(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 665 252**

(51) Int. CI.:

C12N 15/10 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)
B01L 7/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2008.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2012 PCT/US2012/071301**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2013 WO13101743**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2012 E 12863486 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2872523**

(54) Título: **Purificación de ácido nucleico de microorganismos a partir de muestras del hospedador**

(30) Prioridad:

30.12.2011 US 201161582035 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.04.2018

(73) Titular/es:

ABBOTT MOLECULAR INC. (100.0%)
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018, US

(72) Inventor/es:

MARBLE, HERBERT A. y
LAFFLER, THOMAS

(74) Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

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

Purificación de ácido nucleico de microorganismos a partir de muestras del hospedador

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente descripción se refiere a sistemas, dispositivos y procedimientos para purificar ácido nucleico de microorganismos a partir de una muestra de un hospedador, como una muestra de sangre completa de un ser humano. En ciertas realizaciones, se emplean dispositivos y sistemas con filtros múltiples y se proporciona la eliminación selectiva de células sanguíneas y ácidos nucleicos del hospedador de una muestra para enriquecer el ácido nucleico del microorganismo.

ANTECEDENTES

[0002] Los procedimientos de detección de ácidos nucleicos son muy sensibles. Tales procedimientos, sin embargo, por lo general requieren algún nivel de preparación o procesamiento de las muestras previamente. Por ejemplo, normalmente se requiere el enriquecimiento o la purificación del ácido nucleico de otros componentes presentes en la muestra. Dichos componentes pueden causar la degradación del ácido nucleico, la inhibición de la detección del ácido nucleico e incluso el enmascaramiento de la detección del ácido nucleico. El nivel de preparación de la muestra requerido puede dificultar la detección de ácido nucleico fuera del laboratorio. El transporte de muestras a un laboratorio para la detección de ácidos nucleicos también puede ser difícil. Por ejemplo, las muestras generalmente se deben recolectar en condiciones estériles para minimizar la contaminación y la degradación de estas. La refrigeración, la congelación y la adición de conservantes y/o estabilizantes también deben emplearse generalmente para minimizar y retrasar la degradación de la muestra.

[0003] Los procedimientos para separar ácido nucleico de otros componentes en una muestra líquida bruta se describen en la patente de EE.UU. N.º 8.043.811. El procedimiento para extraer ácido nucleico de células, amplificando segmentos de ácido nucleico y detectar ácido nucleico se describe en la patente de EE.UU. N.º 8.017.340. Un procedimiento de alto rendimiento y un dispositivo para aislar y cuantificar ARNm directamente de sangre completa se describen en la patente de EE.UU. N.º 7.939.300. Los procedimientos para separar inhibidores de ácido nucleico en una muestra se describen en la patente de EE.UU. N.º 7.939.249. Los procedimientos para el aislamiento selectivo de ácido nucleico a partir de células microbianas que están presentes en una muestra compuesta que comprende células y/o tejidos eucarióticos superiores se describen en la patente de EE.UU. N.º 7.893.251. Los procedimientos para separar y purificar ARN se describen en la patente de EE.UU. N.º 7.884.201. Un aparato de procesamiento de muestra se describe en la patente de EE.UU. N.º 7.718.421. Los procedimientos para detectar la presencia de un patógeno bacteriano en una muestra clínica, tal como sangre completa, se describen en la patente de EE.UU. N.º 7.718.361. Los procedimientos para determinar la cantidad de ácidos nucleicos en una muestra se describen en la patente de EE.UU. N.º 7.608.399. La patente de EE.UU. N.º 2011/0300609 describe un aparato de extracción de ácido nucleico. La patente de EE.UU. N.º 2011/0294199 (véase, también, la patente de EE.UU. N.º 2011/0294122 y el documento WO 2011/150115) describe un aparato para detectar un ácido nucleico en una muestra. El documento WO 2011/124709 describe un dispositivo cromatográfico para aislar y purificar ácidos nucleicos de contaminantes mediante cromatografía de filtración en gel. El documento WO 2010/039987 describe un procedimiento para detectar ácidos nucleicos en una muestra de sangre. El documento WO 2010/009415 describe un dispositivo microfluídico que comprende una pluralidad de filtros para aislar ADN de una muestra. El documento WO 93/11221 describe un dispositivo y un procedimiento para purificar ácido nucleico de una muestra usando una única capa de filtro con tamaño de poro decreciente. El documento CN 101113437 se refiere a la separación de ácidos nucleicos de una muestra usando un dispositivo de filtro que comprende una pluralidad de membranas.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0004] La presente descripción proporciona sistemas, dispositivos y procedimientos para purificar el ácido nucleico de un microorganismo a partir de una muestra de un hospedador, tal como una muestra de sangre completa de un ser humano. En ciertas realizaciones, se emplean dispositivos y sistemas con filtros múltiples y se proporciona la eliminación selectiva de células sanguíneas y ácidos nucleicos del hospedador a partir de una muestra para enriquecer el ácido nucleico del microorganismo.

[0005] En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona dispositivos de purificación de múltiples etapas que comprenden: a) un recipiente de contención de la muestra, en el que el recipiente de contención de la

muestra comprende un extremo proximal y un extremo distal, b) un primer filtro que comprende poros de aproximadamente 10-20 µm de tamaño, colocado dentro del recipiente; c) un segundo filtro que comprende poros de aproximadamente 1-2 µm de tamaño, colocado dentro del recipiente y distal al primer filtro; y d) un tercer filtro que comprende poros de aproximadamente 0,1 µm de tamaño, colocado dentro del recipiente distal al primer y al segundo filtro; en el que los filtros primero, segundo y tercero están posicionados adicionalmente dentro del recipiente de contención de la muestra de modo que el líquido que pasa desde el extremo proximal al extremo distal del recipiente de contención de la muestra pasa a través del primer, segundo y tercer filtros.

[0006] En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona dispositivos de purificación de múltiples etapas que comprenden: a) un recipiente de contención de la muestra, en el que el recipiente de contención de la muestra comprende un extremo proximal y un extremo distal, b) un primer filtro que comprende poros de aproximadamente 10-20 µm de tamaño (por ejemplo, aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 µm de tamaño) colocados dentro del recipiente; c) un segundo filtro que comprende poros de aproximadamente 1-2 µm de tamaño (por ejemplo, aproximadamente 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,0 o 2,0 µm de tamaño), colocados dentro del recipiente y distal al primer filtro; y d) un tercer filtro que comprende poros de aproximadamente 0,1 µm de tamaño (por ejemplo, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15 o 0,16 mm de tamaño), colocados dentro del recipiente distal al primer y segundo filtro; en el que los filtros primero, segundo y tercero están posicionados adicionalmente dentro del recipiente de contención de la muestra de modo que el fluido que pasa desde el extremo proximal al extremo distal del recipiente de contención de la muestra pasa a través del primer, segundo y tercer filtros.

[0007] En realizaciones adicionales, la presente descripción proporciona dispositivos de purificación multietapa que comprenden: a) un recipiente de contención de la muestra (por ejemplo, configurado para insertarse en una centrífuga o dispositivo de agitación), en el que dicho recipiente de contención de la muestra comprende un extremo proximal y un extremo distal, b) un primer filtro que comprende poros de aproximadamente 10-20 µm de tamaño, colocado dentro de dicho recipiente; c) un segundo filtro que comprende poros de aproximadamente 1-2 µm de tamaño, colocado dentro de dicho recipiente y distal a dicho primer filtro; d) un tercer filtro que comprende poros de aproximadamente 0,1 µm de tamaño, colocado dentro de dicho recipiente distal a dichos primer y segundo filtros; en donde dichos primer, segundo y tercer filtros están posicionados adicionalmente dentro de dicho recipiente de contención de muestras de manera que el fluido que pasa desde dicho extremo proximal a dicho extremo distal de dicho recipiente de contención de la muestra pasa a través de dichos primer, segundo y tercer filtros; y c) un filtro de captura de afinidad que comprende moléculas de unión por afinidad, donde dicho filtro de captura de afinidad está posicionado dentro de dicho recipiente distal a dichos primer, segundo y tercer filtros, y además posicionado de manera que dicho líquido pasa desde dicho extremo proximal abierto hasta dicho extremo distal cerrado de dicho recipiente de contención de la muestra a través de dicho filtro de captura de afinidad.

[0008] Los filtros descritos en este documento se pueden usar en cualquier combinación en los dispositivos, sistemas y procedimientos de este documento. Por ejemplo, los dispositivos y sistemas de la presente descripción pueden tener solo, o al menos: el primer y segundo filtro; el segundo y tercer filtro; el primer y tercer filtro; del primer, segundo y tercer filtro. Cualquiera de estas combinaciones puede incluir, o no incluir, un filtro de captura de afinidad.

[0009] En ciertas realizaciones, los dispositivos comprenden además un filtro de captura de afinidad que comprende moléculas de unión por afinidad, en el que el filtro de captura de afinidad está posicionado dentro del recipiente distal al primer, segundo y tercer filtros, y además posicionado de modo que el líquido que pasa desde el extremo proximal abierto al extremo distal cerrado del recipiente de contención de la muestra pasa a través del filtro de captura de afinidad. En realizaciones adicionales, las moléculas de unión de afinidad comprenden secuencias de ácido nucleico repetitivas humanas (por ejemplo, ARN y ADN). En otras realizaciones, el recipiente de contención de la muestra está configurado para insertarse en una centrífuga o dispositivo de agitación. En otras realizaciones, el recipiente de contención de la muestra tiene una forma de tipo tubo. En realizaciones adicionales, el extremo proximal está abierto y el extremo distal está cerrado.

[0010] En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona métodos para purificar una muestra que comprenden: a) proporcionar: i) una muestra que comprende células humanas y que se sospecha que contiene patógenos que comprenden ácido nucleico patógeno; y ii) un dispositivo de purificación multietapa que comprende: A) un recipiente de contención de muestra (por ejemplo, configurado para insertarse en una centrífuga o dispositivo de agitación), en el que el recipiente de contención de la muestra comprende un extremo proximal y un extremo distal, B) un primer filtro que comprende poros de aproximadamente 10-20 µm de tamaño (por ejemplo, aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 µm de tamaño), colocados dentro del recipiente; C) un segundo filtro que comprende poros de aproximadamente 1-2 µm de tamaño (por ejemplo, aproximadamente 1,0,

1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,0 o 2,0 µm de tamaño), colocados dentro del recipiente y distal al primer filtro; y D) un tercer filtro que comprende poros de aproximadamente 0,1 µm de tamaño (por ejemplo, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15 o 0,16 µm de tamaño), colocados dentro del recipiente distal al primer y segundo filtro; en el que los filtros primero, segundo y tercero están situados adicionalmente dentro del recipiente de contención de la muestra de manera que el líquido que pasa desde el extremo proximal al extremo distal del recipiente de contención de la muestra pasa a través del primer, segundo y tercer filtros; y b) verter la muestra en el extremo proximal del recipiente de contención de la muestra y tratar el dispositivo de purificación de múltiples etapas de modo que se recoja, o se eluya, una muestra purificada del extremo distal del recipiente de contención de la muestra, donde la muestra purificada no contiene ninguna o se ha deshecho de un 99 % de las células humanas y comprende al menos una porción del ácido nucleico del patógeno si está originalmente presente en la muestra.

[0011] En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona procedimientos para purificar una muestra que comprenden: a) proporcionar: i) una muestra que comprende células humanas y que se sospecha que contiene patógenos que comprenden ácido nucleico patógeno; y ii) un dispositivo de purificación multietapa que comprende: A) un recipiente de contención de la muestra (por ejemplo, configurado para insertarse en una centrífuga o dispositivo de agitación), en el que el recipiente de contención de la muestra comprende un extremo proximal y un extremo distal, B) un primer filtro que comprende poros de aproximadamente 10-20 µm de tamaño (por ejemplo, de aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 µm de tamaño), colocados dentro del recipiente; C) un segundo filtro que comprende poros de aproximadamente 1-2 µm de tamaño (por ejemplo, de aproximadamente 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,0 o 2,0 µm de tamaño), colocado dentro del recipiente y distal al primer filtro; D) un tercer filtro que comprende poros de aproximadamente 0,1 µm de tamaño (por ejemplo, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15 o 0,16 µm de tamaño), colocados dentro del recipiente distal al primer y segundo filtro; donde los filtros primero, segundo y tercero están posicionados adicionalmente dentro del recipiente de contención de la muestra de modo que el líquido que pasa desde el extremo proximal al extremo distal del recipiente de contención de la muestra pasa a través del primer, segundo y tercer filtro, y E) un filtro de captura por afinidad que comprende moléculas de unión por afinidad, donde dicho filtro de captura por afinidad está situado dentro de dicho recipiente distal a dichos primer, segundo y tercer filtros, y además posicionado de manera que dicho líquido pasa desde dicho extremo proximal abierto hasta dicho extremo distal cerrado de dicho recipiente de contención de la muestra a través de dicho filtro de captura por afinidad; y b) verter la muestra en el extremo proximal del recipiente de contención de la muestra y tratar el dispositivo de purificación de múltiples etapas de modo que se recoja, o se eluya, una muestra purificada del extremo distal del recipiente de contención de la muestra, donde la muestra purificada no contiene ninguna o se ha deshecho de un 99 % de las células humanas y comprende al menos una porción del ácido nucleico del patógeno si está originalmente presente en la muestra.

[0012] En ciertas realizaciones, el ácido nucleico del patógeno es ácido nucleico bacteriano, fúngico o vírico o cualquier mezcla de estos. En ciertas realizaciones, tratar el dispositivo de purificación multietapa comprende centrifugar o agitar el mismo. En otras realizaciones, la centrifugación o agitación hace que el tercer filtro corte mecánicamente al menos algunos de los patógenos, haciendo que liberen el ácido nucleico del patógeno. En realizaciones adicionales, la muestra comprende sangre completa.

[0013] En realizaciones particulares, solo se añaden 1-2 ml de la muestra al dispositivo de purificación multietapa. En otras realizaciones, el volumen total de la muestra purificada está entre 10-100 uL.

[0014] En realizaciones particulares, la presente descripción proporciona sistemas o dispositivos para purificar microorganismos (por ejemplo, microorganismos transmitidos por la sangre) de ácido nucleico de una muestra que comprende: i) un primer filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos (por ejemplo, todos de un hospedador humano u otro animal), y permite el paso de eritrocitos, linfocitos y plaquetas (por ejemplo, todos de un hospedador humano u otro animal); ii) ya sea: a) un segundo filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de eritrocitos, linfocitos y plaquetas (p. ej., de un hospedador humano u otro animal) y permite el paso de microorganismos más pequeños que las plaquetas (p. ej., bacterias, virus, hongos, priones, etc.); o b) ambos de los siguientes: I) un segundo filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de eritrocitos y linfocitos (por ejemplo, todos de un hospedador humano o de otro animal), pero permite el paso de plaquetas y microorganismos más pequeños que las plaquetas, y II) un tercer filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de plaquetas (por ejemplo, plaquetas humanas), pero permite el paso de microorganismos más pequeños que las plaquetas; y iii) un filtro de cizallamiento que corta mecánicamente los microorganismos de modo que se libera el ácido nucleico del microorganismo.

[0015] En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona sistemas o dispositivos para purificar microorganismos (por ejemplo, microorganismos transmitidos por la sangre) de ácido nucleico de una muestra que

comprende: i) un primer filtro de exclusión por tamaño (por ejemplo, con un tamaño de poro de aproximadamente 10 µm) que excluye el paso de linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos (por ejemplo, todos de un hospedador humano u otro animal), y permite el paso de eritrocitos, linfocitos y plaquetas (p. ej., todos de un hospedador humano u otro animal); ii) ya sea: a) un segundo filtro de exclusión por tamaño que (por ejemplo, con un tamaño de poro de aproximadamente 2 µm): excluye el paso de eritrocitos, linfocitos y plaquetas (p. ej., de un ser humano u otro hospedador animal), y permite el paso de microorganismos más pequeños que las plaquetas (por ejemplo, bacterias, virus, hongos, priones, etc.); o b) ambos de los siguientes: I) un segundo filtro de exclusión por tamaño (p. ej., con un tamaño de poro de aproximadamente 2 µm) que excluye el paso de eritrocitos y linfocitos (p. ej., de un hospedador humano u otro animal), pero permite el paso de plaquetas y microorganismos más pequeños que las plaquetas, y II) un tercer filtro de exclusión por tamaño (por ejemplo, con un tamaño de poro de aproximadamente 2 µm) que excluye el paso de plaquetas (p. ej., plaquetas humanas), pero permite el paso de microorganismos más pequeños que las plaquetas; iii) un filtro de cizallamiento (por ejemplo, con un tamaño de poro de aproximadamente 0,1 µm) que corta mecánicamente los microorganismos de manera que se libera el ácido nucleico del microorganismo; y, opcionalmente, iv) un filtro de captura por afinidad que comprende moléculas de unión por afinidad que se unen a ácido nucleico humano o animal (por ejemplo, cuando las moléculas de unión de afinidad se unen a secuencias de ácido nucleico humano repetitivas).

[0016] En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona sistemas o dispositivos para purificar microorganismos (por ejemplo, microorganismos transmitidos por la sangre) de una muestra que comprende: i) un primer filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de linfocitos, monocitos, neutrófilos , eosinófilos y basófilos (por ejemplo, todos de un hospedador humano u otro animal), y permite el paso de eritrocitos, linfocitos y plaquetas (por ejemplo, todos de un hospedador humano u otro animal); ii) ya sea: a) un segundo filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de eritrocitos, linfocitos y plaquetas (p. ej., de un hospedador humano u otro animal) y permite el paso de microorganismos más pequeños que las plaquetas (p. ej., virus, hongos, priones, etc.); o b) ambos de los siguientes: I) un segundo filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de eritrocitos y linfocitos (por ejemplo, todos de un huésped humano o de otro animal), pero permite el paso de plaquetas y microorganismos más pequeños que las plaquetas, y II) un tercer filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de plaquetas (por ejemplo, plaquetas humanas), pero permite el paso a través de microorganismos más pequeños que las plaquetas; iii) un filtro de cizallamiento que corta mecánicamente los microorganismos de modo que se libera el ácido nucleico del microorganismo; y iv) un recipiente de contención de la muestra, en el que el recipiente de contención de la muestra comprende un extremo proximal y un extremo distal, y donde dichos primer y segundo filtros de exclusión por tamaño, y el tercer filtro de exclusión por tamaño, si está presente, y el filtro de cizalla, están ubicados en el recipiente de contención de la muestra.

[0017] En ciertos casos, la presente descripción proporciona un componente seleccionado del grupo que consiste en: una columna de centrifugación, un filtro de placa, un colector de filtro y un dispositivo microfluídico, en donde el componente comprende además: i) un primero filtro de exclusión por tamaño que: excluye el paso de linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos (p. ej., todos de un hospedador humano u otro animal), y permite el paso de eritrocitos, linfocitos y plaquetas (p. ej., de un hospedador humano u otro animal); ii) ya sea: a) un segundo filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de eritrocitos, linfocitos y plaquetas (p ej., de un hospedador humano u otro animal) y permite el paso de microorganismos más pequeños que las plaquetas (p. ej., virus, hongos, priones, etc.); o b) ambos de los siguientes: I) un segundo filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de eritrocitos y linfocitos (por ejemplo, todos de un hospedador humano u otro animal), pero permite el paso de plaquetas y microorganismos más pequeños que las plaquetas, y II) un tercer filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de plaquetas (por ejemplo, plaquetas humanas), pero permite el paso de microorganismos más pequeños que las plaquetas; y iii) un filtro de cizallamiento que corta mecánicamente los microorganismos de modo que se libera el ácido nucleico del microorganismo.

[0018] En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona procedimientos para purificar microorganismos (por ejemplo, microorganismos transmitidos por la sangre) de ácido nucleico de una muestra que comprende: a) mover una muestra biológica a través de un sistema o dispositivo, donde la muestra biológica comprende células humanas y se sospecha que contiene microorganismos, y en donde el sistema o dispositivo comprende: i) un primer filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos (por ejemplo, todos de un ser humano u otro hospedador animal), y permite el paso de eritrocitos, linfocitos y plaquetas (por ejemplo, todos de un ser humano); ii) o bien: A) un segundo filtro de exclusión de tamaño que: excluye el paso a de eritrocitos, linfocitos y plaquetas, y permite el paso de microorganismos más pequeños que las plaquetas; o B) ambos de los siguientes: I) un segundo filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de eritrocitos y linfocitos, pero permite el paso de plaquetas y microorganismos más pequeños que las plaquetas, y II) un tercer filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de plaquetas (por ejemplo, de un

hospedador humano u otro animal), pero permite el paso de microorganismos más pequeños que las plaquetas (por ejemplo, bacterias, virus, hongos, etc.); y iii) un filtro de cizallamiento que corta mecánicamente los microorganismos de modo que se libera el ácido nucleico del microorganismo; y b) recoger una muestra purificada en o desde el sistema o dispositivo, donde la muestra purificada no tiene ninguna o se ha deshecho de un 99 % de las células humanas y comprende al menos una porción del ácido nucleico del microorganismo si los microorganismos están originalmente presentes en la muestra.

[0019] En algunas realizaciones, la muestra biológica comprende sangre completa (por ejemplo, de un animal o ser humano). En realizaciones particulares, la muestra biológica se mueve a través del sistema o dispositivo mediante: fuerza centrífuga, presión positiva o presión negativa.

[0020] En realizaciones particulares, el sistema o dispositivo comprende además un filtro de captura por afinidad que comprende moléculas de unión por afinidad que se unen a ácido nucleico humano o animal. En realizaciones adicionales, las moléculas de unión por afinidad se unen a secuencias de ácido nucleico repetitivas humanas (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico repetitiva presente en un centrómero de un cromosoma del hospedador, una secuencia de ácido nucleico repetitiva presente en un telómero de un cromosoma del hospedador y un elemento repetitivo, codificante, no codificante o intergénico, presente en el ADN del hospedador). En realizaciones particulares, la molécula de unión por afinidad se une a la cola de poliA sobre ARNm. En otra realización, la molécula de unión por afinidad une transcritos de alta abundancia en ARN mensajero (ARNm) o el ADN complementario (ADNc) de aquellos transcriptos de alta abundancia, o secuencias de ARN ribosómico (ARNr).

[0021] En otras realizaciones, el primer filtro de exclusión por tamaño tiene un tamaño de poro de aproximadamente 10 µm, o aproximadamente 10-20 µm, o aproximadamente 9-11 µm. En realizaciones particulares, el segundo filtro de exclusión por tamaño de (ii) (a) tiene un tamaño de poro de aproximadamente 2 µm (por ejemplo, aproximadamente 1-3 µm, aproximadamente 1-2 µm, o aproximadamente 1,8-2,2 µm). En ciertas realizaciones, el segundo filtro de exclusión por tamaño de (ii) (b) tiene un tamaño de poro de aproximadamente 5 µm (por ejemplo, aproximadamente 3-7 µm, aproximadamente 4-6 µm o 4,6-5,4 µm) y el tercer filtro de exclusión por tamaño tiene un tamaño de poro de aproximadamente 2 µm (por ejemplo, aproximadamente 1-3 µm, aproximadamente 1-2 µm, o aproximadamente 1,8-2,2 µm). En realizaciones particulares, el filtro de cizallamiento tiene un tamaño de poro de aproximadamente 0,10 µm (por ejemplo, aproximadamente 0,05-0,25 µm o aproximadamente 0,01-0,4 µm).

[0022] Los filtros descritos en este documento pueden usarse en cualquier combinación en los dispositivos, sistemas y procedimientos de este documento. Por ejemplo, los dispositivos y sistemas de la presente descripción pueden tener solo, o al menos: el primer filtro de exclusión por tamaño y el filtro de cizallamiento; el segundo filtro de exclusión por tamaño y el filtro de cizallamiento; el tercer filtro de exclusión por tamaño y el filtro de cizallamiento; el primer y segundo y/o tercer filtro de exclusión por tamaño; los filtros de exclusión por tamaño segundo y tercero y el filtro de cizallamiento; o los filtros de exclusión por tamaño primero y tercero y el filtro de cizallamiento.

[0023] En algunas realizaciones, los sistemas y dispositivos comprenden además un recipiente de contención de la muestra, donde el recipiente de contención de la muestra comprende un extremo proximal y un extremo distal, y en el que los filtros de exclusión por tamaño primero y segundo, y el tercer filtro de exclusión por tamaño, si están presentes, y el filtro de cizallamiento se encuentran en el recipiente de contención de la muestra. En otras realizaciones, el filtro de cizallamiento está ubicado distal al segundo filtro de exclusión por tamaño, donde el segundo filtro de exclusión por tamaño está ubicado distal al primer filtro de exclusión por tamaño, y en el que el tercer filtro de exclusión por tamaño, si está presente, está ubicado entre el filtro de cizallamiento y el segundo filtro de exclusión por tamaño. En otras realizaciones, el sistema o dispositivo es parte de un componente seleccionado del grupo que consiste en: una columna de centrifugación, un filtro de placa, un colector de filtro y un dispositivo microfluídico.

[0024] En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona procedimientos para purificar microorganismos (por ejemplo, microorganismos transmitidos por la sangre) de ácido nucleico de una muestra que comprende: a) mover una muestra biológica a través de un sistema o dispositivo, donde la muestra biológica comprende células humanas y se sospecha que pueda contener microorganismos, y en donde el sistema o dispositivo comprende: i) un primer filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos (p. ej., todos de un hospedador humano u otro animal) y permite el paso de eritrocitos, linfocitos y plaquetas (por ejemplo, todos de un ser humano); ii) o bien: A) un segundo filtro de exclusión por tamaño que: excluye el paso de eritrocitos, linfocitos y plaquetas, y permite el paso de microorganismos más pequeños que las plaquetas; o B) ambos de los siguientes: I) un segundo filtro de exclusión por tamaño que excluye

el paso de eritrocitos y linfocitos, pero permite el paso de plaquetas y microorganismos más pequeños que las plaquetas, y II) un tercer filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de plaquetas (por ejemplo, de un hospedador humano u otro animal), pero permite el paso de microorganismos más pequeños que las plaquetas (por ejemplo, bacterias, virus, hongos, etc.); iii) un filtro de cizallamiento que corta mecánicamente los microorganismos de modo que se libera el ácido nucleico del microorganismo; y iv) un filtro de unión por afinidad que comprende moléculas de unión por afinidad que se unen a ácido nucleico humano o animal (por ejemplo, cuando las moléculas de unión por afinidad se unen a secuencias de ácido nucleico humano repetitivas); y b) recoger una muestra purificada en o desde el sistema o dispositivo, donde la muestra purificada no contiene o se ha deshecho de un 99 % de las células humanas y comprende al menos una porción del ácido nucleico del microorganismo si los microorganismos están originalmente presentes en la muestra.

[0025] En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona procedimientos para purificar microorganismos (por ejemplo, microorganismos transmitidos por la sangre) de ácido nucleico de una muestra que comprende: a) mover (por ejemplo, fuerza centrífuga, presión positiva o presión negativa) una muestra biológica a través de un sistema o dispositivo que es parte de un componente mayor (por ejemplo, una columna de centrifugación, un filtro de placa, un colector de filtro o un dispositivo microfluídico), donde la muestra biológica comprende células humanas y se sospecha que contiene microorganismos, y en la que el sistema o el dispositivo comprende: i) un primer filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos (p. ej., de un hospedador humano u otro animal) y permite el paso de eritrocitos, linfocitos y plaquetas (por ejemplo, todas de un ser humano); ii) o bien: A) un segundo filtro de exclusión por tamaño que: excluye el paso de eritrocitos, linfocitos y plaquetas, y permite el paso de microorganismos más pequeños que las plaquetas; o B) ambos de los siguientes: I) un segundo filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de eritrocitos y linfocitos, pero permite el paso de plaquetas y microorganismos más pequeños que las plaquetas, y II) un tercer filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de plaquetas (por ejemplo, de un hospedador humano u otro animal), pero permite el paso de microorganismos más pequeños que las plaquetas (por ejemplo, bacterias, virus, hongos, etc.); iii) un filtro de cizallamiento que corta mecánicamente los microorganismos de modo que se libera el ácido nucleico del microorganismo; y iv) un filtro de unión por afinidad que comprende moléculas de unión por afinidad que se unen a ácido nucleico humano o animal (por ejemplo, cuando las moléculas de unión por afinidad se unen a secuencias de ácido nucleico humano repetitivas); y b) recoger una muestra purificada en o desde el sistema o dispositivo, donde la muestra purificada no contiene o se ha deshecho de un 99% de las células humanas y comprende al menos una porción del ácido nucleico del microorganismo si los microorganismos están originalmente presentes en la muestra.

[0026] Con base en la descripción aquí contenida, la presente invención proporciona un sistema o dispositivo para purificar el ácido nucleico del microorganismo a partir de una muestra que comprende:

i) un primer filtro de exclusión por tamaño que: excluye el paso de monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos, y permite el paso de eritrocitos, linfocitos y plaquetas;
ii) un segundo filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de eritrocitos y linfocitos, pero permite el paso de plaquetas y microorganismos más pequeños que las plaquetas;
iii) un tercer filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de plaquetas, pero permite el paso de microorganismos más pequeños que las plaquetas; y
iv) un filtro de cizallamiento que corta mecánicamente dichos microorganismos de modo que se libera el ácido nucleico del microorganismo.

[0027] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para purificar el ácido nucleico del microorganismo a partir de una muestra que comprende:

a) mover una muestra biológica a través de un sistema o dispositivo, donde dicha muestra biológica comprende células humanas y se sospecha que contiene microorganismos, y en el que dicho sistema o dispositivo comprende:

i) un primer filtro de exclusión por tamaño que: excluye el paso de monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos, y permite el paso de eritrocitos, linfocitos y plaquetas;
ii) un segundo filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de eritrocitos y linfocitos, pero permite el paso de plaquetas y microorganismos más pequeños que las plaquetas;
iii) un tercer filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de plaquetas, pero permite el paso de microorganismos más pequeños que las plaquetas; y
iv) un filtro de cizallamiento que corta mecánicamente dichos microorganismos de modo que se libera el ácido nucleico del microorganismo; y

b) recoger una muestra purificada en dicho sistema o dispositivo, en donde dicha muestra purificada no contiene o se ha deshecho de un 99 % de dichas células humanas y comprende al menos una porción de dicho ácido nucleico de microorganismos si los microorganismos están originalmente presentes en dicha muestra.

[0028] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un dispositivo de purificación multietapa que comprende:

a) un recipiente de contención de muestra, en el que dicho recipiente de contención de la muestra comprende un extremo proximal y un extremo distal,

b) un primer filtro que comprende poros de 10-20 µm de tamaño, colocado dentro de dicho recipiente;

c) un segundo filtro que comprende poros de 1-2 µm de tamaño, colocado dentro de dicho recipiente y distal a dicho primer filtro;

d) un tercer filtro que comprende poros de 0,1 µm de tamaño, posicionado dentro de dicho recipiente distal a dichos filtros primero y segundo; en donde dichos primer, segundo y tercer filtros están posicionados adicionalmente dentro de dicho recipiente de contención de la muestra de manera que el líquido que pasa desde dicho extremo proximal a dicho extremo distal de dicho recipiente de contención de la muestra pasa a través de dichos primer, segundo y tercer filtros; y

e) un filtro de captura por afinidad que comprende moléculas de unión por afinidad, donde dicho filtro de captura por afinidad está posicionado dentro de dicho recipiente distal a dichos primer, segundo y tercer filtros, y está además posicionado de manera que dicho fluido pase desde dicho extremo proximal abierto hasta dicho extremo distal cerrado el extremo de dicho recipiente de contención de muestra pasa a través de dicho filtro de captura de afinidad.

[0029] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para purificar una muestra que comprende:

a) proporcionar:

i) una muestra que comprende células humanas y se sospecha que contiene patógenos que comprenden ácido nucleico patógeno; y
ii) un dispositivo de purificación de múltiples etapas que comprende:

A) un recipiente de contención de la muestra, en el que dicho recipiente de contención de la muestra comprende un extremo proximal y un extremo distal,
B) un primer filtro que comprende poros de 10-20 µm de tamaño, colocados dentro de dicho recipiente;
C) un segundo filtro que comprende poros de 1-2 µm de tamaño, colocado dentro de dicho recipiente y distal a dicho primer filtro;
D) un tercer filtro que comprende poros de 0,1 µm de tamaño, colocado dentro de dicho recipiente distal a dichos filtros primero y segundo; en donde dichos primer, segundo y tercer filtros están posicionados adicionalmente dentro de dicho recipiente de contención de la muestra de manera que el fluido que pasa desde dicho extremo proximal a dicho extremo distal de dicho recipiente de contención de la muestra pasa a través de dichos primer, segundo y tercer filtros; y
E) un filtro de unión por afinidad que comprende moléculas de unión por afinidad, donde dicho filtro de unión por afinidad está posicionado dentro de dicho recipiente distal a dichos primer, segundo y tercer filtros, y está además posicionado de manera que dicho líquido que pasa desde dicho extremo proximal abierto hasta dicho extremo distal cerrado de dicho recipiente de contención de la muestra pase a través de dicho filtro de unión por afinidad; y

b) verter dicha muestra en dicho extremo proximal de dicho recipiente de contención de la muestra y tratar dicho dispositivo de purificación multietapa de manera que se recoja o se eluya una muestra purificada de dicho extremo distal de dicho recipiente de contención de la muestra, donde dicha muestra purificada no contiene o se ha deshecho de un 99 % de dichas células humanas y comprende al menos una porción de dicho ácido nucleico patógeno si está originalmente presente en dicha muestra,

opcionalmente en el que dicho dispositivo de purificación multietapa que trata comprende centrifugar o agitar dicho dispositivo de purificación multietapa.

[0030] La presente invención y las realizaciones de esta se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0031]

La Figura 1 proporciona una descripción ejemplar de un filtro de múltiples etapas.
La Figura 2 muestra un dispositivo de extracción microfluídico a modo de ejemplo con diversos tamaños de poro.

DEFINICIONES

[0032] Como se usa en el presente documento, el término "amplificar" o "amplificación" en el contexto de ácidos nucleicos se refiere a la producción de copias múltiples de un polinucleótido, o una porción del polinucleótido, normalmente a partir de una pequeña cantidad del polinucleótido (por ejemplo, una sola molécula de polinucleótido), donde los productos de amplificación o amplicones son generalmente detectables o pueden hacerse detectables. La amplificación de polinucleótidos abarca una variedad de procesos químicos y enzimáticos. La generación de múltiples copias de ADN a partir de una o unas pocas copias de una molécula de ADN objetivo o plantilla durante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o una reacción en cadena de la ligasa (LCR) son formas de amplificación. La amplificación no está limitada a la estricta duplicación de la molécula de partida. Por ejemplo, la generación de múltiples moléculas de ADNc a partir de una cantidad limitada de ARN en una muestra que usa la transcripción inversa (RT)-PCR es una forma de amplificación. Además, la generación de múltiples moléculas de ARN a partir de una única molécula de ADN durante el proceso de transcripción también es una forma de amplificación.

[0033] Como se usa en el presente documento, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido, ya sea producido de forma natural como un digesto de restricción purificado o producido sintéticamente, que es capaz de actuar como un punto de iniciación de la síntesis cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebador que es complementario a una cadena de ácido nucleico (por ejemplo, en presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como un biocatalizador, por ejemplo, una ADN polimerasa o similar, y a una temperatura y pH adecuados). El cebador es típicamente monocatenario para una máxima eficacia en la amplificación, pero alternativamente puede ser de doble cadena. Si es de doble cadena, el cebador generalmente se trata en primer lugar para separar sus hebras antes de usarse para reparar productos de extensión. En algunas realizaciones, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador es suficientemente largo como para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente inductor. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, incluida la temperatura, la fuente del cebador y el uso del método.

[0034] Como se usa en el presente documento, el término "muestra" se refiere a cualquier cosa que pueda analizarse mediante los procedimientos proporcionados en este documento. En algunas realizaciones, la muestra comprende o se sospecha que comprende uno o más ácidos nucleicos capaces de ser analizados por los procedimientos. Preferiblemente, las muestras comprenden ácidos nucleicos (p. ej., ADN, ARN, ADNc, etc.). Las muestras pueden ser muestras complejas o muestras mixtas, que contienen ácidos nucleicos que comprenden múltiples secuencias de ácidos nucleicos diferentes. Las muestras pueden comprender ácidos nucleicos de más de una fuente (por ejemplo, especies diferentes, subespecies diferentes, etc.), sujeto y/o individuo. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en este documento comprenden purificar la muestra o purificar el (los) ácido(s) nucleico(s) de la muestra. En algunas realizaciones, la muestra contiene ácido nucleico purificado. En algunas realizaciones, una muestra proviene de una fuente biológica, clínica, ambiental, de investigación, forense u otra fuente.

[0035] "Enriquecimiento" y "enriquecer" se refiere a un aumento y a aumentar, respectivamente, de la proporción de ácido nucleico de un microorganismo (por ejemplo, microorganismo transportado por la sangre) con respecto al resto de la muestra de sangre completa a medida que pasa la muestra de sangre completa a través del sistema y varios componentes de la muestra de sangre total son excluidos. Los dispositivos, sistemas y métodos de la presente descripción permiten el enriquecimiento del ácido nucleico del microorganismo en una muestra.

[0036] Un "microorganismo transportado por la sangre" pretende abarcar cualquier microorganismo que se pueda encontrar en la sangre. Los ejemplos de microorganismos transmitidos por la sangre incluyen bacterias, virus, hongos y parásitos. Una bacteria, que se puede encontrar en la sangre, puede tener la forma de un coco, tal como un coco que tiene un diámetro de aproximadamente 0,5 µm a aproximadamente 1 µm, o una varilla, tal como una

varilla que tiene un ancho de aproximadamente 0,5 µm a aproximadamente 1 µm y una longitud de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 4 µm. Un virus, que se puede encontrar en la sangre, puede tener un diámetro, por ejemplo, de aproximadamente 0,02 µm a aproximadamente 0,3 µm. Un hongo o parásito, que se pueden encontrar en la sangre, pueden tener un diámetro de aproximadamente 2 µm a aproximadamente 10 µm.

[0037] En ciertas realizaciones, una "muestra de sangre completa" se refiere a una muestra de sangre no procesada de un animal (por ejemplo, animal que contiene sangre o humano). Se puede añadir a la muestra de sangre completa un conservante, tal como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), una sal de citrato (por ejemplo, citrato de sodio), azida de sodio, formalina o timerosal (tiomersal). También se puede añadir a la muestra un conservante de ARN, como ARNsin, ARNlater o un inhibidor de ribonucleasa, para evitar la degradación del ARN; sin embargo, en ciertas realizaciones, los sistemas, dispositivos y procedimientos enriquecen el ADN, en cuyo caso la preservación del ARN es innecesaria. Además, la muestra de sangre completa se puede diluir con un tampón, tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS) o solución salina tamponada con Tris (TBS), antes de introducir la muestra de sangre completa en los sistemas o dispositivos descritos en este documento. Sin embargo, en realizaciones particulares, la muestra de sangre entera no se procesa de otro modo, por ejemplo, se trata con un agente lítico para lisar componentes celulares, tales como eritrocitos y leucocitos.

[0038] Para los fines de la presente descripción, se estima que el diámetro de un eritrocito es de aproximadamente 6,5 µm a aproximadamente 8 µm, se estima que el diámetro de un leucocito es de aproximadamente 6 µm a aproximadamente 20 µm, y se estima que el diámetro de un trombocito (o plaqueta) es de aproximadamente 2 µm a aproximadamente 4 µm. Más específicamente, el diámetro de un leucocito se puede describir adicionalmente con referencia a un tipo específico de leucocito. Por ejemplo, se estima que el diámetro de un linfocito es de aproximadamente 6 µm a aproximadamente 18 µm, se estima que el diámetro de un monocito es de aproximadamente 12 µm a aproximadamente 20 µm, el diámetro de un neutrófilo, un eosinófilo y un basófilo se estima que mide aproximadamente de 12 µm a aproximadamente 15 µm.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0039] La presente descripción proporciona sistemas, dispositivos y métodos para purificar el ácido nucleico de un microorganismo a partir de una muestra de un hospedador, tal como una muestra de sangre completa de un ser humano. En ciertas realizaciones, se emplean dispositivos y sistemas con filtros múltiples y se proporciona la eliminación selectiva de células sanguíneas y ácidos nucleicos hospedadores de una muestra para enriquecer el ácido nucleico del microorganismo.

[0040] En ciertas realizaciones, el volumen de la muestra (por ejemplo, muestra de sangre completa) introducida en el sistema o dispositivo depende, al menos en parte, del tamaño del sistema o dispositivo. En general, el volumen de la muestra en relación con el tamaño del sistema o dispositivo no debe ser tan grande como para obstruir uno o más de los filtros de exclusión por tamaño. Si el sistema o dispositivo es parte de una columna de centrifugación, por ejemplo, se puede introducir en el sistema un volumen de muestra (por ejemplo, sangre completa), por ejemplo, de aproximadamente 1 mL a aproximadamente 1,5 mL, o para columnas de centrifugado más grande, se pueden introducir 5-7 mL. En ciertas realizaciones, si el volumen de muestra introducido en el sistema es de aproximadamente 1-2 mL, el volumen del eluido final (por ejemplo, el ácido nucleico enriquecido recogido) puede ser una pequeña fracción del volumen de entrada (por ejemplo, ~0,1).

[0041] Se puede usar cualquier filtro de exclusión por tamaño adecuado en los sistemas y dispositivos de la presente descripción. Los ejemplos de fabricantes de filtro de exclusión por tamaño adecuados incluyen, entre otros, Millipore, Whatman, Pall y Nalgene. Un ejemplo de un filtro de exclusión por tamaño es el acetato de nailon, tal como el acetato de nailon de 0,2 µ o 0,45 µ (o un filtro de exclusión por tamaño de acetato de celulosa de 0,2 µ 0,45 µ).

[0042] En general, la porosidad (es decir, el tamaño de los poros) de los filtros de exclusión por tamaño disminuye desde el primer filtro hasta el último filtro a medida que la muestra se desplaza a través de los dispositivos o sistemas descritos en este documento. En algunas realizaciones, la porosidad de un filtro de exclusión por tamaño al siguiente filtro de exclusión por tamaño puede disminuir al menos aproximadamente 10 veces, o aproximadamente 15 veces o incluso aproximadamente 20 veces. En ciertas realizaciones, se usan al menos tres filtros de exclusión por tamaño, o cuatro filtros de exclusión por tamaño o más. En realizaciones particulares, cuando se usan más filtros, la disminución en la porosidad de un filtro de exclusión por tamaño al siguiente filtro de exclusión por tamaño puede disminuir al menos, aproximadamente, 5 veces. Por ejemplo, el primer filtro de exclusión por tamaño puede tener un tamaño de poro de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 20 µm, o aproximadamente 10 µm. El segundo filtro de exclusión por tamaño puede tener un tamaño de poro de aproximadamente 2 µm, o el

segundo filtro de exclusión por tamaño puede tener un tamaño de poro de aproximadamente 5 µm y el tercer filtro de exclusión por tamaño puede tener un tamaño de poro de aproximadamente 2 µm. El filtro de cizallamiento puede tener un tamaño de poro de aproximadamente 0,10 µm. En ciertas realizaciones, el filtro de cizallamiento está configurado de manera que puede cortar mecánicamente microorganismos transmitidos por la sangre, tales como bacterias y virus. En realizaciones particulares, los métodos no usan (y los dispositivos y sistemas no contienen) uno o más agentes líticos químicos para lisar microorganismos transmitidos por la sangre, tales como bacterias y virus.

[0043] Se puede usar cualquier capa de unión por afinidad adecuada en los sistemas y dispositivos descritos en este documento. Los ejemplos de capas de unión por afinidad derivadas de ADN adecuadas incluyen, pero sin limitarse, ADN-celulosa, ADN-sefarosa, ADN-sílice y ADN-látex (un núcleo de poliestireno con una superficie de metacrilato de glicidilo). Para ejemplos más específicos, ver, por ejemplo, membranas de acetato de celulosa de Whatman (véase la página web de Whatman), acetato de celulosa, nitrato de celulosa, politetrafluoroetileno (PTFE), polietersulfona (PES), celulosa regenerada, policarbonato y membranas de poliamida de Sartorius (véase la página web de Sartorius), acetato de celulosa y membranas de éster de celulosa mixta (MCE) de Advantec MFS, Inc. (véase la página web de Advantec MFS), y acetato de celulosa, PES y membranas MCE de Membrane Solutions (véase la página web de Membrane-Solutions). También pueden emplearse otras superficies y membranas (por ejemplo, vidrio de poro controlado). El ácido nucleico puede modificarse para obtener derivados químicamente e inmovilizarse sobre estas superficies usando, por ejemplo, amino, carboxilo u otro grupo reactivo (por ejemplo, químicas de unión covalente).

[0044] En ciertas realizaciones, la capa de unión por afinidad se une a una secuencia de ácido nucleico repetitiva presente en la muestra (por ejemplo, muestra de sangre completa). La secuencia de ácido nucleico repetitiva puede ser de la fuente de la muestra de sangre completa (por ejemplo, el animal, tal como un mamífero, por ejemplo, un ser humano, y no del microorganismo transportado por la sangre). Los ejemplos de una secuencia de ácido nucleico repetitiva incluyen una secuencia de ácido nucleico repetitiva presente en un centrómero de un cromosoma del hospedador (o fragmento de secuencia de este), una secuencia de ácido nucleico repetitiva presente en un telómero (o región subtelomérica) de un cromosoma del hospedador (o secuencia fragmento de esta), y un elemento repetitivo, ya sea codificante, no codificante o intergénico, presente en el ADN del hospedador. La secuencia de ácido nucleico repetitiva puede ser una cola poliA de ARNm. Los ejemplos específicos de ácido nucleico repetitivo humano incluyen secuencias repetidas de Alu, repeticiones Cot-1, LINE (elementos nucleares largos intercalados, por ejemplo, LINE-1 y LINE-2), SINE (elementos nucleares cortos intercalados), ADN satélite o ADN microsatélite. En ciertas realizaciones, la capa de unión por afinidad se une a más de una secuencia de ácido nucleico repetitiva, tal como dos, tres o incluso más secuencias de ácido nucleico repetitivas. Cuando la capa de unión por afinidad une secuencias de ácido nucleico repetitivas que se producen en todo el genoma de la fuente de la muestra (p. ej., muestra de sangre completa) aumenta la capacidad de unión y la capacidad de unión de la membrana de unión por afinidad y el enriquecimiento del ácido nucleico del microorganismo de transmisión hemática presente en la muestra aumenta. Dichas secuencias de ácido nucleico repetitivas pueden estar en forma de un grupo de oligonucleótidos sintéticos, que pueden modificarse para obtener derivados según sea necesario e inmovilizarse en un soporte sólido (por ejemplo, ADN-celulosa, ADN-sefarosa, ADN-sílice, ADN-látex, o similares).

[0045] La muestra (por ejemplo, muestra de sangre) se puede mover a través de los sistemas y dispositivos descritos en la presente mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, la muestra se puede mover a través del sistema mediante la aplicación de fuerza centrífuga, presión positiva o presión negativa (por ejemplo, aspiración por vacío). Cuando se usa la fuerza centrífuga, el tiempo de centrifugación y la fuerza centrífuga relativa (FCR) deberían ser suficientes para efectuar el paso de la muestra a través del sistema o dispositivo y dar como resultado la recolección de ácido nucleico enriquecido de un microorganismo transportado por la sangre.

[0046] Los sistemas y dispositivos descritos en este documento pueden ser parte de una columna de centrifugación, un filtro de placa, un colector de filtro o un dispositivo microfluídico, por ejemplo. El dispositivo microfluídico puede ser, por ejemplo, un dispositivo fluídico microcapilar. El sistema se puede fabricar como parte del dispositivo o como un conjunto modular que se conecta directamente con el dispositivo o como un componente independiente de un solo uso.

[0047] En ciertas realizaciones, el ácido nucleico de microorganismos enriquecido o recogido de los sistemas y dispositivos descritos en este documento puede amplificarse antes del análisis posterior, tal como por amplificación del genoma completo, replicación en círculo rodante, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR retrotranscriptasa, o amplificación de ARN. En ciertas realizaciones, el eluido enriquecido puede concentrarse mediante precipitación con etanol, o purificarse adicionalmente para proporcionar una muestra de ácido nucleico de alta pureza (por ejemplo, mediante extracción con fenol cloroformo, captura y lavado de perlas paramagnéticas,

columna de purificación de ADN, etc.). El ácido nucleico enriquecido, que se ha amplificado opcionalmente, puede analizarse posteriormente mediante cualquier método conocido en la técnica, ejemplos de los cuales incluyen PCR, espectrometría de masas, polimerización de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), huella digital de ADN y secuenciación de ácidos nucleicos.

[0048] En ciertas realizaciones, los sistemas y dispositivos descritos en este documento pueden usarse para la PCR de siguiente generación en tiempo real. Alternativamente, los sistemas y dispositivos pueden usarse para preparar muestras para la plataforma Ibis (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, subsidiaria de Abbott Laboratories), lo que obvia la necesidad de sistemas de extracción múltiple, reduce el tiempo de procesamiento de la muestra, limita las dimensiones físicas (es decir, huella) del sistema, y reduce el trabajo asociado con el rendimiento del ensayo.

[0049] Los procedimientos, dispositivos, sistemas descritos en este documento se pueden combinar con otros procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico enriquecido/purificado de acuerdo con la presente descripción se puede concentrar y amplificar de acuerdo con el método descrito en la patente de EE.UU. N.º 7.807.360.

[0050] En ciertas realizaciones, los sistemas, dispositivos y métodos descritos en este documento pueden usarse para enriquecer ácido nucleico a partir de muestras líquidas o licuadas, tales como plasma, capa leucocítica, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo, esputo, lavado broncoalveolar, aspirados con aguja fina, frotis (por ejemplo, bucal, cervical y nasal), líquido intersticial, líquido sinovial, saliva, orina, leche materna, secreción nasal y lágrimas.

[0051] La presente descripción proporciona ciertos filtros de purificación de multietapas y métodos para usarlos (por ejemplo, como se muestra en la Figura 1). En ciertas realizaciones, los filtros se emplean en un proceso de filtración de etapa única y etapa múltiple usado en la purificación/enriquecimiento de ADN/ARN bacteriano, fúngico y vírico a partir de una muestra (por ejemplo, sangre completa), para posterior análisis molecular. Dichos filtros pueden implementarse en muchas realizaciones, que incluyen, pero no se limitan a: un conjunto de columnas de centrifugación, filtro de placa o colector de filtro. En ciertas realizaciones, los filtros utilizan una serie de múltiples etapas de filtros de exclusión por tamaño de porosidad de estrechamiento (por ejemplo, 3 o 4 etapas, ~10-20 µ a 0,1 µ, en incrementos de aproximadamente 10 veces, ver Figura 1) para fraccionar bacterias y virus directamente de una muestra (p. ej., sangre completa), en un solo paso. En ciertas realizaciones, el filtro de múltiples etapas también servirá como una superficie/matriz de cizallamiento mecánico para la lisis de células bacterianas. En otras realizaciones, los filtros de multietapas incluyen una capa de unión por afinidad, que, por ejemplo, puede cargarse con secuencias de ácido nucleico repetitivas humanas (por ejemplo, secuencias repetidas de Alu, Cot-1, LINE, SINE, centromérico y/o telomérico) para unir selectivamente y retener secuencias de ácido nucleico humano, lo que enriquece así selectivamente la muestra para las secuencias de ácido nucleico bacterianas, fúngicas y/o víricas que pueden estar presentes en la muestra (por ejemplo, sangre completa). En ciertas realizaciones, los filtros multietapas se usan para fraccionar ADN/ARN bacteriano, fúngico y vírico a partir de una muestra (por ejemplo, 1 - 2 ml) sin procesar toda la muestra; como un eluido de pequeño volumen enriquecido (por ejemplo, 10-100 µl) obtenido a partir del filtro puede proporcionar cantidades adecuadas de ADN para el posterior análisis molecular (por ejemplo, PCR, espectrometría de masas, etc.). En el caso de que el eluido enriquecido en ADN bacteriano/fúngico/vírico no proporcione suficiente material para el posterior análisis, el ADN bacteriano/vírico/fúngico enriquecido puede, por ejemplo, amplificarse usando estrategias de preamplificación convencionales (por ejemplo, tales como: amplificación del genoma, replicación del círculo rodante, PCR, etc.). En otras realizaciones, los filtros multietapa se usan para purificar ácido nucleico de virus de ARN, para análisis directo o amplificación intermedia (por ejemplo, PCR retrotranscriptasa u otros métodos de amplificación de ARN).

[0052] La Figura 1 proporciona una descripción ejemplar de un filtro de multietapa, como el que se usa para purificar ácidos nucleicos de la sangre completa. Como se muestra en la parte superior de la figura, los eritrocitos y leucocitos humanos se retienen en un poro de aproximadamente 10-20 µ, mientras que los bacterianos, los hongos y los virus pasan a través de un poro de 1-2 µ. El poro de 1-2 µ purifica aún más la muestra y evita que las células sanguíneas humanas pasen a través de los poros. Al menos la lisis mecánica parcial de bacterias, hongos y virus, que ha pasado a través del filtro de poros de 1-2 µ, puede ocurrir en la etapa 0,1 u por cizallamiento mecánico, lo que permite que solo el ácido nucleico pase a través del filtro de 0,1 u. La etapa de afinidad (por ejemplo, que contiene secuencias de captura de ácido nucleico humano repetitivas) enriquece adicionalmente el ADN/ARN deseado en el eluido al eliminar las secuencias de ácido nucleico humano. Un experto en la técnica puede optimizar los parámetros para optimizar la purificación, incluido el tiempo de centrifugación y la fuerza centrífuga relativa (FCR), con el fin de lograr el doble objetivo de retener células humanas en la etapa(s) superior y lisar células bacterianas/fúngicas y virus en la etapa inferior, antes del enriquecimiento por afinidad. En ciertas realizaciones, para lograr estos objetivos, solo una fracción (por ejemplo, de 0,05 a 0,01) de una muestra (por ejemplo, muestra de

sangre completa) debe fraccionarse a través de la columna de etapas múltiples.

[0053] Los filtros de múltiples etapas descritos en este documento podrían obviar la necesidad de sistemas de extracción múltiples, reducir el tiempo de procesamiento de la muestra, limitar las dimensiones físicas del sistema (huella) y reducir la mano de obra asociada al ensayo. Dicha preparación/extracción de muestra frontal en columna puede proporcionar una solución universal para ambos sistemas, como las plataformas de espectrometría de masas IBIS (composición de base) y los sistemas de PCR en tiempo real de siguiente generación.

[0054] En otras realizaciones, se proporciona en la presente un dispositivo de extracción de microfluidos para la purificación y el enriquecimiento del ácido nucleico total a partir de sangre completa (véase, por ejemplo, la Figura 2). En ciertas realizaciones, el procedimiento aquí descrito emplea un dispositivo de extracción de microfluidos frontal, que puede integrarse en un sistema de PCR microfluídico, para purificar el ácido nucleico total de la sangre completa (por ejemplo, ADN genómico humano y patógenos de transmisión hemática) como se describió anteriormente y en la Figura 1. En ciertas realizaciones, un módulo de separación puede fabricarse directamente como parte del dispositivo microfluídico o unirse como un conjunto modular interconectado directamente a un dispositivo de PCR microfluídico, lo que proporciona una preparación de muestra frontal para el sistema. El dispositivo también puede ser un componente independiente de un solo uso que proporciona ácido nucleico total para el posterior análisis molecular. El diseño de microcapilar utiliza una serie de etapas de porosidad de estrechamiento para filtrar la muestra y cortarla. Al controlar el tamaño de poro, es posible diseñar microcapilares compuestos por diferentes arquitecturas de canales diseñados para fines de purificación especializados (por ejemplo, ADN/ARN humano, fúngico, bacteriano o vírico). La premisa básica puede ampliarse para incluir otros tipos de muestras líquidas como suero, plasma, líquido linfático, líquido intersticial, líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido amniótico, líquido seminal, secreciones vaginales, líquido seroso, líquido sinovial, líquido pericárdico, líquido peritoneal, fluido pleural, transpiraciones, exudados, fluido quístico, bilis, fluidos gástricos, fluidos intestinales, saliva, orina, leche materna y lágrimas. Dos ventajas conferidas por este procedimiento incluyen la concentración de muestra y la selección basada en afinidad contra objetivos que no son de interés inmediato (por ejemplo, tales como secuencias de ADN humano, en el caso de detección de patógenos bacterianos/víricos). Junto con el método de preparación de muestras basado en columnas y un proceso de amplificación/detección por PCR, este método proporciona un procedimiento para la preparación inicial de muestras de ácido nucleico total de sangre completa y otros fluidos (p. ej., plasma, líquido linfático, líquido intersticial, saliva, orina, leche materna y lágrimas).

[0055] En ciertas realizaciones, el ácido nucleico aislado está sujeto a amplificación. En algunas realizaciones, se proporcionan procedimientos de detección de fluorescencia para la detección de ácido nucleico amplificado. Además de los reactivos ya mencionados, y aquellos conocidos por los expertos en la técnica de la amplificación y detección de ácidos nucleicos, se proporcionan diversos reactivos de detección, tales como tintes y sondas fluorescentes y no fluorescentes. Por ejemplo, los protocolos pueden emplear reactivos adecuados para uso en una reacción Taq-Man, tal como una sonda Taq-Man; reactivos adecuados para uso en una detección de fluorescencia verde SYBR; reactivos adecuados para uso en una reacción de baliza molecular, tales como sondas de balizas moleculares; reactivos adecuados para uso en una reacción de escorpión, tal como una sonda de escorpión; reactivos adecuados para usar en una reacción fluorescente de tipo colorante de unión a ADN, tal como una sonda fluorescente; y/o reactivos para uso en un protocolo LightUp, como una sonda LightUp. En algunas realizaciones, se proporcionan en este documento procedimientos y composiciones para detectar y/o cuantificar una señal detectable (por ejemplo, fluorescencia) a partir de muestras purificadas que contienen ácido nucleico diana amplificado. Así, por ejemplo, los métodos pueden emplear marcadores de ácidos amplificados (por ejemplo, durante la amplificación, postamplificación) con una etiqueta detectable, lo que expone particiones a una fuente de luz a una longitud de onda seleccionada para hacer que la etiqueta detectable emita fluorescencia, y detecta y/o mide la fluorescencia resultante. La fluorescencia emitida por las muestras puede rastrearse durante la reacción de amplificación para permitir el control de la reacción (por ejemplo, usando un compuesto de tipo verde SYBR), o la fluorescencia se puede medir después de la amplificación.

[0056] En algunas realizaciones, la detección de ácidos nucleicos amplificados emplea uno o más marcadores fluorescentes, tintes de intercalación fluorescentes, métodos de detección basados en FRET (patente de los EE. UU. N.º 5.945.283; Publicación PCT WO 97/22719), PCR cuantitativa, métodos fluorogénicos en tiempo real (patentes de EE. UU. N.º 5.210.015 de Gelfand, 5.538.848 de Livak, et al., y 5.863.736 de Haaland, así como Heid, CA, et al., Genome Research, 6:986-994 (1996); Gibson , U. E. M, et al., Genome Research 6:995-1001 (1996); Holland, PM, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-7280, (1991), y Livak, KJ., et al., PCR Methods and Applications 357-362 (1995)), balizas moleculares (Piatek, AS, et al., Nat. Biotechnol., 16:359-63 (1998); Tyagi, S. y Kramer, F. R., Nature Biotechnolog 14:303-308 (1996) y Tyagi, S. et al., Nat. Biotechnol. 16:49-53 (1998)), ensayos Invader (Third Wave Technologies, (Madison, WI)) (Neri , B.P, et al., Advances in Nucleic Acid and Protein Analysis

3826:117-125, 2000), ácido nucleico de amplificación basada en secuencia (NASBA; (véase, por ejemplo, Compton, J. Nucleic Acid Sequencebased Amplification, Nature 350:91-91, 1991), sondas Scorpion (Thelwell, et al., Nucleic Acids Research, 28:3752- 761, 2000), detección de ADN capacitivo (véase, por ejemplo, Sohn, et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:10687-10690), etc.

[0057] Las moléculas de ácido nucleico amplificadas pueden analizarse mediante cualquier número de técnicas para determinar la presencia de, la cantidad de, o la identidad de la molécula. Los ejemplos no limitantes incluyen secuenciación, determinación de masa y determinación de la composición de base. El análisis puede identificar la secuencia de la totalidad o una parte del ácido nucleico amplificado o una o más de sus propiedades o características para revelar la información deseada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se determina la presencia de un polimorfismo, por ejemplo, para proporcionar información sobre la naturaleza de un organismo (por ejemplo, patógeno), un estado de enfermedad, un estado metabólico y similares. En algunas realizaciones, se determina el estado de metilación de un ácido nucleico. En algunas de tales realizaciones, un ácido nucleico diana puede modificarse químicamente (por ejemplo, mediante tratamiento con bisulfito) antes de la amplificación para crear un marcador para los sitios de metilación.

[0058] Ejemplos ilustrativos no limitantes de técnicas de secuenciación de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a, secuenciación (Sanger) de terminador de cadena y secuenciación de terminador de colorante, así como técnicas de secuenciación de "siguiente generación". Los expertos en la técnica reconocerán que, debido a que el ARN es menos estable en la célula y más propenso al ataque de la nucleasa experimentalmente, el ARN habitualmente, aunque no necesariamente, se transcribe de forma inversa al ADN antes de la secuenciación.

[0059] En la técnica se conocen varias técnicas de secuenciación de ADN, que incluyen metodologías de secuenciación basadas en fluorescencia (véase, por ejemplo, Birren et al., Genome Analysis: Analyzing DNA, 1, Cold Spring Harbor, N.Y.). En algunas realizaciones, se utilizan técnicas de secuenciación automáticas entendidas en esa técnica. En algunas realizaciones, los sistemas, dispositivos y procedimientos emplean secuenciación paralela de amplicones divididos (Publicación PCT N.º: WO2006084132 de Kevin McKernan et al.,). En algunas realizaciones, la secuenciación del ADN se consigue mediante la extensión de oligonucleótidos paralelos (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 5.750.341 de Macevicz et al., y la patente de EE. UU. N.º 6.306.597 de Macevicz et al.,). Ejemplos adicionales de técnicas de secuenciación incluyen la tecnología Church Polony (et al., 2003, Analytical Biochemistry 320, 55-65; Shendure et al., 2005 Science 309, 1728-1732; la patente de EE. UU. N.º 6.432.360, la patente de los EE. UU. N.º 6.485.944, la patente de EE. UU. N.º 6.511.803), la tecnología de pirólisis de pictogramas 454 (Margulics et al., Nature 2005 437, 376-380, US 20050130173), la tecnología de adición de base única de Solexa (Bennett et al., 2005, Pharmacogenomics, 6, 373-382, patente de EE.UU. N.º 6.787.308, patente de EE.UU. N.º 6.833.246), la tecnología de secuencia de firma masivamente paralela de Lynx (Brenner et al. (2000), Nat. Biotechnol. 18: 630-634; patente de los EE.UU. N.º 5.695.934, patente de EE.UU. N.º 5.714.330) y la tecnología de colonias de PCR de Adessi (Adessi et al. (2000), Nucleic Acid Res. 28, E87; WO 00018957).

[0060] En algunas realizaciones, se utiliza la secuenciación del terminador de cadena. La secuenciación del terminador de la cadena utiliza la terminación específica de la secuencia de una reacción de síntesis de ADN usando sustratos de nucleótidos modificados. La extensión se inicia en un sitio específico en el ADN molde usando un cebador de oligonucleótido corto radioactivo u otro marcado, complementario a la secuencia en esa región. El cebador de oligonucleótidos se extiende utilizando una ADN polimerasa, cuatro bases de desoxinucleótidos estándar y una baja concentración de un nucleótido de terminación de una cadena, más comúnmente un di-desoxinucleótido. Esta reacción se repite en cuatro tubos separados con cada una de las bases tomando turnos como el di-desoxinucleótido. La incorporación limitada del nucleótido terminador de la cadena por la ADN polimerasa da como resultado una serie de fragmentos de ADN relacionados que se terminan solo en las posiciones en las que se usa dicho di-desoxinucleótido particular. Para cada tubo de reacción, los fragmentos se separan por tamaño mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida en forma de placa o en un tubo capilar lleno con un polímero viscoso. La secuencia se determina leyendo qué carril produce una marca visualizada del cebador etiquetado a medida que escanea desde la parte superior del gel hasta la parte inferior.

[0061] La secuenciación del terminador de colorante alternativamente marca los terminadores. La secuenciación completa puede realizarse en una única reacción marcando cada uno de los terminadores de cadena de di-desoxinucleótidos con un colorante fluorescente separado, que emite fluorescencia a una longitud de onda distinta.

[0062] Un conjunto de métodos denominados técnicas de “secuenciación de siguiente generación” ha surgido como alternativas a los métodos de secuenciación de terminador de colorante y Sanger (Voelkerding et al., Clinical

Chem., 55: 641-658, 2009; MacLean et al., Nature Rev. Microbiol., 7: 287-296). Los métodos de secuenciación de siguiente generación (NGS) comparten la característica común de las estrategias de alto rendimiento paralelas masivas, con el objetivo de reducir los costos en comparación con los métodos de secuenciación más antiguos. Los métodos NGS se pueden dividir ampliamente en aquellos que requieren amplificación de plantilla y aquellos que no. Los métodos que requieren amplificación incluyen pirosecuenciación comercializada por Roche como plataformas de tecnología 454 (por ejemplo, GS 20 y GS FLX), la plataforma Solexa comercializada por Illumina, y la plataforma de ligación y detección de oligonucleótidos asistida (SOLiD) comercializada por Applied Biosystems. Los métodos sin amplificación, también conocidos como secuenciación de una sola molécula, se ejemplifican mediante la plataforma HeliScope comercializada por Helicos BioSciences, y plataformas emergentes comercializadas por VisiGen, Oxford Nanopore Technologies Ltd. y Pacific Biosciences, respectivamente.

[0063] En la pirosecuenciación (Voelkerding et al., Clinical Chem., 55: 641-658, 2009; MacLean et al., Nature Rev. Microbiol., 7: 287-296; patente de los EE.UU. N.º 6.210.891; N.º 6.258.568), el ADN molde se fragmenta, se repara al final, se liga a adaptadores y se amplifica clonalmente *in situ* capturando moléculas molde individuales con gránulos portadoras de oligonucleótidos complementarios a los adaptadores. Cada gránulo, que lleva un solo tipo de plantilla, se compartimentaliza en una microvesícula de agua en aceite, y la plantilla se amplifica clonalmente usando una técnica denominada PCR en emulsión. La emulsión se rompe después de la amplificación y los gránulos se depositan en pocillos individuales de una placa picotiter que funciona como una celda de flujo durante las reacciones de secuenciación. La introducción iterativa ordenada de cada uno de los cuatro reactivos dNTP se produce en la celda de flujo en presencia de enzimas de secuenciación y un indicador luminiscente tal como la luciferasa. En el caso de que se agregue un dNTP apropiado al extremo 3' del cebador de secuenciación, la producción resultante de ATP produce un estallido de luminiscencia dentro del pozo, que se registra usando una cámara CCD. Es posible lograr longitudes de lectura mayores o iguales a 400 bases, y se pueden lograr lecturas de secuencia de 1 x 10^6, lo que da como resultado hasta 500 millones de pares de bases (Mb) de secuencia.

[0064] En la plataforma Solexa/Illumina (Voelkerding et al., Clinical Chem., 55: 641-658, 2009; MacLean et al., Nature Rev. Microbiol., 7: 287-296; patente de EE.UU. N.º 6.833.246; patente de EE.UU. N.º 7.115.400, patente de EE.UU. N.º 6.969.488), los datos de secuenciación se producen en forma de lecturas de longitud más corta. En este método, el ADN fragmentado monocatenario se repara en el extremo para generar extremos romos 5'-fosforilados, seguido de la adición mediada por Klenow de una única base A al extremo 3' de los fragmentos. La adición de una A facilita la adición de oligonucleótidos adaptadores de saliente en T, que se usan posteriormente para capturar las moléculas adaptadoras de plantilla sobre la superficie de una celda de flujo que está tachonada con anclajes de oligonucleótidos. El ancla se usa como cebador de PCR, pero debido a la longitud de la plantilla y su proximidad a otros oligonucleótidos de anclaje cercanos, la extensión mediante PCR da como resultado el "arqueamiento" de la molécula para hibridar con un oligonucleótido de anclaje adyacente para formar una estructura en puente en la superficie de la celda de flujo. Estos bucles de ADN están desnaturalizados y escindidos. Las hebras de delante se secuencian con terminadores de tinte reversibles. La secuencia de nucleótidos incorporados se determina por detección de fluorescencia postincorporación, lo que elimina cada flúor y bloqueo antes del siguiente ciclo de adición de dNTP. La longitud de lectura de la secuencia varía de 36 nucleótidos a más de 50 nucleótidos, con una producción global superior a 1 mil millones de pares de nucleótidos por análisis.

[0065] La secuenciación de moléculas de ácido nucleico usando tecnología SOLiD (Voelkerding et al., Clinical Chem., 55: 641-658, 2009; MacLean et al., Nature Rev. Microbiol., 7: 287-296; patente de EE.UU. N.º 5.912.148, patente de EE.UU. N.º 6.130.073) también implica la fragmentación de la plantilla, la unión a adaptadores de oligonucleótidos, la unión a granulados y la amplificación clonal por PCR en emulsión. A continuación, los gránulos que llevan la plantilla se inmovilizan en una superficie modificada de una celda de flujo de vidrio, y se reasocia un cebador complementario al oligonucleótido adaptador. Sin embargo, en lugar de utilizar este cebador para la extensión 3', se usa en cambio para proporcionar un grupo fosfato 5' para la ligación a sondas de interrogación que contienen dos bases específicas de sonda seguidas por 6 bases degeneradas y una de cuatro marcadores fluorescentes. En el sistema SOLiD, las sondas de interrogación tienen 16 combinaciones posibles de las dos bases en el extremo 3' de cada sonda, y uno de los cuatro canales en el extremo 5'. El color de flúor y, por lo tanto, la identidad de cada sonda corresponde a los esquemas de codificación de espacio de color especificados. Las rondas múltiples (usualmente 7) de hibridación de la sonda, ligadura y detección de flúor van seguidas de desnaturalización, y luego una segunda ronda de secuenciación usando un cebador que se compensa con una base con respecto al cebador inicial. De esta manera, la secuencia de plantilla puede reconstruirse computacionalmente, y las bases de plantilla se interrogan dos veces, dando como resultado una precisión incrementada. La longitud de lectura de la secuencia promedia 35 nucleótidos, y la producción total excede los 4 mil millones de bases por ejecución de secuencia.

[0066] En ciertas realizaciones, se emplea la secuenciación de nanoporos (véase, por ejemplo, Astier et al., J Am Chem Soc. 2006 Feb 8; 128 (5): 1705-10). La teoría detrás de la secuenciación de nanoporos tiene que ver con lo que ocurre cuando el nanoporo se sumerge en un fluido conductor y se aplica un potencial (voltaje) a él: en estas condiciones se puede observar una ligera corriente eléctrica debida a la conducción de iones a través del nanoporo. y la cantidad de corriente es extremadamente sensible al tamaño del nanoporo. Si las moléculas de ADN pasan (o pasa una parte de la molécula de ADN) a través del nanoporo, esto puede crear un cambio en la magnitud de la corriente a través del nanoporo, lo que permite determinar las secuencias de la molécula de ADN.

[0067] Otro enfoque ejemplar de secuenciación de ácidos nucleicos que puede adaptarse para su uso con los sistemas, dispositivos y procedimientos fue desarrollado por Stratos Genomics, Inc. e implica el uso de Xpandomeros. Este proceso de secuenciación normalmente incluye proporcionar una hebra hija producida por una síntesis dirigida por plantilla. La cadena hija generalmente incluye una pluralidad de subunidades acopladas en una secuencia correspondiente a una secuencia de nucleótidos contigua a todo o una porción de un ácido nucleico diana en el que las subunidades individuales comprenden una correa, al menos una sonda o residuo de nucleobase y al menos un enlace selectivamente escindible. El/los enlace(s) escindible(s) selectivamente se escinde(n) para producir un Xpandomero de una longitud más larga que la pluralidad de las subunidades del filamento hijo. El Xpandomero incluye normalmente las ataduras y los elementos informadores para analizar la información genética en una secuencia correspondiente a la secuencia de nucleótidos contigua a todo o una porción del ácido nucleico diana. Los elementos informadores del Xpandomero son luego detectados. Los detalles adicionales relacionados con los enfoques basados en Xpandomero se describen, por ejemplo, en la publicación de la patente de EE.UU. N.º 20090035777, titulada " HIGH THROUGHPUT NUCLEIC ACID SEQUENCING BY EXPAN ", que se registró el 19 de junio de 2008.

[0068] Otros métodos de secuenciación de molécula única emergente incluyen la secuenciación en tiempo real por síntesis usando una plataforma VisiGen (Voelkerding et al., Clinical Chem., 55: 641-658, 2009; patente de EE.UU. N.º 7.329.492; la solicitud de patente de EE.UU. N.º 11/671956; la solicitud de patente de EE.UU. N.º 11/781166) en la que el molde de ADN inmovilizado y cebado se somete a extensión de cadena usando una polimerasa modificada fluorescentemente y moléculas aceptoras fluorescentes, dando como resultado una transferencia de energía de resonancia de fluorescencia detectable (FRET) tras la adición de nucleótidos.

[0069] Los procesos y sistemas para dicha secuenciación en tiempo real que pueden adaptarse para su uso con la invención se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N.º 7.405.281, titulada " Fluorescent nucleotide analogs and uses therefor", emitida el 29 de julio de 2008 a Xu. et al., 7.315.019, titulada " Arrays of optical confinements and uses thereof", emitida el 1 de enero de 2008 a Turner et al., 7.313.308, titulada " Optical analysis of molecules", emitida el 25 de diciembre de 2007 a Turner et al., 7.302.146, titulada " Apparatus and method for analysis of molecules", emitida el 27 de noviembre de 2007 a Turner et al., y 7,170,050, titulada " Apparatus and methods for optical analysis of molecules", emitida el 30 de enero de 2007 a Turner et al., patente de los EE.UU. N.º 20080212960, titulada " Methods and systems for simultaneous real-time monitoring of optical signals from multiple sources", registrada el 26 de octubre de 2007 por Lundquist et al., 20080206764, titulada "Flowcell system for single molecule detection", registrada el 26 de octubre, 2007 por Williams y col., 20080199932, titulada " Active surface coupled polymerases", registrada el 26 de octubre de 2007 por Hanzel et al., 20080199874, titulada "CONTROLLABLE STRAND SCISSION OF MINI CIRCLE DNA ", registrada el 11 de febrero de 2008 por Otto et al., 20080176769, titulada " Articles having localized molecules disposed thereon and methods of producing same ", registrada el 26 de octubre de 2007 por Rank et al., 20080176316, titulada " Mitigation of photodamage in analytical reactions ", registrada el 31 de octubre de 2007 por Eid et al. .20080176241, titulada " Mitigation of photodamage in analytical reactions", registrada el 31 de octubre de 2007 por Eid et al., 20080165346, titulada " Methods and systems for simultaneous real-time monitoring of optical signals from multiple sources", registrada el 26 de octubre, 2007 por Lundquist et al., 20080160531, titulada " Uniform surfaces for hybrid material substrates and methods for making and using same", registrada el 31 de octubre de 2007 por Korlach, 20080157005, titulado " Methods and systems for simultaneous realtime monitoring of optical signals from multiple sources", registrada el 26 de octubre de 2007 por Lundquist et al., 20080153100, titulada "Articles having localized molecules disposed thereon and methods of producing same", registrada el 31 de octubre de 2007 por Rank et al., 20080153095, titulada "CHARGE SWITCH NUCLEOTIDES", registrada el 26 de octubre de 2007 por Williams et al., 20080152281, titulada " Substrates, systems and methods for analyzing materials", registrada el 31 de octubre de 2007 por Lundquist et al., 20080152280, titulada "Substrates, systems and methods for analyzing materials", registrada el 31 de octubre de 2007 por Lundquist et al., 20080145278, titulada “Uniform surfaces for hybrid material substrates and methods for making and using same ", registrada el 31 de octubre de 2007 por Korlach, 20080128627, titulada "SUBSTRATES, SYSTEMS AND METHODS FOR ANALYZING MATERIALS", registrada el 31 de agosto de 2007 por Lundquist et al., 20080108082, titulada "Polymerase enzymes and reagents for enhanced nucleic acid sequencing", registrada el

22 de octubre de 2007 por Rank et al., 20080095488 , titulada "SUBSTRATES FOR PERFORMING ANALYTICAL REACTIONS", registrada el 11 de junio de 2007 por Foquet et al., 20080080059, titulada "MODULAR OPTICAL COMPONENTS AND SYSTEMS INCORPORATING SAME", registrada el 27 de septiembre de 2007 por Dixon et al., 20080050747, titulada "Articles having localized molecules disposed thereon and methods of producing and using same", registrada el 14 de agosto de 2007 por Korlach et al., 20080032301, titulada "Articles having localized molecules disposed thereon and methods of producing same", registrada el 29 de marzo de 2007 por Rank et al., 20080030628, titulada "Methods and systems for simultaneous real-time monitoring of optical signals from multiple sources", registrada el 9 de febrero de 2007 por Lundquist et al., 20080009007, titulada " CONTROLLED INITIATION OF PRIMER EXTENSION", registrada el 15 de junio de 2007 por Lyle et al., 20070238679, titulada " Articles having localized molecules disposed thereon and methods of producing same", registrada el 30 de marzo de 2006 por Rank et al., 20070231804, titulada “Methods, systems and compositions for monitoring enzyme activity and applications thereof”, registrada el 31 de marzo de 2006 por Korlach et al., 20070206187, titulada "Methods and systems for simultaneous real-time monitoring of optical signals from multiple sources", registrada el 9 de febrero de 2007 por Lundquist et al., 20070196846, titulada " Polymerases for nucleotide analogue incorporation", registrada el 21 de diciembre de 2006 por Hanzel et al., 20070188750, titulada "Methods and systems for simultaneous real-time monitoring of optical signals from multiple sources“, registrada el 7 de julio de 2006 por Lundquist et al., 20070161017, titulada "MITIGATION OF PHOTODAMAGE IN ANALYTICAL REACTIONS", registrada el 1 de diciembre de 2006 por Eid et al., 20070141598, titulada "Nucleotide Compositions and Uses Thereof", registrada el 3 de noviembre de 2006 por Turner et al., 20070134128, titulada "Uniform surfaces for hybrid material substrate and methods for making and using same", registrada el 27 de noviembre de 2006 por Korlach, 20070128133, titulada "Mitigation of photodamage in analytical reactions", registrada el 2 de diciembre de 2005 por Eid et al., 20070077564, titulada "Reactive surfaces, substrates and methods of producing same", registrada el 30 de septiembre de 2005 por Roitman et al., 20070072196, titulada "Fluorescent nucleotide analogs and uses therefore", registrada el 29 de septiembre de 2005 por Xu et al., y 20070036511, titulada "Methods and systems for monitoring multiple optical signals from a single source", registrada el 11 de agosto de 2005 por Lundquist et al., y Korlach et al. (2008) "Selective aluminum passivation for targeted immobilization of single DNA polymerase molecules in zero-mode waveguide nanostructures" Proc. Nat'I. Acad. Sci. U.S.A. 105 (4): 11761181.

[0070] En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se analizan por determinación de su masa y/o composición de base. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se detectan y caracterizan mediante la identificación de una firma de composición de base única (BCS) usando espectrometría de masas (por ejemplo, Abbott PLEX-ID system, Abbott Ibis Biosciences, Abbott Park, Illinois) descrita en las patentes de EE.UU. 7.108.974, 8.017.743 y 8.017.322.

[0071] En algunas realizaciones, se usa un sistema MassARRAY (Sequenom, San Diego, CA) para detectar o analizar secuencias (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 6.043.031, 5.777.324 y 5.605.798).

[0072] Las muestras pueden derivarse de cualquier fuente adecuada y para fines relacionados con cualquier campo, incluidos, entre otros, diagnósticos, investigación, medicina forense, epidemiología, patología, arqueología, etc. Una muestra puede ser biológica, ambiental, forense, veterinaria, clínica, etc. en origen. Las muestras pueden incluir ácido nucleico derivado de cualquier fuente adecuada, incluyendo eucariotas, procariotas (por ejemplo, bacterias infecciosas), mamíferos, humanos, primates no humanos, caninos, felinos, bovinos, equinos, porcinos, ratones, virus, etc. Las muestras pueden contener, por ejemplo, organismos completos, órganos, tejidos, células, orgánulos (p. ej., cloroplastos, mitocondrias), ácido nucleico sintético, lisado celular, etc. Ácido nucleico presente en una muestra (por ejemplo, ácido nucleico diana, ácido nucleico molde, ácido nucleico no diana, ácido nucleico contaminante puede ser de cualquier tipo, por ejemplo, ADN genómico, ARN, microARN, ADN mitocondrial, plásmidos, bacteriófagos, virus, origen sintético, origen natural y/o secuencias artificiales (no naturales), secuencias producidas sintéticamente pero que se producen de forma natural, etc. Las muestras biológicas pueden incluir, por ejemplo, sangre total, líquido linfático, suero, plasma, sudor, lágrima, saliva, esputo, líquidos cerebroespinales (CSF), líquido amniótico, líquido seminal, secreciones vaginales, líquido seroso, sinovial. líquido pericárdico, líquido peritoneal, líquido pleural, trasudados, exudados, líquido quístico, bilis, orina, fluidos gástricos, fluidos intestinales, muestras fecales, aspirados (médula ósea, aguja fina) y frotis o lavados (por ejemplo, oral, nasofaríngeo , bronquial, bronquioalveolar, óptico, rectal, intestinal, vaginal, epidérmico, etc.) y/u otras muestras biológicas frescas, congeladas, cultivadas, preservadas (PAXgene™, RNAlater™, RNasinR, etc.) o archivadas (parafina fijada con formalina) (FFPE), pellet de células fijas/linfocitos, etc.).

[0073] En algunas realizaciones, las muestras son muestras mezcladas (por ejemplo, que contienen poblaciones de ácidos nucleicos mixtas). En algunas realizaciones, las muestras analizadas mediante los métodos de la presente contienen, o pueden contener, una pluralidad de diferentes secuencias de ácido nucleico. En algunas

realizaciones, una muestra (por ejemplo, muestra mezclada) contiene una o más moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, 1... 10... 10^2... 10^3... 10^4... 10^5... 10^6... 10^7, etc.) que contienen una secuencia objetivo de interés para una aplicación particular. En algunas realizaciones, una muestra (por ejemplo, muestra mezclada) no contiene moléculas de ácido nucleico que contengan una secuencia diana de interés para una aplicación particular. En algunas realizaciones, una muestra (por ejemplo, muestra mixta) contiene moléculas de ácido nucleico con una pluralidad de secuencias diferentes que contienen toda una secuencia diana de interés. En algunas realizaciones, una muestra (por ejemplo, muestra mezclada) contiene una o más moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, 1... 10... 10^2... 10^3... 10^4... 10^5... 10^6... 10^7, etc.) que no contienen una secuencia objetivo de interés para una aplicación en particular. En algunas realizaciones, una muestra (por ejemplo, muestra mezclada) no contiene moléculas de ácido nucleico que contengan una secuencia objetivo de interés para una aplicación particular. En algunas realizaciones, una muestra (por ejemplo, muestra mixta) contiene moléculas de ácido nucleico con una pluralidad de secuencias diferentes que no contienen una secuencia diana de interés. En algunas realizaciones, una muestra contiene más moléculas de ácido nucleico que no contienen una secuencia diana que las moléculas de ácido nucleico que sí contienen una secuencia diana (p. ej., 1,01:1... 2:1... 5:1... 10:1... 20:1... 50:1... 10^2:1... 10^3:1... 10^4:1... 10^5:1... 10^6:1... 10^7:1). En algunas realizaciones, una muestra contiene más moléculas de ácido nucleico que contienen una secuencia diana que moléculas de ácido nucleico que no contienen una secuencia diana (p. ej., 1,01:1... 2:1... 5:1... 10:1... 20:1... 50:1... 10^2:1... 10^3:1... 10^4:1... 10^5:1... 10^6:1... 10^7:1). En algunas realizaciones, una muestra contiene una única secuencia diana que puede estar presente en una o más moléculas de ácido nucleico en la muestra. En algunas realizaciones, una muestra contiene dos o más secuencias diana (por ejemplo, 2, 3, 4, 5... 10... 20... 50... 100, etc.) que pueden estar presentes en uno o más moléculas de ácido nucleico en la muestra.

[0074] En algunas realizaciones, se pueden llevar a cabo diversas etapas de procesamiento de muestra para preparar las moléculas de ácido nucleico dentro de una muestra, que incluyen, pero no se limitan a, lisis celular, digestión de restricción, purificación, precipitación, resuspensión (por ejemplo, en tampón de amplificación), diálisis, etc. En algunas realizaciones, el procesamiento de muestra se realiza antes o después de cualquiera de los pasos que incluyen, pero no se limitan a, partición, amplificación, nueva amplificación), detección de amplicón, aislamiento de amplicones, secuenciación, etc.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema o dispositivo para purificar el ácido nucleico de un microorganismo a partir de una muestra que comprende:

i) un primer filtro de exclusión por tamaño que: excluye el paso de monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos, y permite el paso de eritrocitos, linfocitos y plaquetas;
ii) un segundo filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de eritrocitos y linfocitos, pero permite el paso de plaquetas y microorganismos más pequeños que las plaquetas;
iii) un tercer filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de plaquetas, pero permite el paso de microorganismos más pequeños que las plaquetas; y
iv) un filtro de cizallamiento que corta mecánicamente dichos microorganismos de modo que se libera el ácido nucleico del microorganismo.

2. El sistema o dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicho primer filtro de exclusión por tamaño tiene un tamaño de poro de 10 µm.

3. El sistema o dispositivo de la reivindicación 1 o 2, en el que el segundo filtro de exclusión por tamaño tiene un tamaño de poro de 5 µm y el tercer filtro de exclusión por tamaño que tiene un tamaño de poro de 2 µm.

4. El sistema o dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho filtro de cizallamiento tiene un tamaño de poro de 0,10 µm.

5. Un procedimiento para purificar el ácido nucleico del microorganismo a partir de una muestra que comprende:

a) mover una muestra biológica a través de un sistema o dispositivo, en el que dicha muestra biológica comprende células humanas y se sospecha que contiene microorganismos, y en el que dicho sistema o dispositivo comprende:

i) un primer filtro de exclusión por tamaño que: excluye el paso de monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos, y permite el paso a través de eritrocitos, linfocitos y plaquetas;
ii) un segundo filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de eritrocitos y linfocitos, pero permite el paso de plaquetas y microorganismos más pequeños que las plaquetas;
iii) un tercer filtro de exclusión por tamaño que excluye el paso de plaquetas, pero permite el paso de microorganismos más pequeños que las plaquetas; y
iv) un filtro de cizallamiento que corta mecánicamente dichos microorganismos de modo que se libera el ácido nucleico del microorganismo; y

b) recoger una muestra purificada en dicho sistema o dispositivo, en donde dicha muestra purificada no contiene o se ha deshecho de un 99 % de dichas células humanas y comprende al menos una porción de dicho ácido nucleico de microorganismo si los microorganismos están originalmente presentes en dicha muestra.

6. El método de la reivindicación 5, en el que dicha muestra biológica comprende sangre completa.

7. El sistema o dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o el procedimiento de la reivindicación 5 o 6, donde dicho sistema o dispositivo comprende además v) un filtro de unión por afinidad que comprende moléculas de unión de afinidad que se unen a ácido nucleico humano o animal, opcionalmente donde dichas moléculas de unión por afinidad se unen a secuencias de ácido nucleico humano repetitivas.

8. El sistema o dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 7 o el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en el que dicho sistema o dispositivo comprende además un recipiente de contención de muestra, en el que dicho recipiente de contención de la muestra comprende un extremo proximal y un extremo distal, y en el que dichos primer y segundo filtros de exclusión por tamaño, y dicho tercer filtro de exclusión por tamaño, y dicho filtro de cizallamiento, están situados en dicho recipiente de contención de muestra.

9. El sistema o dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, 7 u 8 o el método de cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en el que dicho filtro de cizallamiento está ubicado distal a dicho segundo filtro de exclusión por tamaño, donde dicho segundo filtro de exclusión por tamaño está ubicado distal a dicho primer filtro de exclusión por tamaño, y en el que dicho tercer filtro de exclusión por tamaño está ubicado entre dicho filtro de cizallamiento y

dicho segundo filtro de exclusión por tamaño.

10. El sistema o dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 7-9 o el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 5-9, en el que dicho sistema o dispositivo es parte de un componente seleccionado del grupo que consiste en: una columna de centrifugación, un filtro de placa, un colector de filtro y un dispositivo microfluídico.

11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 5-10, en el que dicha muestra biológica se mueve a través de dicho sistema o dispositivo mediante: fuerza centrífuga, presión positiva o presión negativa.

12. Un dispositivo de purificación de múltiples etapas que comprende:

a) un recipiente de contención de muestra, en el que dicho recipiente de contención de muestra comprende un extremo proximal y un extremo distal,

b) un primer filtro que comprende poros de 10-20 µm de tamaño, colocados dentro de dicho recipiente;

c) un segundo filtro que comprende poros de 1 a 2 µm de tamaño, colocado dentro de dicho recipiente y distal a dicho primer filtro;

d) un tercer filtro que comprende poros de 0,1 µm de tamaño, colocado dentro de dicho recipiente distal a dichos primer y segundo filtros; en donde dichos primer, segundo y tercer filtros están posicionados adicionalmente dentro de dicho recipiente de contención de muestras de manera que el líquido que pasa desde dicho extremo proximal a dicho extremo distal de dicho recipiente de contención de la muestra pasa a través de dichos primer, segundo y tercer filtros; y

e) un filtro de unión por afinidad que comprende moléculas de unión por afinidad, donde dicho filtro de unión por afinidad está posicionado dentro de dicho recipiente distal a dichos primer, segundo y tercer filtros, y está además posicionado de manera que dicho líquido pase desde dicho extremo proximal abierto hasta dicho extremo distal cerrado de dicho recipiente de contención de la muestra a través de dicho filtro de unión por afinidad.

13. El dispositivo de la reivindicación 12, en el que dicho recipiente de contención de la muestra está configurado para insertarse en una centrífuga o dispositivo de agitación.

14. Un método para purificar una muestra que comprende:

a) proporcionar:

i) una muestra que comprende células humanas y se sospecha que contiene patógenos que comprenden ácido nucleico patógeno; y
ii) un dispositivo de purificación de múltiples etapas que comprende:

A) un recipiente de contención de muestra, en el que dicho recipiente de contención de muestra comprende un extremo proximal y un extremo distal,
B) un primer filtro que comprende poros de 10-20 µm de tamaño, colocados dentro de dicho recipiente;
C) un segundo filtro que comprende poros de 1-2 µm de tamaño, colocado dentro de dicho recipiente y distal a dicho primer filtro;
D) un tercer filtro que comprende poros de 0,1 µm de tamaño, colocado dentro de dicho recipiente distal a dichos primer y segundo filtros; en donde dichos primer, segundo y tercer filtros están posicionados adicionalmente dentro de dicho recipiente de contención de muestras de manera que el fluido que pasa desde dicho extremo proximal a dicho extremo distal de dicho recipiente de contención de muestra pasa a través de dichos primer, segundo y tercer filtros; y
E) un filtro de unión por afinidad que comprende moléculas de unión por afinidad, donde dicho filtro de unión por afinidad está posicionado dentro de dicho recipiente distal a dichos primer, segundo y tercer filtros, y está además posicionado de manera que dicho fluido pasa desde dicho extremo proximal abierto hasta dicho extremo distal cerrado de dicho recipiente de contención de muestra a través de dicho filtro de unión por afinidad; y

b) verter dicha muestra en dicho extremo proximal de dicho recipiente de contención de la muestra y tratar dicho dispositivo de purificación de múltiples etapas de manera que se recoja una muestra purificada o se eluya de dicho

extremo distal de dicho recipiente de contención de la muestra, donde dicha muestra purificada no contiene o se ha deshecho de un 99 % de dichas células humanas y comprende al menos una porción de dicho ácido nucleico patógeno si está originalmente presente en dicha muestra,

opcionalmente en el que dicho dispositivo de purificación multietapa que trata comprende centrifugar o agitar dicho dispositivo de purificación de multietapa.

15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que dicha muestra comprende sangre completa.

FIG. 1

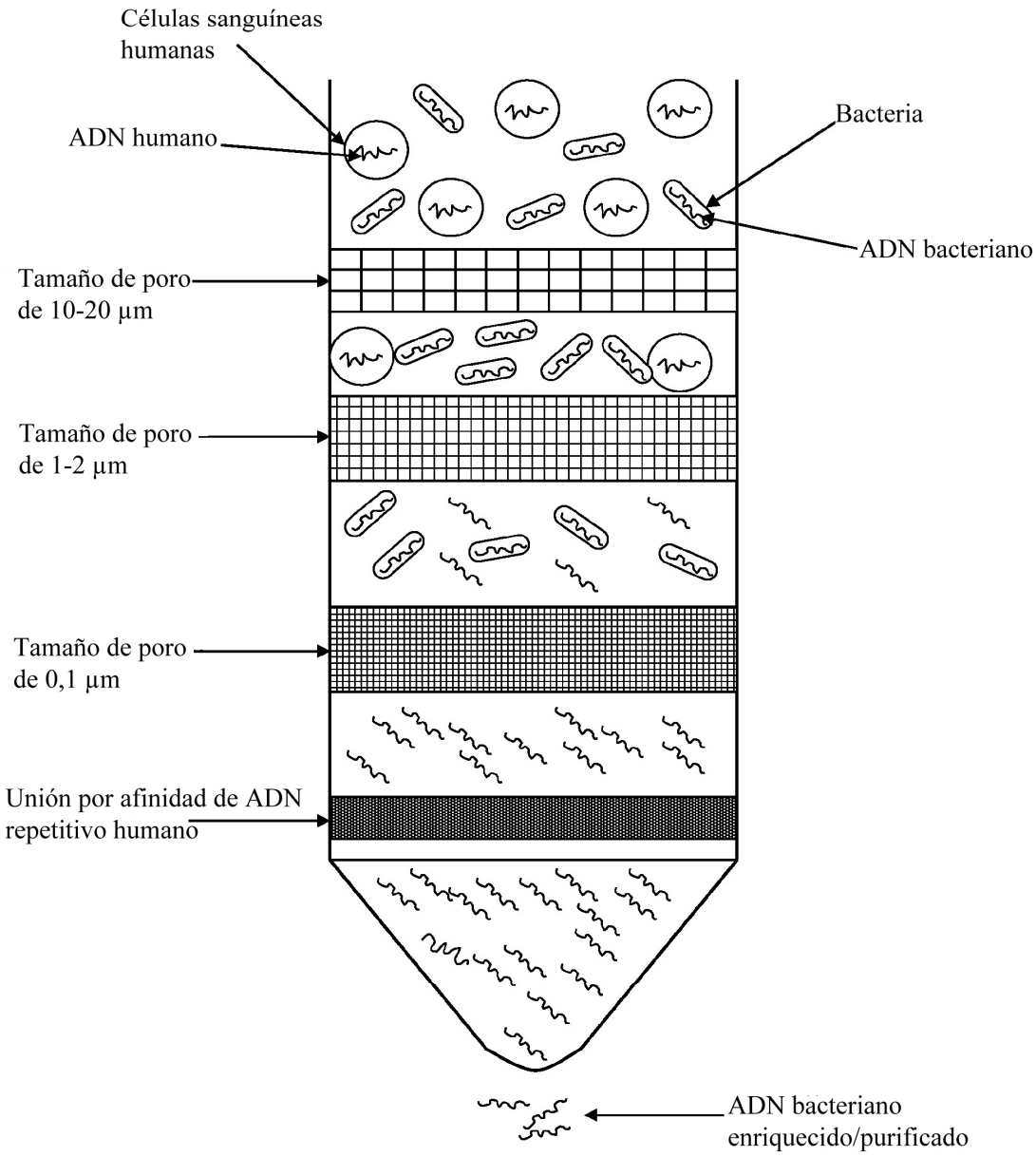
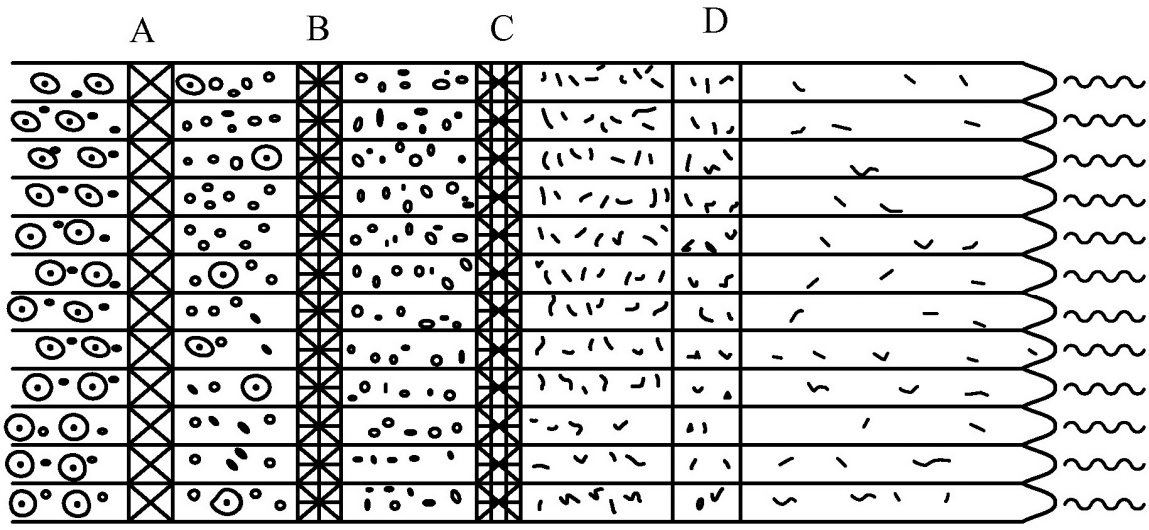

FILTRO DE PURIFICACIÓN MULTIETAPAS
Células sanguíneas humanas
ADN humano
Bacteria
ADN bacteriano
Tamaño de poro de 10-20 µm
Tamaño de poro de 1-2 µm
Tamaño de poro de 0,1 µm
Unión por afinidad de ADN repetitivo humano
ADN bacteriano enriquecido/purificado
Eluido enriquecido 10-100 µl

FIG. 2

DISPOSITIVO DE EXTRACCIÓN MICROFLUÍDICA



A = Tamaño de poro ~10-20 µm
B = Tamaño de poro ~1-2 µm
C = Tamaño de poro ~0,1 µm
D = Zona de unión por afinidad (selección contra ADN genómico humano)

POR SEPARADO O MODULAR