de aluminio, capas poliméricas de cristal líquido, y capas de nanocompuestos, metal o aleaciones metálicas, acrílico, y carbón amorfo.

En otra realización, la tapa se puede cerrar herméticamente al recipiente por calor. Los cierres herméticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, cierres de solapamiento, cierres de aleta, cierres de extremos, y similares, y los cierres pueden obtenerse mediante cualquiera de los medios adecuados conocidos por los expertos en la técnica, tales como sellado por calor, o la aplicación de adhesivos de fusión en frío o en caliente, una barra caliente, aire caliente, radiación infrarroja, sellado ultrasónico, sellado con radiofrecuencia, sellado por láser, y similar.

El dispositivo también comprende una matriz dentro del recipiente. La matriz tiene la capacidad de absorber fácil y rápidamente una suspensión líquida, así como para liberar eficiente y precisamente la muestra biológica que contiene analitos de interés. En realizaciones preferidas, la matriz puede absorber al menos 0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml, 0,4 ml, 0,5 ml, 0,6 ml, 0,7 ml, 0,8 ml, o 0,9 ml, o preferiblemente 1,0 ml, o más, de muestra de una suspensión líquida de una muestra biológica que contiene un analito de interés. El término “absorber” y “adsorber” se usan de forma intercambiable, y significa que la suspensión líquida se incorpora en o sobre la matriz de tal manera que no se elimina fácilmente de la matriz hasta que se somete a condiciones que se llevan a cabo intencionada o inadvertidamente para eliminar la suspensión líquida absorbida de muestra biológica o la muestra biológica

reconstituida de la matriz.

El volumen de la matriz se puede expandir o no con la absorción de la suspensión líquida, y se puede contraer o no con el secado. Sin embargo, una matriz saturada con líquido se puede comprimir en al menos alrededor de 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, o 90% de su volumen saturado. La compresión volumétrica es una técnica conveniente para liberar la muestra biológica reconstituida; sin embargo, como alternativa se puede emplear cualquier otro medio, tal como centrifugación, para liberar de la matriz la muestra biológica.

Por lo tanto, como se usa aquí, el término “comprimir”, “compresible”, “compresión”, y otros derivados de la palabra “comprimir”, significa que el volumen de la matriz saturada se reduce en comparación con el volumen original de la matriz saturada mientras que se aplica a la matriz una fuerza o una presión. Como se usa aquí, la expresión “una porción de la muestra biológica” significa que al menos parte de la muestra biológica contenida en la suspensión líquida se libera de la matriz. En una realización preferida, la matriz se comprime hasta que se libera de la matriz el volumen máximo de la muestra biológica reconstituida.

En realizaciones preferidas, la matriz tiene forma tridimensional, tal como un cilindro, un cubo, una esfera, una pirámide o un cono. En una de las realizaciones preferidas, la matriz tiene forma de un cilindro de alrededor de 20 mm de longitud y 8 mm de diámetro. Sin embargo, la matriz se puede hacer más ancha, se puede alargar, o se puede acortar para lograr cualquier capacidad de volumen necesaria. En aún otra realización preferida, la matriz se puede retirar del recipiente. Como se usa aquí, el término “retirable” significa que la matriz se puede separar o desunir del recipiente. En una de las realizaciones preferidas, la matriz se monta de forma retirable en un soporte sobre la tapa de un recipiente. En aún otra realización preferida, la matriz se monta de forma retirable a una extensión de la tapa del recipiente de transporte o almacenamiento. En otras realizaciones, la matriz se puede montar en el recipiente, y se puede comprimir allí para liberar la suspensión biológica reconstituida a través de un puerto, por ejemplo.

La matriz de la presente invención incluye cualquier material absorbente al que se absorberá la suspensión líquida de muestra biológica que contiene analitos de interés, y que no inhiba el almacenamiento o el análisis subsiguiente de los analitos de interés aplicados a él. El material de la propia matriz no tiene preferiblemente ningún efecto, o tiene un efecto mínimo, sobre la medida o detección de los analitos de interés. En realizaciones preferidas, la matriz comprende un material absorbente que es de naturaleza porosa, para proporcionar el atrapamiento y retención de la suspensión líquida en de la matriz. Como se usa aquí, la expresión “atrapamiento y retención”, y sus derivados, significa que durante el almacenamiento la suspensión líquida se une a la matriz sin dependencia sustancial de interacciones iónicas, covalentes o de van der waals. Una matriz adecuada para este fin incluye, pero no se limita a, una matriz que está compuesta de fibras de acetato de celulosa, celulosa derivada de madera o algodón, nitrocelulosa, carboximetilcelulosa, polímeros hidrófilos que incluyen polipropileno, poliéster, poliamida, polímeros de hidratos de carbono, politetrafluoroetileno, fibra de vidrio, nailon, y sus combinaciones.

Como se usa aquí, la expresión “suspensión líquida” se refiere a cualquier medio líquido y mezcla que contenga muestras biológicas. Esto incluye, por ejemplo, agua, disolución salina; suspensiones celulares de seres humanos, animales y plantas; extractos o suspensiones de bacterias, hongos, plásmidos, virus; extractos o suspensiones de parásitos que incluyen helmintos, protozoos, espiroquetas; extractos líquidos u homogenizados de tejidos corporales humanos o animales, por ejemplo hueso, hígado, riñón, cerebro; medios procedentes de la síntesis de ADN o ARN; mezclas de ADN o ARN sintetizados química o bioquímicamente, y cualquier otra fuente en la que está o puede estar cualquier muestra biológica en un medio líquido.

Como se usa aquí, la expresión “muestra biológica” se refiere a muestras, ya sea en forma líquida o sólida, que tienen disueltos, suspendidos, mezclados o contenidos de otro modo en ellas, cualesquiera analitos de interés, por ejemplo material genético. Como se usa aquí, la expresión “material genético” se refiere a ácidos nucleicos que incluyen ya sea ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), o ambos. La expresión “muestra biológica” también se refiere a sangre completa, plasma, suero, linfa, fluido sinovial, médula ósea, fluido del cordón cerebroespinal, semen, saliva, orina, heces, esputo, lavado vaginal, raspaduras de piel, células de raíz capilar, o similares, de seres humanos o animales, líquidos corporales fisiológicos y patológicos, tales como secreciones, excreciones, exudados y transudados; cualesquiera células o componentes celulares de seres humanos, animales, vegetales, bacterianos, hongos, plásmidos, virus, parásitos, o similares, que contienen analitos de interés; y cualquier combinación de los mismos.

Como se usa aquí, la expresión “analitos de interés” se refiere a cualesquiera micro- o macromoléculas en la muestra biológica que son interesantes para ser detectadas o analizadas. Estas incluyen, por ejemplo, ácidos nucleicos, polinucleótidos, oligonucleótidos, proteínas, polipéptidos, oligopéptidos, enzimas, aminoácidos, receptores, hidratos de carbono, lípidos, células, cualesquiera moléculas y fragmentos intra- o extracelulares, virus, moléculas y fragmentos víricos, o similares. En una de las realizaciones preferidas, los analitos de interés son ácidos nucleicos que incluyen ADN o ARN, o ambos. Como se usa aquí, la expresión “ácidos nucleicos” o “polinucleótido” se refiere a ARN o ADN que es lineal o ramificado, mono o bicatenario, un híbrido, o un fragmento del mismo. La expresión también engloba híbridos de ARN/ADN. La expresión también engloba regiones codificantes, así como

regiones no codificantes en dirección 5' o en dirección 3'. Además, también están englobados los polinucleótidos que contienen bases menos habituales, tales como inosina, 5-metilcitosina, 6-metiladenina, hipoxantina, y otras. También se incluyen otras modificaciones, tal como la modificación a la cadena principal de fosfodiéster, o la 2'-hidroxi en el grupo azúcar de ribosa del ARN. Los ácidos nucleicos/polinucleótidos se pueden producir por cualquier medio, incluyendo preparaciones genómicas, preparaciones de ADNc, síntesis *in vitro*, RT-PCR, y transcripción *in vitro* o *in vivo*. En una realización preferida, los ácidos nucleicos son ADN o ARN vírico, o ambos, por ejemplo ADN o ARN del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), o cualquier otro patógeno vírico humano o animal.

En realizaciones preferidas, el dispositivo proporcionado por la presente invención también incluye un secante, ya sea un secante natural o sintético, dentro del recipiente para crear y mantener condiciones secas en el recipiente. Preferiblemente, el secante está en comunicación vaporosa con la matriz en el dispositivo que tiene un indicador colorante que reacciona con la humedad, con lo que el secante cambia a un color brillante cuando se expone a la humedad o condensación. En una de las realizaciones preferidas, el secante está en comunicación vaporosa con la matriz, de manera que se forma una barrera permeable al aire entre el secante y la matriz dentro del recipiente. El secante usado en el dispositivo es conocido habitualmente en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a arcilla montmorillonítica, cloruro de litio, alúmina activada, aluminosilicato alcalino, Briquetas DQ11, gel de sílice, tamiz molecular, sulfato de calcio, y óxido de calcio. El secante se puede proporcionar con un indicador colorimétrico del contenido de agua.

La matriz de la invención puede incluir opcionalmente una composición absorbida a la matriz, en la que la composición protege frente a la degradación de los analitos de interés contenidos en las muestras biológicas. Como se usa aquí, la expresión "protege frente a la degradación de los analitos de interés" significa que una matriz en el dispositivo de la invención mantiene a los analitos de interés almacenados contenidos en las muestras biológicas en una forma sustancialmente no degradada, proporcionando el hecho de que los analitos de interés sean adecuados para muchos tipos diferentes de procedimientos analíticos subsiguientes. La protección frente a la degradación puede incluir protección frente al daño sustancial de los analitos de interés provocado por agentes químicos o biológicos, incluyendo la acción de bacterias, radicales libres, nucleasas, radiación ultravioleta, agente oxidante, agentes alquilantes, o agentes ácidos (por ejemplo, contaminantes en la atmósfera). Preferiblemente, la composición absorbida en la matriz de la invención puede incluir uno o más de una base débil, un agente quelante, un agente desnaturante de proteínas, tal como un detergente o tensioactivo, un inhibidor de nucleasas, y una trampa para radicales libres. En el caso en el que el analito de interés almacenado sea ARN, particularmente ARN inestable, la composición puede incluir inhibidores e inactivadores de ARNasa, sondas genéticas, ADN o ARN complementario (o compuestos funcionalmente equivalentes), proteínas y restos orgánicos que estabilizan ARN o evitan su degradación.

Otra composición que protege frente a la degradación que se puede usar opcionalmente es un elemento depurador de oxígeno. Como se usa aquí, la expresión "elemento depurador de oxígeno" se refiere a una sustancia que consume, agota o reduce la cantidad de oxígeno de un entorno dado, sin afectar negativamente a las muestras de interés. Los elementos depuradores de oxígeno adecuados son bien conocidos para los expertos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de elementos depuradores de oxígeno incluyen pero no se limitan a composiciones que comprenden particulados metálicos que reaccionan con oxígeno, tales como metales de transición seleccionados de la serie de transición primera, segunda o tercera de la tabla periódica de los elementos, e incluyen manganeso II o III, hierro II o III, cobalto II o III, níquel II o III, cobre I o II, rodio II, III o IV, y rutenio. El metal de transición es preferiblemente hierro, níquel o cobre. Un ejemplo de un elemento depurador de oxígeno de tipo hierro es D500 de Multisorb. Otros depuradores de oxígeno comercialmente disponibles también se pueden adquirir de compañías tales como Mitsubishi, Dow, o similares. Otros ejemplos de elemento depurador de oxígeno pueden ser enzimas que consumen, agotan o reducen la cantidad de oxígeno del entorno dado sin afectar de forma negativa a las muestras de interés.

En otra realización, el recipiente puede comprender opcionalmente una atmósfera modificada, tal como nitrógeno o argón, a través de un procedimiento de purga de gas bien conocido, antes del sellado hermético, envío, o almacenamiento. La expresión "atmósfera modificada" se refiere a sustituir o alterar composiciones de gas atmosférico normales con al menos un gas inerte o un gas que no degrada la muestra de interés.

Como se usa aquí, una "base débil" adecuada para la composición de la invención puede ser una base de Lewis que tiene un pH de alrededor de 6 a 10, preferiblemente un pH de alrededor de 8 a 9,5. La base débil adecuada para la composición de la invención puede, conjuntamente con otros componentes de la composición, proporcionar un pH de la composición de 6 a 10, preferiblemente alrededor de pH 8,0 a 9,5. Las bases débiles adecuadas según la invención incluyen bases orgánicas e inorgánicas. Las bases débiles inorgánicas adecuadas incluyen, por ejemplo, un carbonato, bicarbonato, fosfato o borato de metal alcalino (por ejemplo, carbonato de sodio, de litio, o de potasio). Las bases débiles orgánicas adecuadas incluyen, por ejemplo, tris-hidroximetilamino metano (Tris), etanolamina, trietanolamina y glicina, y sales alcalinas de ácidos orgánicos (por ejemplo, citrato trisódico). Una base débil orgánica preferida es una base orgánica monovalente débil, por ejemplo Tris. La base débil puede ser una base libre o una sal, por ejemplo una sal de carbonato. Se cree que la base débil puede proporcionar una variedad de

funciones, tal como proteger los analitos de interés de la degradación, proporcionar un sistema tampón, asegurar la acción apropiada del agente quelante en la unión a iones metálicos, y evitar la acción de nucleasas ácidas que pueden no depender completamente de iones metálicos divalentes para funcionar.

Como se usa aquí, un “agente quelante” es cualquier compuesto capaz de complejar iones multivalentes, incluyendo iones metálicos multivalentes del Grupo II y Grupo III e iones de metales de transición (por ejemplo, Cu, Fe, Zn, Mn, etc.). Preferiblemente, el agente quelante es ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), citrato u oxalato. Se cree que una función del agente quelante es unirse a iones multivalentes que, si están presentes con la muestra biológica almacenada, pueden provocar daño a los analitos de interés, especialmente a los ácidos nucleicos. Los iones que pueden ser quelados por el agente quelante incluyen iones metálicos activos multivalentes, por ejemplo magnesio y calcio, e iones de metales de transición, por ejemplo hierro. Se sabe que tanto el calcio como el magnesio promueven la degradación de los ácidos nucleicos actuando como cofactores para enzimas que pueden destruir ácidos nucleicos (por ejemplo, la mayoría de las nucleasas conocidas). Además, los iones de metales de transición, tales como hierro, pueden sufrir fácilmente la oxidación y reducción y dañar a los ácidos nucleicos mediante la producción de radicales libres o mediante oxidación directa.

La composición puede incluir además un agente desnaturalizante de proteínas si los analitos de interés son ácidos nucleicos. Como se usa aquí, un “agente desnaturalizante de proteínas” funciona para desnaturalizar compuestos que no son ácidos nucleicos, por ejemplo nucleasas. Si el agente desnaturalizante de proteínas es un detergente o un tensioactivo, el tensioactivo también puede actuar como agente humectante para facilitar la captación de la muestra mediante la matriz sólida seca. Los términos “tensioactivo” y “detergente” son sinónimos, y se pueden usar de forma intercambiable a lo largo de la memoria descriptiva. Cualquier agente que desnaturalice proteínas sin afectar sustancialmente a los ácidos nucleicos de interés puede ser adecuado para la invención. Los agentes desnaturalizantes de proteínas preferidos incluyen detergentes. Como se usa aquí, “detergentes” incluyen detergentes iónicos, preferiblemente detergentes aniónicos. Un detergente aniónico preferido adecuado para la invención puede tener un resto hidrocarbonado, tal como un resto alifático o aromático, y uno o más grupos aniónicos. Los detergentes aniónicos particularmente preferidos incluyen dodecilsulfato de sodio (SDS) y lauroilsarcosinato de sodio (SLS). El detergente iónico provoca la inactivación de un microorganismo que tiene proteína o lípido en sus membranas más externas o cápsidas, por ejemplo hongos, bacterias o virus. Esto incluye microorganismos que pueden ser patógenos para los seres humanos, o que pueden provocar la degradación de ácidos nucleicos. Se cree que la inactivación de un microorganismo por un detergente es el resultado de la destrucción de la estructura secundaria de las proteínas externas, proteínas internas, membranas que contienen proteínas, o cualquier otra proteína de los organismos necesaria para la viabilidad. Sin embargo, el detergente puede no inactivar algunas formas de organismos, por ejemplo esporas bacterianas altamente resistentes y viriones entéricos extremadamente estables.

La composición de la invención puede incluir opcionalmente una trampa de radicales libres. Como se usa aquí, una “trampa de radicales libres” es un compuesto que es suficientemente reactivo para ser preferido, con respecto a una molécula de ADN o un componente de la misma, como un agente reaccionante con un radical libre, y que es suficientemente estable para no generar los propios radicales libres dañinos. Los ejemplos de una trampa de radicales libres adecuada incluyen: ácido úrico o una sal de urato, manitol, benzoato (sal de Na, de K, de Li o de tris), ácido 1,3-dimetilúrico, guanidina, guanina, timina, adenina, citosina, N-acetil-histidina, histidina, desferoxamina, dimetilsulfóxido, N-óxido de 5',5'-dimetilpirrolina, sal de tiocianato, y tiourea. Las trampas de radicales libres preferidas incluyen manitol, sales de tiocianato, ácido úrico o una sal de urato. Se cree que cuanto mayor es el período de tiempo durante el cual se va a almacenar el ácido nucleico, más probable es que una trampa de radicales libres se pueda incluir ventajosamente en la composición sorbida a la matriz sólida. Incluso si el ácido nucleico sólo se va a almacenar durante una cuestión de minutos, todavía se puede incorporar en la composición una trampa de radicales libres. Se cree que una función de la trampa de radicales libres puede ser atrapar los radicales libres que dañan a los ácidos nucleicos. Por ejemplo, cuando la trampa de radicales libres usada es ácido úrico o sal de urato, se puede convertir en alantoína, que también puede actuar como una trampa de radicales libres que acepta preferentemente radicales libres que de otro modo dañarían a las bases nucleotídicas, por ejemplo guanina. Preferiblemente, la trampa de radicales libres reacciona con radicales libres independientemente de la fuente (incluyendo radicales libres presentes en el aire). Los radicales libres se pueden generar a través de la oxidación o reducción de hierro en una muestra biológica, tal como sangre. Típicamente, se cree que los radicales libres se generan mediante oxidación espontánea de los grupos que están presentes, por ejemplo en proteína de suero desnaturalizada de la sangre. Los radicales libres también se pueden generar mediante radiación, tal como luz UV, rayos X y partículas de alta energía. Además, las trampas de radicales libres, que también son un ácido débil, por ejemplo ácido úrico, también pueden funcionar como un componente del sistema tamponante proporcionado por la base débil expuesta más arriba. También, la trampa de radicales libres puede potenciar la eliminación de una muestra almacenada de ácidos nucleicos si no se desea el procesamiento *in situ*.

Haciendo referencia a las Figs. 1A y 1B, se muestra un dispositivo de transporte o almacenamiento ejemplar de la invención para recoger, almacenar y transportar una suspensión líquida de muestra biológica que contiene analitos de interés. El recipiente 20 es cilíndrico, y tiene paredes laterales 22, un fondo 24 y una tapa 26 que se puede abrir, que se acopla de forma sellable a la abertura del recipiente 20. La tapa 26 tiene una extensión 28 que sostiene una

matriz 30 retirable dentro del recipiente 20. La matriz 30 es un cilindro capaz de absorber 1 ml de una suspensión líquida de una muestra biológica, y comprimirse en al menos 50% del volumen de la matriz saturada para liberar una porción de la muestra biológica. En consecuencia, también se coloca un secante 40 dentro del recipiente 20, separado de la matriz 30 mediante una barrera 42 opcional permeable al aire, para, en comunicación vaporosa con la matriz 30, controlar allí la humedad o condensación.

La presente invención proporciona un método para recoger, almacenar o transportar una suspensión líquida de una muestra biológica que contiene analitos de interés. El método incluye: a) aplicar la suspensión líquida de muestra biológica a la matriz en el dispositivo, y b) cerrar herméticamente la tapa/tapón en el dispositivo después de que la suspensión líquida aplicada en él esté seca. En realizaciones preferidas, la suspensión líquida se seca al aire a temperatura ambiente. También se pueden usar otros métodos de secado habitualmente disponibles, tales como secado a vacío, secado con poco calor, secado a baja presión, y secado con ventilador.

Haciendo referencia a la Fig. 1B, la tapa 26 del recipiente 20 tiene una extensión 28 de la tapa que sostiene una matriz 30 retirable, que está desensamblada. A la parte superior de la matriz 30 se añade una suspensión líquida de cualquier muestra biológica que contiene analitos de interés, y se deja que se absorba completamente en la matriz 30 (véase Fig. 3). La tapa 26 con la matriz 30 que tiene la muestra biológica unida en ella se deja secar al aire, y después se vuelve a ensamblar con el recipiente 20 para el almacenamiento o transporte a temperatura ambiente.

El método de la presente invención incluye además opcionalmente una etapa intermedia de aplicar una composición estabilizante a la matriz, para proteger a los analitos de interés frente a la degradación. Dependiendo de los analitos de interés, la composición estabilizante, como se explica anteriormente, puede incluir pero no está limitada a uno o más de una base débil, un agente quelante, un agente desnaturalizante de proteínas, tal como un detergente o tensioactivo, un inhibidor de nucleasas, y una trampa de radicales libres. Particularmente para la protección de ARN inestable, la composición estabilizante puede incluir inhibidores e inactivadores de ARNasa, sondas genéticas, ADN o ARN complementario (o compuestos funcionalmente equivalentes), proteínas y restos orgánicos que estabilizan ARN o evitan su degradación.

La presente invención proporciona además un método para recuperar, a partir de la matriz en el dispositivo, la muestra biológica que contiene analitos de interés. En realizaciones preferidas, el método incluye las siguientes etapas: a) aplicar un tampón de reconstitución a la matriz, para rehidratar la muestra biológica unida que contiene analitos de interés, y b) comprimir la matriz para liberar una porción de la muestra biológica. Según la presente invención, el tampón de reconstitución incluye los componentes de disolución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X o agua libre de nucleasas, opcionalmente con adición de azida sódica u otro agente antimicrobiano. El tampón de reconstitución también puede incluir cualquier número o combinaciones de conservantes biológicos disponibles o anticoagulantes de la sangre, incluyendo, pero sin limitarse a, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), citrato de sodio, y heparina. La PBS o el agua libre de nucleasas sirve como el medio estéril y neutro para la rehidratación, resuspensión y recuperación del analito o analitos de interés a partir de la matriz. Cuando se incluyen, los agentes antimicrobianos tales como azida sódica evitan el crecimiento microbiano y la contaminación subsiguiente con ARNasas. Cuando se incluyen, los conservantes biológicos tales como EDTA, citrato de sodio, y heparina sirven como anticoagulantes y o agentes quelantes.

En las realizaciones mostradas en las Figs. 4-7, la muestra biológica se prepara para el análisis. La Fig. 4 es una vista en perspectiva de la preparación para transferir la matriz 30 del dispositivo a un cilindro 52 de jeringuilla vacío. La Fig. 5 es una vista en perspectiva del suministro terminado de la matriz 30 dentro del cilindro 52 de la jeringuilla.

La Fig. 6 ilustra la rehidratación de la matriz 30 mediante una punta 53 de pipeta colocada suavemente sobre la parte superior de la matriz 30, y que dispensa lentamente el tampón de reconstitución. La Fig. 7A ilustra la inserción del émbolo 54 en el cilindro 52 de la jeringuilla. La Fig. 7B ilustra la aplicación de presión al émbolo 54 de la jeringuilla. La Fig. 7C ilustra la compresión de la matriz 30. La Fig. 7D ilustra la terminación de la recuperación de la muestra a partir de la matriz 30.

En una de las realizaciones preferidas, los analitos de interés son ácidos nucleicos, incluyendo moléculas de ADN o de ARN, o ambas. Preferiblemente, la suspensión líquida de muestra biológica contiene al menos alrededor de 500 ng de moléculas de ADN o de ARN aisladas, más preferiblemente al menos alrededor de 1 µg de moléculas de ADN o de ARN. Como se usa aquí, el término "aislada", "aislamiento", y otros derivados de la palabra "aislar", significa que las moléculas de ADN o de ARN están sustancialmente libres de algún otro material celular con el que están asociadas naturalmente, o medio de cultivo cuando se producen mediante técnicas recombinantes, o precursores químicos u otros compuestos químicos cuando se sintetizan químicamente.

La presente invención proporciona además el hecho de que los analitos de interés contenidos en la muestra biológica recuperada de la matriz del dispositivo en el tampón de reconstitución se someten a análisis subsiguiente. Como se usa aquí, la expresión "análisis subsiguiente" incluye cualquier análisis que se puede llevar a cabo sobre muestras biológicas recuperadas almacenadas en tampón de reconstitución. Como alternativa, los analitos de interés contenidos en la muestra biológica se pueden aislar, purificar o extraer antes del análisis usando métodos

conocidos en la técnica. Los analitos de interés se pueden someter a análisis químico, bioquímico o biológico. En una de las realizaciones preferidas, los analitos de interés son ácidos nucleicos, incluyendo moléculas de ADN o de ARN, o ambas, que se pueden detectar o analizar con o sin extracción, purificación o aislamiento previo. Si es necesario, la extracción, purificación o aislamiento del ADN o del ARN se lleva a cabo en base a métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos de análisis subsiguiente incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), PCR iniciada por transcriptasa inversa, técnicas de hibridación de ADN o de ARN, incluyendo polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP), detección y cuantificación de ADN o ARN vírico, ensayos de carga viral, genotipado de ADN o ARN, etc. El "análisis subsiguiente" también incluye otras técnicas que usan sondas genéticas, secuenciación genómica, ensayos enzimáticos, marcaje de afinidad, métodos de detección que usan marcadores o anticuerpos, y otros métodos similares.

La presente invención también proporciona un kit para recoger, almacenar y transportar una suspensión líquida de muestra biológica que contiene analitos de interés. El kit de la presente invención proporciona un dispositivo descrito aquí que incluye uno o más recipientes, una o más matrices, un secante, e instrucciones para el uso del mismo, para recoger muestras biológicas. El kit puede incluir opcionalmente una disolución estabilizante. Los kits de la presente invención pueden incluir además un tampón de reconstitución, un dispositivo de compresión, y protocolos adicionales para la rehidratación y recuperación de la muestra biológica. El recipiente del kit puede ser cualquier recipiente adecuado para uso durante la aplicación de una suspensión líquida de muestra biológica que contiene analitos de interés a la matriz, o durante la aplicación de una o más fases del procesamiento subsiguiente de una muestra de la muestra biológica. Por lo tanto, se puede usar un kit para aplicar una suspensión líquida a la matriz cuando la matriz se retira del recipiente del kit para el procesamiento en un recipiente diferente. Como alternativa, se puede aplicar, almacenar, transportar y procesar posteriormente una suspensión líquida de muestra biológica, todo ello en el mismo recipiente del kit.

El kit también puede incluir una o más de cualquiera de las matrices descritas aquí. Esto incluye una o más matrices con o sin composiciones para la protección de analitos de interés contenidos en la muestra biológica. Un aspecto del kit de la presente invención es que la muestra biológica reconstituida que contiene analitos de interés se libera comprimiendo la matriz. Este procedimiento evita someter a remolino y centrifugar la muestra, proporcionando una menor ocasión para dañar la muestra, menores costes de trabajo humano y una menor contaminación de la muestra en la matriz. Un dispositivo de compresión del kit de la presente invención puede ser cualquier dispositivo que se use para proporcionar una fuerza o presión sobre la matriz para comprimirla. En una de las realizaciones preferidas, el dispositivo de compresión es una jeringuilla, en el que la matriz se coloca en el cilindro de la jeringuilla y se aplica fuerza o presión al émbolo de la jeringuilla para comprimir la matriz para liberar la muestra biológica reconstituida.

También se debería entender que lo anterior se refiere a realizaciones preferidas de la presente invención, y que se pueden hacer numerosos cambios en ellas sin separarse del alcance de la invención. La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no se deben de interpretar de ningún modo como limitaciones sobre el alcance de la misma. Por el contrario, se debe entender claramente que se puede tener los recursos a otras diversas realizaciones, modificaciones, y equivalentes de las mismas, que, después de leer la descripción aquí, pueden sugerirse por sí mismos al experto en la técnica sin separarse del alcance de las reivindicaciones anejas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Preparación de una muestra de un (1,0) ml y kit de recuperación de dispositivo

Componentes del kit:

Este ejemplo proporciona un kit para la preparación, transporte y recuperación de treinta y seis (36) muestras biológicas secas procedentes de fluidos corporales o tejido. Los materiales y reactivos para la preparación y recuperación de treinta y seis (36) muestras de un (1,0) ml para el transporte seco a temperatura ambiente incluyen los siguientes:

Componente	Cantidad
Recipientes del kit de dispositivo (tubos)	36 cada uno
Tampón de reconstitución	3 X 13 ml
Jeringuillas desechables de 3 ml	36 cada una
Tubos cónicos de 15 ml para centrifugadora	36 cada uno

Almacenamiento y manipulación:

Al recibirlos, todos los componentes del kit se almacenan en seco a temperatura ambiente (15-25°C). Úsenlos sólo tubos de recipientes del dispositivo cuando el secante indicador tiene color azul. Los tubos de los recipientes del kit del dispositivo no se deberían usar si el secante indicador tiene un color blanco o rosado. También se necesitan, aunque no se proporcionan por el kit, materiales tales como pipeta de 1000 µl, puntas de pipetas estériles de 1000 µl

5

Precauciones de seguridad:

Los guantes desechables libres de polvo se usan para manipular todos los materiales, ya que son capaces de transmitir agentes infecciosos. Utilícense buenas prácticas de laboratorio y precauciones universales referidas a la prevención de transmisión de patógenos portados por la sangre (véase Centros para el Control de Enfermedades. Actualización: Universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus and other blood borne pathogens in healthcare settings. MMWR, 1988; 37:377-82, 387-8; National Committee for Clinical Laboratory Standards. Protection of laboratory workers from infectious disease transmitted by blood, body fluids, and tissue; approved guideline. NCCLS Document M29-A Villanova (PA): NCCLS;1997 Dec. 90p; Federal Occupational Safety and Health Administration. Bloodborne Pathogens Standard, 29 CFR 1910. 1030). Inmediatamente, límpiense cualesquiera vertidos sospechosos de contener potencialmente agentes infecciosos con hipoclorito sódico al 0,5% p/v (lejía al 10% v/v). Deséchense todas las muestras y materiales que entren en contacto con muestras, ya que pueden contener agentes infecciosos. En el caso en el que los materiales que se sabe o se sospecha que contienen agentes infecciosos sean ingeridos o entren en contacto con laceraciones abiertas, lesiones, o membranas mucosas (ojos, fosas nasales, etc.), consúltese inmediatamente a un médico.

15

20

*Ejemplo 2**Preparación de muestras usando el kit del dispositivo*

Las etapas de la preparación de muestras se llevaron a cabo en una cabina de seguridad biológica usando técnica estéril y precauciones universales referidas a la manipulación de materiales potencialmente infecciosos. Antes de comenzar el proceso de preparación de las muestras, se debería de estar familiarizado con el protocolo de uso del kit del dispositivo que se ilustra en las Figs. 1A y 1B.

25

Antes de cargar una muestra de suspensión líquida de muestra biológica que contiene analitos de interés, se debería de desenroscar la tapa del recipiente del dispositivo, se debería invertir y se debería de colocar sobre una superficie de trabajo limpia, con la matriz absorbente cara arriba (véanse Figs. 1A y 1B). Se añadió lentamente alrededor de una cantidad de hasta 1 ml de fluido de muestra a la parte superior del tapón de la matriz, y se dejó que se absorbiese completamente en la matriz. La matriz del kit del dispositivo, cargada con el fluido de muestra, se dejó secar al aire. En general, el secado al aire en una cabina de seguridad biológica tarda aproximadamente 4,5 a 5 horas. Una vez que la muestra está completamente seca, la tapa que sostiene a la matriz que contiene la muestra seca se volvió a colocar con cuidado en el tubo del recipiente del kit del dispositivo. La muestra está ahora lista para ser enviada o almacenada a temperatura ambiente.

30

35

*Ejemplo 3**Recuperación de muestras usando el kit del dispositivo*

Las etapas de recuperación de muestras también se llevaron a cabo en una cabina de seguridad biológica usando técnica estéril y precauciones universales referidas a la manipulación de materiales potencialmente infecciosos. Básicamente, se insertó una jeringuilla estéril desechable de 3 ó 5 ml Luer-Lok™ (proporcionada por el kit) en un tubo de recogida de 15 ml (también proporcionado por el kit). El émbolo se retiró del cilindro de la jeringuilla. La matriz absorbente que contiene la muestra seca se transfirió al interior del cilindro de la jeringuilla presionando la matriz contra el interior estéril de la boca del cilindro de la jeringuilla con una presión suficientemente justa para liberarla de la tapa unida y permitir que cayera libremente al fondo de la jeringuilla (véanse Figs. 4 y 5). El cilindro de la jeringuilla con el tapón de la matriz despegado se colocó en un tubo cónico de recogida de 15 ml, que se colocó posteriormente en un bastidor. Se aplicó lenta y directamente alrededor de 1 ml de tampón de reconstitución (suministrado por el kit) a la parte superior del tapón de matriz, para rehidratar suavemente la muestra seca absorbida dentro de la matriz (véase Fig. 6). Es necesario inspeccionar la velocidad de absorción y ajustar la velocidad de aplicación según sea necesario mientras se añade el tampón de reconstitución, e intentar no permitir que el tampón se deposite en la parte inferior de la jeringuilla sin que primero sea absorbido en la matriz, debido a que el fracaso en la absorción completa del tampón de reconstitución puede dar como resultado menores rendimientos de recuperación. La muestra que se rehidrata se dejó incubar durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente antes de añadir 175 µl adicionales de tampón de reconstitución a la parte superior del tapón

40

45

50

55

de matriz.

Se reinsertó el émbolo de la jeringuilla en el cilindro de la jeringuilla y se presionó hacia abajo con una presión uniforme y firme hasta que el émbolo haya comprimido completamente el tapón de matriz y se recoja un volumen máximo de aproximadamente 1 ml dentro del tubo de recogida de 15 ml (véanse Fig. 7A, 7B, 7C, y 7D). El cilindro de la jeringuilla, el émbolo y el tapón de matriz comprimido se retiraron entonces del tubo de recogida de 15 ml y se desecharon en un receptáculo para desechos apropiado. El tubo de recogida de 15 ml que contiene la muestra recientemente recuperada se cerró herméticamente con la tapa de rosca proporcionada. La muestra reconstituida está lista para el almacenamiento, ensayo, o análisis subsiguiente adicional.

Ejemplo 4

10 Ensayos de genotipado de VIH-1 TRUGENE que usa la muestra reconstituida procedente del kit del dispositivo

Las características de comportamiento de recogida del kit del dispositivo se examinaron, se compararon y se establecieron con muestras fuertemente caracterizadas usando análisis clonal y herramientas de obtención de huellas polimórficas. Por ejemplo, los resultados del genotipado del VIH se obtuvieron usando los ARN extraídos de un volumen de 1 ml de plasma reconstituido procedente de un kit del dispositivo almacenado durante 1 día y 7 días, respectivamente. Todas las extracciones se llevaron a cabo usando el QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit, conocido en la técnica. Todos los ensayos de genotipado se llevaron a cabo usando el BAYER TRUGENE HIV-1 Genotyping Kit y OpenGene DNA Sequencing System, también conocidos en la técnica. Los resultados del genotipado del VIH con el kit del dispositivo se compararon con los obtenidos de plasma congelado, y el resumen de los resultados de genotipado para muestras coinfectadas tanto con VIH como con HN/VHC se muestran en las Tablas 1(A), 1(B), 1(C), 2(A), 2(B), y 2(C).

Tabla 1(A)

TRUGENE HIV-1 (MT1-SC2-R0001, 100.000 copias de VIH /ml)			
	Plasma Congelado	Día 1 con el Kit del Dispositivo	Día 7 con el Kit del Dispositivo
Región de Proteasa			
109	S37N*	S37N*	S37N*
121	R41K*	R41K*	R41K*
178	D60E*	D60E*	D60E*
184	I62V*	I62V*	I62V*
187	L63P#	L63P#	L63P4
214	I72M*	I72M*	I72M*
229	V77I*	V77I*	V77I*
Región de Transcriptasa Inversa			
247	R83K*	R83K*	R83K*
361	D121A*	D121A*	D121A*
367	D123E*	D123E*	D123E*
403	I135V*	I135V*	I135V*
604	I202V*	I202V*	I202V*
* representa polimorfismo; # representa mutación de resistencia			

Tabla 1(B)

TRUGENE HIV-1 (MT1-AS2-R0001, 64.700 copias de VIH /ml)			
	Plasma Congelado	Día 1 con el Kit del Dispositivo	Día 7 con el Kit del Dispositivo
Región de Proteasa			
28	L10I#	L10I#	L10I#
37	I13V*	I13V*	I13V*
94	V321#	V321#	V321#
97	L33F#	L33F#	L33F#
109	S37N*	S37N*	S37N*
136	M46L#	M46I2	M46L#
160	I54V#	I54V#	I54V#
187	L63P#	L63P#	L63P#
211	A71V#	A71V#	A71V#
229	V77I*	V77I*	V77I*
244	V82A#	V82A#	V82A#
268	L90M#	L90M#	L90M#
Región de Transcriptasa Inversa			
121	M41L#	M41L#	M41L#
127	K43E*	K43E*	K43E*
130	E44D#	E44D#	E44D#
199	D67N#	D67N#	D67N#
205	T69D#	T69D#	T69D#
247	R83K*	R83K*	R83K*
352	V118I#	V118I#	V118I#
367	D123N*	D123N*	D123N*
412	E138G*	E138G*	E138G*
586	G196E*	G196E*	G196E*
628	L210W	L210W#	L210W
640	L214F*	L214F*	L214F*
643	T215Y#	T215Y#	T215Y#
709	D237E*	D237E*	D237E*
* representa polimorfismo; # representa mutación de resistencia			

Tabla 1(C)

TRUGENE HIV-1 (MT1-GL1-R0001, 24.792 copias de VIH /ml)			
	Plasma Congelado	Día 1 con el Kit del Dispositivo	Día 7 con el Kit del Dispositivo
Región de Proteasa			
28	L10I#	L10I#	L10I#
31	V11L*	V11L*	V11L*
37	I13V*	I13V*	I13V*
40	K14N*	K14N*	K14N*
97	L33F#	L33F#	L33F4
109	S37N*	S37N*	S37N*
160	I54M#	I54M#	154M#
184	I62I/V#	I62I/V*	I62I/V*
187	L63P#	L63P#	L63P#
211	A71V#	A71V#	A71V#
217	G73S#	G73S#	G73S#
229	V77I/V*	V77I/V*	V77I/V*
250	I84V#	I84V#	184V#
265	L89V*	L89V*	L89V*
268	L90M#	L90M#	L90M#
Región de Transcriptasa Inversa			
121	M41L#	M41L#	M41L#
127	K43Q*	K43Q*	K43Q*
220	L74V#	L74V#	L74V#
364	E122K/E*	E122K/E*	E122K/E*
367	D123E/D*	D123E/D*	D123E/D*
403	I135T*	I135T*	I135T*
484	S162H*	S162H*	S162H*
529	D177D/G*	D177D/G*	D177D/G*
532	I178I/M*	I178I/M*	I178I/M*
550	M184V#	M184V#	M184V#
628	L210W#	L210W#	L210W#
631	R211K*	R211K*	R211K*
640	L214F*	L214F*	L214F*
643	T215Y*	T215Y*	T215Y*

682	L228H#	L228H#	L228H#
<i>* representa polimorfismo; # representa mutación de resistencia</i>			

Tabla 2(A)

	TRUGENE HIV-1		HIV-1 GeneTanker	
Región de Proteasa	Plasma congelado	Muestra Tanker día 7	Plasma congelado	Muestra Tanker día 7
43	115V*	115V*	115V*	115V*
103	E35E/D*	E35D*	E35D*	E35D*
106	M361/L#	M361#	M361#	M361#
109	S37N/S*	S37N*	S37N*	S37N*
169	R57K*	R57K*	R57K*	R57K*
184	162I/V*	162I/V*	I62V*	I62V*
187	L63A++	L63A++	L63A++	L63A++
Región de transcriptasa inversa				
190	K64R*	K64R*	K64R*	K64R*
364	E122K/E*	E122K/E*	E122K/E*	E122K/E*
403	I135T*	I135T*	I135T*	I135T*
631	R211K*	R211K/R*	R211K*	R211K*
640	L214F*	L214F*	L214F*	L214F*
733	V245E*	V245E*	X	X
<i>* representa polimorfismo; # representa mutación de resistencia; ++ representa mutación inesperada</i>				

Tabla 2(B)

	TruGene HIV-1		HIV-1 GeneTanker	
	Plasma congelado	Muestra Tanker día 7	Plasma congelado	Muestra Tanker día 7
Región de proteasa				
103	E35D*	E35D*	E35D*	E35D*
109	S37N*	S37N*	S37N*	S37N*
229	V771/V*	V771/V*	V771/V*	V771/V*
Región de transcriptasa inversa				
301	K101K/E#	K101K/E#	K101K/E#	K101K/E#
316	V106A/V#	V106A/V#	V106A/V#	V106A/V#
364	E122K*	E122K*	E122K*	E122K*

631	R211K*	R211K*	R211K*	R211K*
640	L214F*	L214F*	L214F*	L214F*
643	T215Y#	T215Y#	T215Y#	T215Y#
733	V245K*	V245K*	X	X
<i>* representa polimorfismo; # representa mutación de resistencia</i>				

Tabla 2 (C)

	TruGene HIV-1		HIV-1 GeneTanker	
Región de Proteasa	Plasma congelado	Muestra Tanker día 7	Plasma congelado	Muestra Tanker día 7
43	I15V*	I15V*	I15V*	I15V*
103	E35D*	E35D*	E35D*	E35D*
106	M361#	M3614	M361#	M361#
109	S37D*	S37D*	S37D*	S37D*
169	R57K/R*	R57K*	R57K*	R57K*
Región de transcriptasa inversa				
121	M41L#	M41L#	M41L#	M41L#
127	K43K/T*	K43K/T*	K43K/T*	K43N*
130	E44E/D#	E44E/D#	E44E/D#	E44D#
199	D67N#	D67N#	D67N#	D67N#
367	D123N*	D123N*	D123N*	D123N*
586	X	G196E/G*	X	G196E/G*
619	Q207E*	Q207E*	Q207E*	Q207E*
628	L210W#	L210W#	L210W#	L210W#
631	R211K*	R211K*	R211K*	R211K*
640	L214F*	L214F*	L214F*	L214F*
643	T215Y#	T215Y#	T215Y#	T215Y#
<i>* representa polimorfismo; # representa mutación de resistencia</i>				

- 5 Los datos en las Tablas 1(A), 1(B), 1(C), 2(A), 2(B), y 2(C) indican que las muestras reconstituidas procedentes del kit del dispositivo almacenadas a temperatura ambiente durante 1 y 7 días antes del ensayo no mostraron degradación subsiguiente de la intensidad del pico ni relación incrementada de señal a ruido. Las muestras reconstituidas procedentes del kit del dispositivo mostraron un grado elevado de correlación y reproducibilidad al de las muestras de plasma congelado estándar.

Ejemplo 5

- 10 Ensayo de BAYER VERSANT HIV-1 RNA 3.0 (bDNA) que usa muestras reconstituidas procedentes del kit del dispositivo

En este estudio, las muestras reconstituidas procedentes de la recogida del kit del dispositivo se almacenaron

secas a temperatura ambiente durante 1 día antes del ensayo. El ensayo Bayer Versant HIV-1 RNA 3.0 es conocido en la técnica. Los datos mostrados en la Tabla 3 indican la reproducibilidad usando muestras procedentes del kit del dispositivo.

Tabla 3

Descripción	Copias de ARN/ml	Log ₁₀ de ARN	Log ₁₀ de ARN medio	Varianza de Log ₁₀	Varianza media de Log ₁₀ *
Kit del dispositivo	43.480	4,64	4,58	0,06	0,03
Kit del dispositivo	34.285	4,54	4,58	0,04	0,03
Kit del dispositivo	39.085	4,59	4,58	0,01	0,03
Kit del dispositivo	37.751	4,58	4,58	0,	0,03
Kit del dispositivo	35.298	4,55	4,58	0,03	0,03
Kit del dispositivo	40.005	4,6	4,58	0,02	0,03
Kit del dispositivo	5.439	3,74	3,76	0,02	0,04
Kit del dispositivo	5.295	3,72	3,76	0,04	0,04
Kit del dispositivo	5.150	3,71	3,76	0,05	0,04
Kit del dispositivo	6.142	3,79	3,76	0,03	0,04
Kit del dispositivo	6.611	3,82	3,76	0,06	0,04
Kit del dispositivo	5.905	3,77	3,76	0,01	0,04
Kit del dispositivo	726	2,86	2,75	0,11	0,07
Kit del dispositivo	522	2,72	2,75	0,03	0,07
Kit del dispositivo	710	2,85	2,75	0,1	0,07
Kit del dispositivo	417	2,62	2,75	0,13	0,07
Kit del dispositivo	568	2,75	2,75	0	0,07
Kit del dispositivo	476	2,68	2,75	0,07	0,07

5

Ejemplo 6

Ensayo de Roche Ultrasensitive AMPLICOR HIV-1 MONITOR, versión 1.5, para cuantificar la carga viral usando muestras reconstituidas procedentes del kit del dispositivo

10

En este estudio, las muestras reconstituidas procedentes de la recogida del kit del dispositivo se almacenaron secas a temperatura ambiente durante 7 días antes del ensayo. El ensayo Roche UltraSensitive AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test v1.5 es conocido en la técnica, y se llevó a cabo usando muestras reconstituidas procedentes del plasma con EDTA seco del kit del dispositivo. Los datos mostrados en la Tabla 4 indican la reproducibilidad usando muestras procedentes del kit del dispositivo.

Tabla 4

Tipo de muestra	Copias/ml	Log ₁₀ de ARN	Log ₁₀ de ARN medio	Varianza de Log ₁₀	Varianza media de Log ₁₀
Plasma con EDTA seco	3.861	3,59	3,6	0,01	0,01
Plasma con EDTA seco	4.060	3,61	3,6	0,01	0,01

Plasma con EDTA seco	4.085	3,61	3,6	0,01	0,01
Plasma con EDTA seco	14.640	4,17	4,04	0,13	0,09
Plasma con EDTA seco	9.314	3,97	4,04	0,07	0,09
Plasma con EDTA seco	9.249	3,97	4,04	0,07	0,09
Plasma con EDTA seco	19.981	4,3	4,28	0,02	0,03
Plasma con EDTA seco	19.816	4,3	4,28	0,02	0,03
Plasma con EDTA seco	16.788	4,23	4,28	0,05	0,03
Plasma con EDTA seco	21.757	4,34	4,44	0,1	0,09
Plasma con EDTA seco	25.155	4,4	4,44	0,04	0,09
Plasma con EDTA seco	37.087	4,57	4,44	0,13	0,09
Plasma con EDTA seco	1.275	3,11	3,19	0,08	0,05
Plasma con EDTA seco	1.837	3,26	3,19	0,07	0,05
Plasma con EDTA seco	1.590	3,2	3,19	0,01	0,05
Plasma con EDTA seco	1.037	3,02	3,04	0,02	0,05
Plasma con EDTA seco	981	2,99	3,04	0,05	0,05
Plasma con EDTA seco	1.274	3,11	3,04	0,07	0,05
Log ₁₀ varianza media global = 0,05					
Las muestras del kit del dispositivo se almacenan secas a temperatura ambiente durante 7 días antes del ensayo. N = 18 (6 muestras x 3 réplicas cada una)					

Ejemplo 7

Ensayos de genotipado de TRUGENE HCV 5'NC que usan muestras reconstituidas procedentes del kit del dispositivo

- 5 En este estudio, los genotipos de HVC 5'NC se obtuvieron a partir de ARN extraído de 140 µl de un volumen de 1,0 ml de plasma descongelado o reconstituido. El ARN se extrajo usando el QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit, conocido en la técnica. Todos los ensayos de genotipado se llevaron a cabo usando el kit de genotipado BAYER TRUGENE HCV 5'NC Genotyping Kit y el sistema OpenGene DNA Sequencing System, también conocidos en la técnica. Los resultados del genotipado de VHC 5'NC con el kit del dispositivo se compararon con los obtenidos de plasma congelado, y el resumen de los resultados de genotipado para las muestras co infectadas con VIH/VHC se muestra en las Tablas 5(A), 5(B), y 5(C).

Tabla 5(A)

Muestra Coinfectada #1	
De Plasma Congelado	Matriz de Filtro d7 Post Prep
Genotipo: 2b	Genotipo: 2b

Tabla 5(B)

Muestra Coinfectada #1	
De Plasma Congelado	Matriz de Filtro d7 Post Prep

Genotipo: 3	Genotipo: 3a
-------------	--------------

Tabla 5(C)

Muestra Coinfectada #1	
De Plasma Congelado	Matriz de Filtro d7 Post Prep
Genotipo: 1a	Genotipo: 1a

Ejemplo 8

- 5 Comparación de la carga viral y genotipado de resistencia entre plasma congelado y un nuevo medio de transporte de plasma seco (kit de dispositivo) sobre muestras de pacientes tratadas

Métodos:

- 10 Carga viral, extracción del ARN, y genotipado: las cargas virales del VIH-1 se determinaron usando el Standard o UltraSensitive AMPLICOR HIV-1 MONITOR® Test v1.5 (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN), VERSANT® HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA) (Bayer Healthcare, Tarrytown, NY) o NucliSens® HIV-1 QT Assay (bioMérieux, Durham, NC). El ARN vírico total para todas las muestras usado en el genotipado se extrajo usando el QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). El genotipo del VIH-1 se determinó usando el TRUGENE® HIV-1 Genotyping Kit (Bayer Healthcare) o el VIH-1 GeneTanker Genotyping Complete Assay (Research Think Tank, Inc.), o ambos. El genotipo del VHC se determinó usando el TRUGENE HCV 5'NC Genotyping Kit (Bayer Healthcare). Toda la secuenciación, el procesamiento de datos y la presentación de datos se realizaron usando el OpenGene® DNA Sequencing System (Bayer Healthcare).

- 20 La matriz del dispositivo (Figuras 1A y 1B) tiene una capacidad máxima de 1 ml. Se añadió a cada matriz un volumen de 1 ml de plasma, se dejó secar al aire en una cabina de bioseguridad durante 4-5 horas, después se envasó en el tubo del kit de dispositivo y se almacenó o se envió a temperatura ambiente. Las matrices de las muestras secas se rehidrataron con el volumen apropiado de tampón de reconstitución, para recuperar 1 ml de plasma reconstituido.

- 25 Reproducibilidad del intraensayo de la carga viral de Amplicor usando el kit del dispositivo: se prepararon tres matrices para cada una de seis muestras de plasma positivas a VIH-1 seleccionadas al azar (N = 18). Las muestras de la matriz se reconstituyeron y recuperaron en el día 7 tras la preparación, y se usaron para examinar la reproducibilidad de la carga viral intraensayo del ensayo de la carga viral UltraSensitive AMPLICOR.

- Reproducibilidad del intraensayo de la carga viral de Versant usando el kit del dispositivo: se prepararon seis matrices para cada una de tres diluciones en serie procedentes de una muestra positiva a VIH-1 (N = 18). Las muestras de la matriz se reconstituyeron y recuperaron en el día 1 tras la preparación, y se usaron para examinar la reproducibilidad de la carga viral del intraensayo del ensayo de la carga viral de Versant.

- 30 Reproducibilidad del intraensayo de la carga viral de NucliSens usando el kit del dispositivo: se prepararon cinco matrices para cada una de tres muestras de plasma positivas a VIH-1 seleccionadas al azar (N = 15). Las muestras de la matriz se reconstituyeron y recuperaron en el día 3,5 después de la preparación, y se usaron para examinar la reproducibilidad de la carga viral del intraensayo del ensayo de carga viral de NucliSens.

- 35 Estabilidad del genotipado de VIH-1: se seleccionaron al azar tres muestras de plasma positivas a VIH-1 archivadas, con cargas virales determinadas previamente, para preparar las matrices del dispositivo para el ensayo de estabilidad de los genotipos. Siguiendo el método descrito anteriormente, se prepararon para cada muestra dos conjuntos idénticos de matrices. Las matrices empaquetadas secas se almacenaron a temperatura ambiente durante un tiempo de hasta 7 días. El plasma reconstituido para cada conjunto de matrices se recuperó en el día 1º o en el día 7, respectivamente. Para cada muestra, se extrajo todo el volumen recuperado. El genotipado se llevó a cabo en todas las muestras usando el kit de genotipado de TRUGENE del VIH-1, siguiendo el protocolo del fabricante. Los genotipos de la matriz se compararon entonces con los genotipos derivados de plasma congelado, determinados previamente.

- 45 Coinfección con VIH-1/VHC: para cada una de tres muestras de plasma coinfectadas con VIH-1/VHC, se preparó una alícuota individual de matriz y de plasma congelado mediante un laboratorio externo y se envió durante toda la noche a Research Think Tank. Las alícuotas del plasma se enviaron en hielo seco, mientras que las muestras del kit del dispositivo se enviaron por separado a temperatura ambiente. A la recepción, las muestras de la matriz se almacenaron a temperatura ambiente hasta que se reconstituyeron para el ensayo en el 7º día tras la preparación. El

plasma congelado correspondiente se descongeló para el ensayo en paralelo en el 7º día. Todas las muestras se evaluaron para determinar por duplicado la carga viral usando el ensayo de carga viral estándar AMPLICOR. Se extrajo para ARN total (VIH-1 y VHC) un volumen de 140 µl de cada muestra, después se genotipó usando los kits de TRUGENE HIV-1, el HIV-1 GeneTanker y el HCV TRUGENE HCV 5'NC, siguiendo el protocolo del fabricante.

- 5 Fenotipado: el ARN extraído de las muestras coinfectadas con VIH-1/HVC del kit del dispositivo y de plasma congelado emparejadas se presentaron para el análisis del fenotipado Phenoscript™ (VIRalliance, París, Francia).

Resultados:

Características del kit del dispositivo: el kit del dispositivo consistió en una matriz fibrosa absorbente para la preparación de muestras de plasma seco y un tubo de almacenamiento/transporte con secante. La matriz produjo un volumen de plasma aproximado recuperado de 1,035 +/- 0,03 ml. Las muestras del kit del dispositivo se secaron en una cabina de bioseguridad, a temperatura ambiente, durante un mínimo de 4,5 horas antes de envasarlas. Ensayos de carga viral: la diferencia del log₁₀ medio entre las muestras de plasma seco congelado y del kit del dispositivo emparejadas usando el ensayo AMPLICOR HIV-1 estándar y VERSANT HIV-1 fue 0,36 y 0,51, respectivamente (Tabla 6A y B; carga viral de Roche estándar para 9 muestras seleccionadas al azar y carga viral de Bayer bDNA HIV-1 para 12 muestras seleccionadas al azar, respectivamente). Los experimentos de reproducibilidad cuantitativa intraensayos para el kit del dispositivo indicaron una varianza media del log₁₀ global de 0,05 para el ensayo UltraSensitive AMPLICOR HIV-1 en el día 7 (Tabla 4), 0,05 para el ensayo VERSANT HIV-1 en el día 1 (Tabla 3) y 0,06 para el ensayo NucliSens HIV-1 QT en el día 3,5 (Tabla 7). Los valores de la carga viral obtenidos a partir de las muestras del kit del dispositivo fueron consistentemente menores que los obtenidos a partir de las muestras de plasma congelado emparejadas.

Ensayos de genotipado: la calidad de las secuencias generada entre las muestras de plasma del kit del dispositivo y congelado emparejadas fue comparable. Sin embargo, en varias secuencias las muestras del kit del dispositivo mostraron un incremento en la calidad de las secuencias (datos no mostrados). Los perfiles de mutación obtenidos usando los kits de genotipado TRUGENE HIV-1 y/o HIV-1 GeneTanker mostraron un grado elevado de concordancia entre las muestras de plasma del kit del dispositivo y congelado emparejadas (Tabla 1 y 2). Esta concordancia fue consistente independientemente de la carga viral del VIH-1, del tiempo de almacenamiento o de las condiciones de envío antes del ensayo del genotipo. Entre las muestras de plasma del kit del dispositivo y congelado coinfectadas emparejadas, hubo una concordancia a nivel del genotipo para VHC usando el kit TRUGENE HCV 5'NC, mientras que las muestras 37 y 39 estuvieron de acuerdo a nivel del subtipo, no fue posible determinar el subtipo del VHC para las muestras de plasma de la muestra 38. Fenotipado: los resultados del fenotipo se obtuvieron con éxito para todas las muestras de plasma del kit del dispositivo y congelado coinfectadas con VIH-1/VHC emparejadas.

Tabla 6A

Muestra	Descripción	Copias de ARN/ml	Log ₁₀ de ARN	Diferencia de Log ₁₀
1	Plasma	23,15	4.3	0.4
	Kit del dispositivo	7,87	3.9	
2	Plasma	544,25	5.7	0.3
	Kit del dispositivo	231,24	5.3	
3	Plasma	33,17	4.5	0.2
	Kit del dispositivo	20,36	4.3	
4	Plasma	4,10	3.6	0.2
	Kit del dispositivo	2,49	3.4	
5	Plasma	394,70	5.6	0.5
	Kit del dispositivo	106,41	5.0	
6	Plasma	130,54	5.1	0.3
	Kit del dispositivo	54,63	4.7	

7	Plasma	11,28	4.0	0.2
	Kit del dispositivo	6,53	3.8	
8	Plasma	601,85	5.7	0.1
	Kit del dispositivo	397,27	5.6	
9	Plasma	4,73	3.6	0.6
	Kit del dispositivo	1,15	3.0	

Tabla 6B

Muestra	Descripción	Copias de ARN/ml	Log ₁₀ de ARN	Diferencia de Log ₁₀
1	Plasma	18,20	4.2	0.5
	Kit del dispositivo	4,88	3.6	
1	Plasma	49,22	4.6	0.4
	Kit del dispositivo	16,55	4.2	
1	Plasma	<7	NA	NA
	Kit del dispositivo	<7	NA	
1	Plasma	<7	NA	NA
	Kit del dispositivo	<7	NA	
1	Plasma	<7	NA	NA
	Kit del dispositivo	<7	NA	
1	Plasma	458,60	5.6	0.3
	Kit del dispositivo	224,34	5.3	
1	Plasma	41	2.6	0.6
	Kit del dispositivo	10	2.0	
1	Plasma	26,11	4.4	0.5
	Kit del dispositivo	7,86	3.9	
1	Plasma	40,85	4.6	0.5
	Kit del dispositivo	12,05	4.0	
1	Plasma	2,08	3.3	0.7
	Kit del dispositivo	37	2.5	
2	Plasma	225,36	5.3	0.4
	Kit del dispositivo	88,64	4.9	
2	Plasma	32,48	4.5	0.4
	Kit del dispositivo	11,19	4.0	

Tabla 7

Muestra	Descripción	Copias de ARN/ml	Log ₁₀ de ARN	Log ₁₀ de ARN medio	Varianza del Log ₁₀ media*
3	Kit del dispositivo	87	2.9		
	Kit del dispositivo	64	2.8		
	Kit del dispositivo	52	2.7	2.8	0.0
	Kit del dispositivo	59	2.7		
	Kit del dispositivo	81	2.9		
	Kit del dispositivo				
3	Kit del dispositivo	16,70	4.2		
	Kit del dispositivo	21,50	4.3		
	Kit del dispositivo	19,05	4.2	4.2	0.0
	Kit del dispositivo	19,55	4.2		
	Kit del dispositivo	22.37	4.3		
	Kit del dispositivo				
3	Kit del dispositivo	130,00	5.1		
	Kit del dispositivo	110,50	5.0		
	Kit del dispositivo	95,00	4.9	5.0	0.0
	Kit del dispositivo	120,00	5.0		
	Kit del dispositivo	138,00	5.1		

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo (20) para recoger, almacenar o transportar una muestra biológica, comprendiendo dicho dispositivo:
 - (a) un recipiente que define un espacio interior que tiene paredes laterales (22), un fondo (24) y una tapa que se puede abrir (26) que tiene una extensión (25) de tapa para montar en ella una matriz (30);
 - 5 (b) una matriz (30) montada de forma retirable en la extensión de la tapa del recipiente, en el que la matriz se puede comprimir en al menos 20% de su volumen saturado y puede absorber un volumen de al menos 0,1 ml de una suspensión líquida que comprende una muestra biológica,
 - (c) un secante (40) dentro del recipiente, separado de la matriz por una barrera permeable al aire (42) y en comunicación vaporosa con dicha matriz, y
 - 10 (d) un indicador colorimétrico del contenido de agua en el secante.
2. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que la matriz puede absorber al menos 0,5 ml de la suspensión líquida que comprende la muestra biológica.
3. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que la matriz puede absorber 1,0 ml de la suspensión líquida que comprende la muestra biológica.
- 15 4. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que la matriz se puede comprimir en al menos 50% de su volumen saturado.
5. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que la matriz se puede comprimir en al menos 90% de su volumen saturado.
- 20 6. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicha matriz tiene forma tridimensional, seleccionada del grupo que consiste en un cilindro, cubo, esfera, pirámide, o cono.
7. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicha matriz tiene forma de un cilindro de alrededor de 20 mm de longitud y 8 mm de diámetro.
- 25 8. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicha matriz comprende un material absorbente seleccionado del grupo que consiste en fibras de acetato de celulosa, celulosa, nitrocelulosa, carboximetilcelulosa, polímeros hidrófilos, polipropileno, poliéster, poliamida, polímeros de hidratos de carbono, politetrafluoroetileno, algodón, fibra de vidrio, y sus combinaciones.
9. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicha muestra biológica contiene un analito de interés seleccionado del grupo que consiste en ácidos nucleicos, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, células completas, fragmentos celulares, virus completo y fragmentos víricos.
- 30 10. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicha muestra biológica contiene un analito de interés seleccionado del grupo que consiste en ADN y ARN.
11. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicha muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, plasma, suero, linfa, fluido sinovial, orina, saliva, esputo, semen, lavado vaginal, médula ósea, fluido cerebroespinal, líquidos corporales fisiológicos, líquidos corporales patológicos, y sus combinaciones.
- 35 12. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicha suspensión líquida que comprende dichas muestras biológicas comprende además suspensiones celulares, extractos líquidos, homogenados tisulares, medios procedentes de la síntesis de ADN o ARN, disolución salina, o sus combinaciones.
13. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicho secante se selecciona del grupo que consiste en arcilla montmorillonítica, cloruro de litio, alúmina activada, aluminosilicato alcalino, Briquetas DQ11, gel de sílice, tamiz molecular, sulfato de calcio, y óxido de calcio.
- 40 14. Un kit para recuperar una muestra biológica seca, comprendiendo dicho kit:
 - (a) el dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-13,
 - (b) un tampón de reconstitución,
 - (c) un dispositivo de compresión, y
 - 45 (d) protocolos para la preparación y recuperación de dicha muestra biológica.

15. Un método para recoger, almacenar o transportar una muestra biológica en el dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, comprendiendo dicho método:
- (a) aplicar a la matriz del dispositivo una suspensión líquida que comprende la muestra biológica que contiene analitos de interés; y
- 5 (b) cerrar herméticamente la tapa en el dispositivo para la recogida, almacenamiento o transporte.
16. El método de la reivindicación 15, en el que el volumen de la suspensión líquida es al menos 0,5 ml.
17. El método de la reivindicación 15, en el que el volumen de la suspensión líquida es al menos 1,0 ml.
18. El método de la reivindicación 15, en el que la matriz se puede comprimir en al menos 50% de su volumen saturado.
- 10 19. El método de la reivindicación 15, en el que la matriz se puede comprimir en al menos 75% de su volumen saturado.
20. El método de la reivindicación 15, en el que la matriz se puede comprimir en al menos 90% de su volumen saturado.
- 15 21. El método de la reivindicación 15, en el que dicha matriz tiene forma tridimensional seleccionada del grupo que consiste en un cilindro, cubo, esfera, pirámide, o cono.
22. El método de la reivindicación 15, en el que dicha matriz tiene forma de un cilindro de alrededor de 20 mm de longitud y 8 mm de diámetro.
23. El método de la reivindicación 15, en el que la tapa del recipiente tiene una extensión de la tapa con la matriz montada de forma retirable sobre ella.
- 20 24. El método de la reivindicación 15, en el que dicha matriz comprende un material absorbente seleccionado del grupo que consiste en fibras de acetato de celulosa, celulosa, nitrocelulosa, carboximetilcelulosa, polímeros hidrófilos, polipropileno, poliéster, poliamida, polímeros de hidratos de carbono, politetrafluoroetileno, algodón, fibra de vidrio, y sus combinaciones.
- 25 25. El método de la reivindicación 15, en el que la muestra biológica contiene un analito de interés seleccionado del grupo que consiste en ácidos nucleicos, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, células completas, fragmentos celulares, virus completo y fragmentos víricos.
26. El método de la reivindicación 15, en el que la muestra biológica contiene un analito de interés seleccionado del grupo que consiste en ADN y ARN.
- 30 27. El método de la reivindicación 15, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, plasma, suero, linfa, fluido sinovial, orina, saliva, esputo, semen, lavado vaginal, médula ósea, fluido cerebroespinal, líquidos corporales fisiológicos, líquidos corporales patológicos, y sus combinaciones.
28. El método de la reivindicación 15, en el que dicha suspensión líquida que comprende dicha muestra biológica comprende además suspensiones celulares, extractos líquidos, homogenados tisulares, medios procedentes de la síntesis de ADN o ARN, disolución salina, o sus combinaciones.
- 35 29. El método de la reivindicación 15, en el que dicho secante se selecciona del grupo que consiste en arcilla montmorillonítica, cloruro de litio, alúmina activada, alumino-silicato alcalino, gel de sílice, tamiz molecular, sulfato de calcio, y óxido de calcio.
30. El método de la reivindicación 15, en el que el método comprende además recuperar la muestra biológica que comprende las etapas posteriores de:
- 40 (a) aplicar tampón de reconstitución a la matriz que contiene la muestra biológica seca; y
- (b) eliminar de la matriz la muestra biológica.
31. El método de la reivindicación 30, en el que dicho tampón de reconstitución comprende disolución salina tamponada con fosfato (PBS) o agua libre de nucleasas.
- 45 32. El método de la reivindicación 30, en el que dicho tampón de reconstitución comprende azida sódica u otro agente antimicrobiano.

33. El método de la reivindicación 30, en el que la etapa de retirada se logra comprimiendo la matriz.
34. El método de la reivindicación 33, en el que la compresión se logra retirando la matriz del recipiente y colocando la matriz en un cilindro de jeringuilla y aplicando fuerza allí a un émbolo de vaivén.
35. El método de la reivindicación 30, en el que la etapa de retirada se logra centrifugando la matriz.
- 5 36. Un método para recuperar una muestra biológica de una matriz en el dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, comprendiendo dicho método:
- (a) aplicar tampón de reconstitución a la matriz para rehidratar dicha muestra biológica; y
- (b) eliminar de la matriz la muestra biológica.
- 10 37. El método de la reivindicación 36, en el que el volumen del tampón de reconstitución es aproximadamente el mismo que el volumen de al menos 0,1 ml de una suspensión líquida previamente absorbida en él.
38. El método de la reivindicación 37, en el que el volumen de la suspensión líquida es al menos 0,5 ml.
39. El método de la reivindicación 37, en el que el volumen de la suspensión líquida es al menos 1,0 ml.
40. El método de la reivindicación 36, en el que dicho tampón de reconstitución comprende disolución salina tamponada con fosfato (PBS) o agua libre de nucleasas.
- 15 41. El método de la reivindicación 36, en el que dicho tampón de reconstitución comprende azida sódica u otro agente antimicrobiano.
42. El método de la reivindicación 36, en el que la etapa de retirada se logra comprimiendo la matriz.
43. El método de la reivindicación 42, en el que la compresión se logra retirando la matriz del recipiente y colocando la matriz en un cilindro de jeringuilla y aplicando fuerza allí a un émbolo de vaivén.
- 20 44. El método de la reivindicación 36, en el que la etapa de retirada se logra centrifugando la matriz.
45. El método de la reivindicación 36, en el que la muestra biológica contiene un analito de interés seleccionado del grupo que consiste en ácidos nucleicos, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, células completas, fragmentos celulares, virus completo y fragmentos víricos.
- 25 46. El método de la reivindicación 36, en el que la muestra biológica contiene un analito de interés seleccionado del grupo que consiste en ADN y ARN.

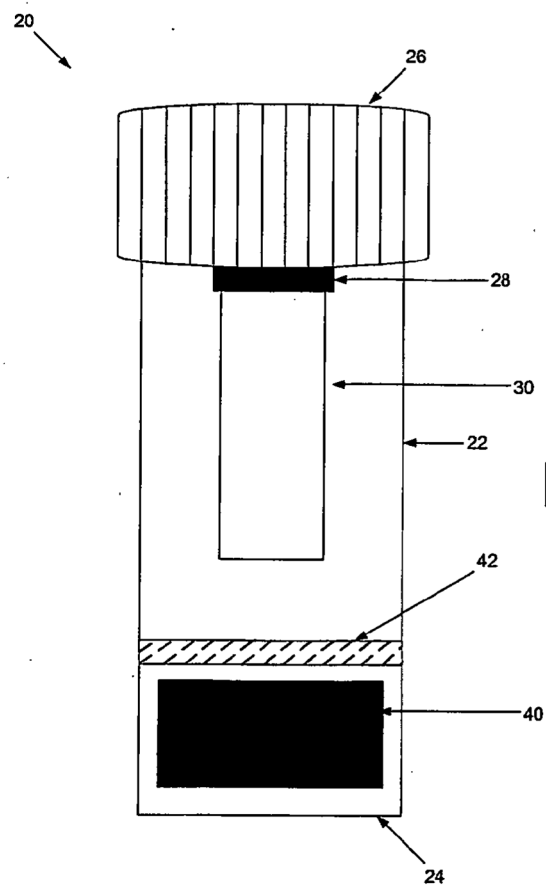


Fig. 1A

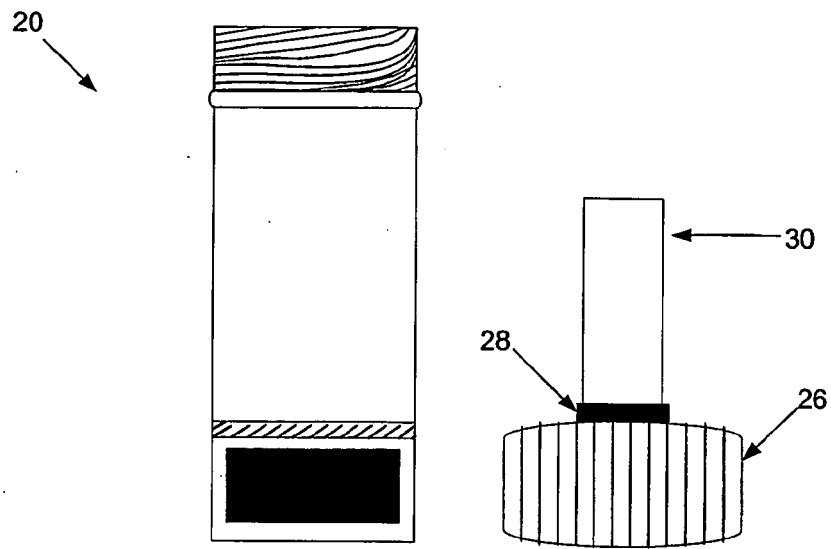


Fig. 1B

Fig. 2

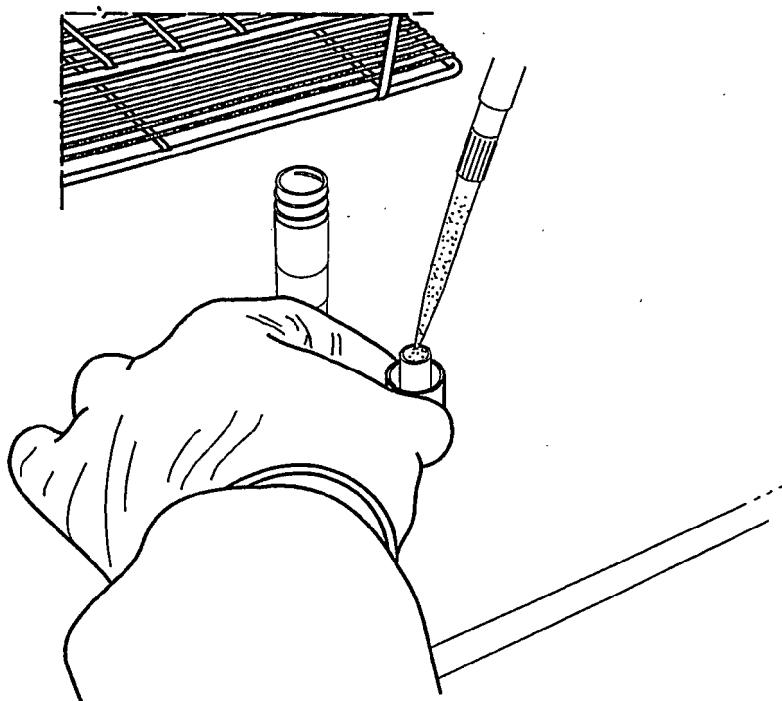
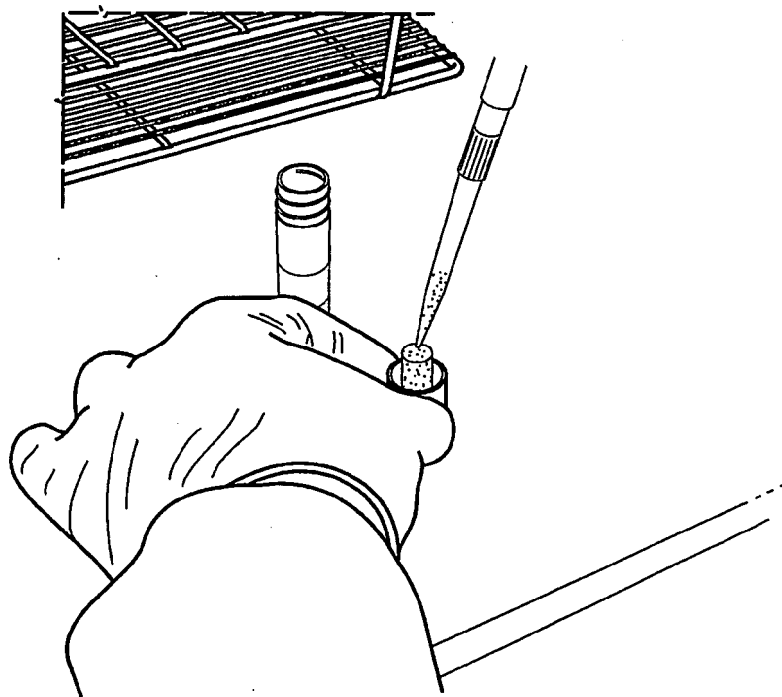


Fig. 3



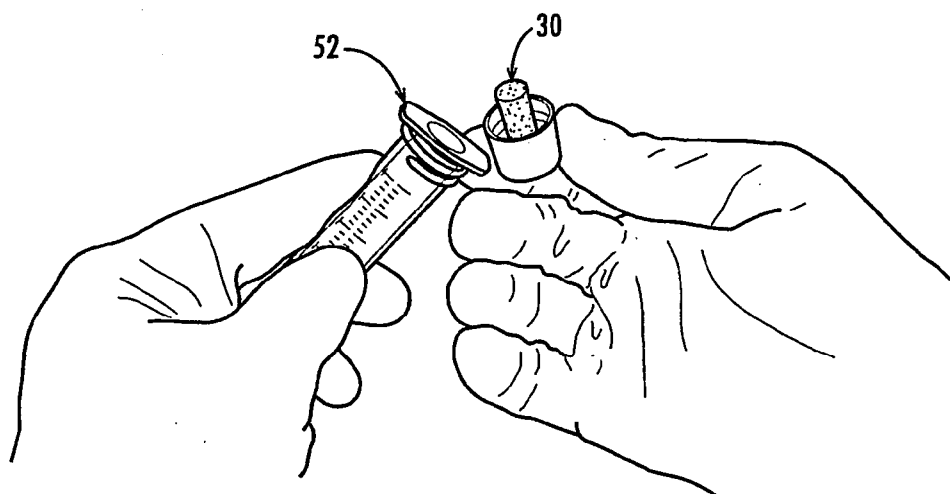


Fig. 4

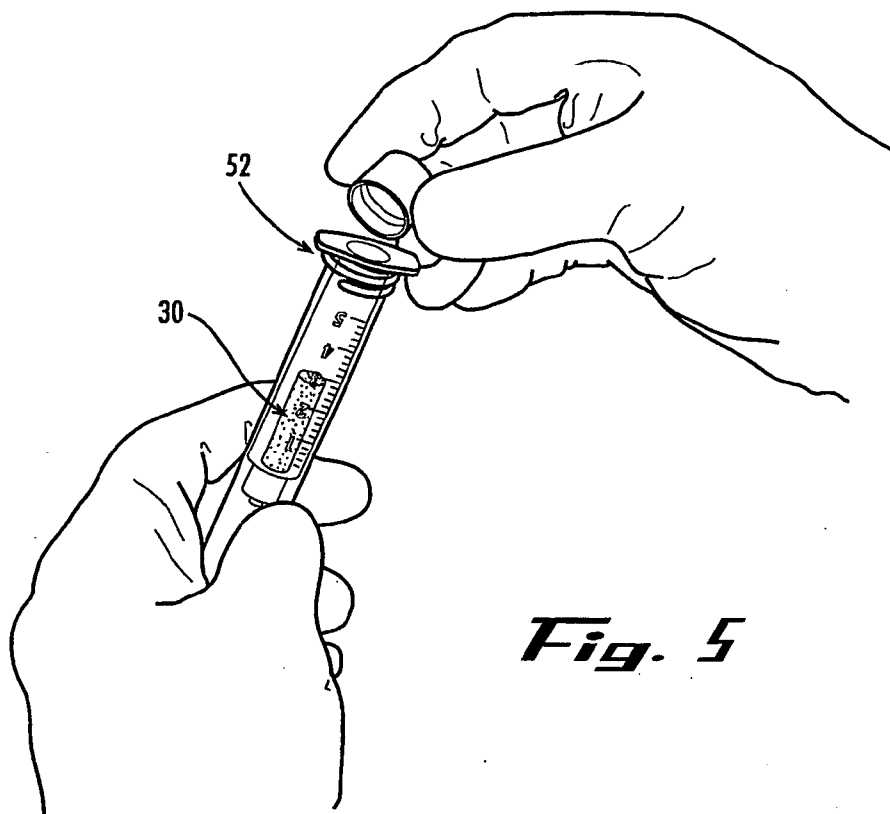


Fig. 5

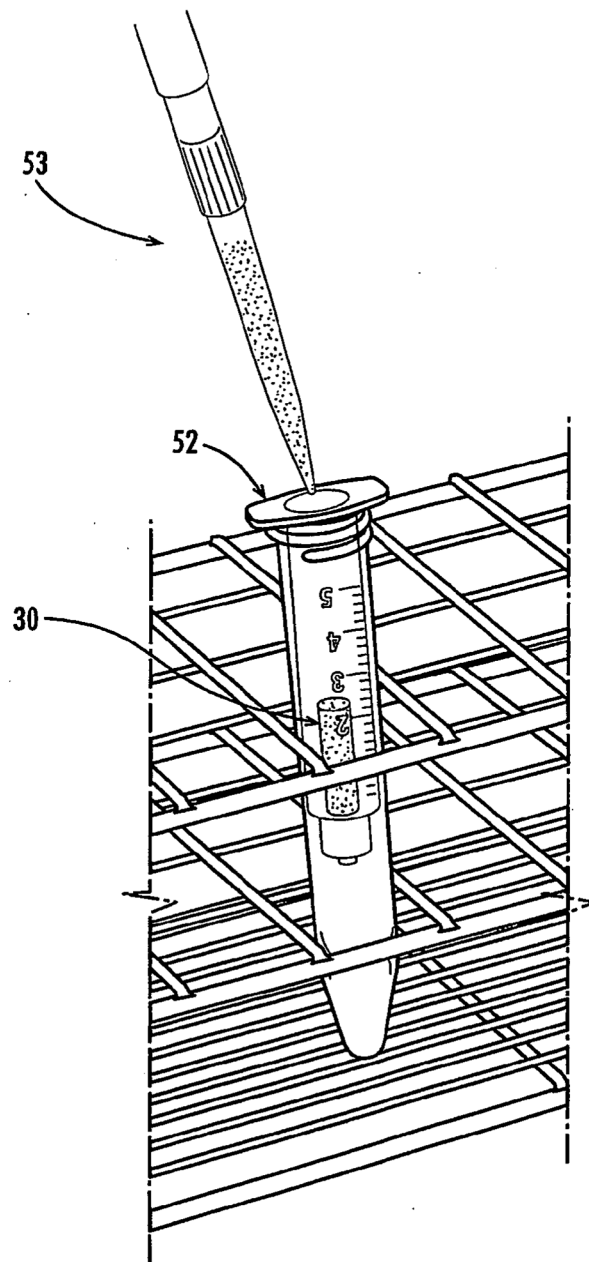


Fig. 6

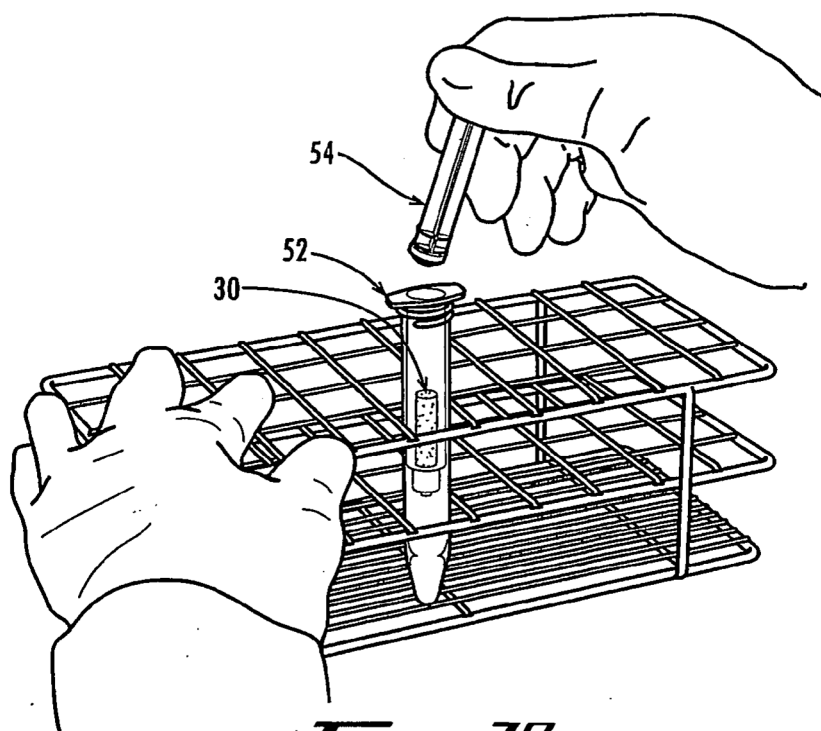


Fig. 7A

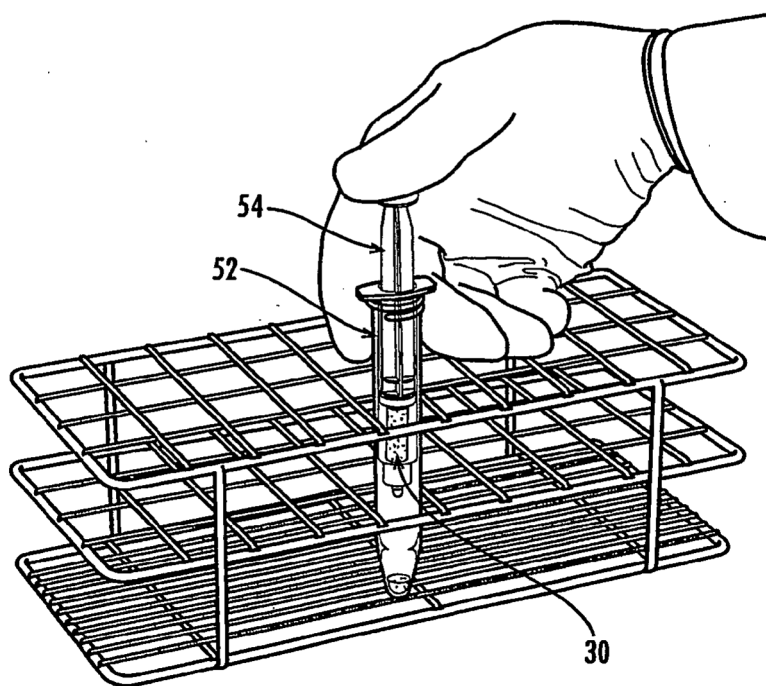


Fig. 7B

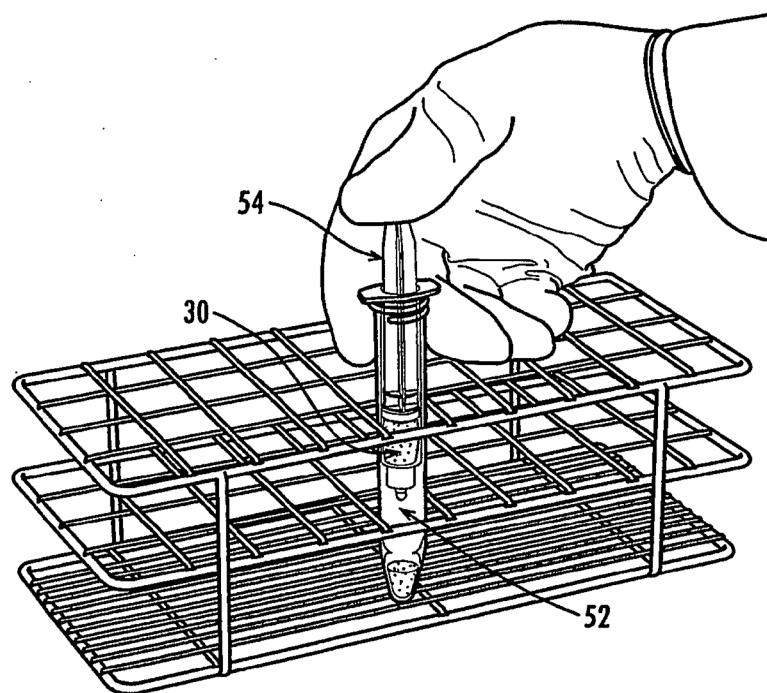


Fig. 11

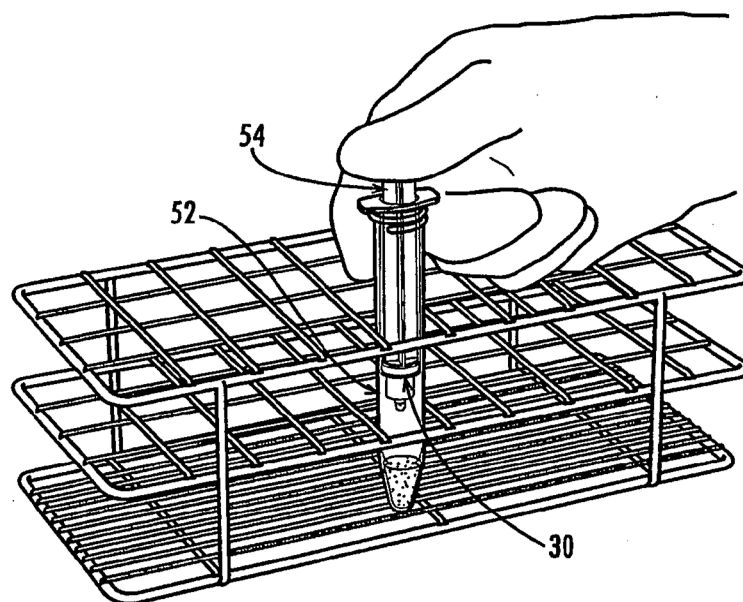


Fig. 10