

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 114**

51 Int. Cl.:

B01L 3/14 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

G01N 1/34 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2014 PCT/US2014/039320**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.11.2014 WO14190249**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2014 E 14801362 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 3003561**

54 Título: **Sistema y procedimiento para recoger una muestra de ácido nucleico**

30 Prioridad:

24.05.2013 US 201361827244 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.06.2019

73 Titular/es:

**OCCAM BIOLABS, INC. (100.0%)
Delaware Technology Park 1 Innovation Way,
Suite 100
Newark, DE 19711, US**

72 Inventor/es:

QIAN, MINGWEI

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 716 114 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistema y procedimiento para recoger una muestra de ácido nucleico

Campo de la invención

5 Los sistemas y procedimientos actuales para la recogida, extracción y detección de ácidos nucleicos desde muestras biológicas para su análisis son normalmente complicados al requerir múltiples etapas, con un personal entrenado técnicamente, y no están optimizados para procesar muestras en grandes volúmenes o para prevenir la contaminación cruzada en el procesado y estabilización de la muestra para su transporte.

10 Existe una serie de fluidos corporales, como sangre, plasma, suero, líquido ceforraquídeo (CSF), derrame pleural, ascitis, orina, etc., que contienen fragmentos de ácido nucleico (NA) de cadena corta, concretamente, ácidos nucleicos sin células (cfNA) o ácidos nucleicos circulantes (cNA). Los ácidos nucleicos alterados, que se originan endógenamente a partir de un tumor, o "exógenamente" desde el feto o una infección patogénica dentro del organismo, pueden estar presentes como cfNA en la sangre periférica en concentraciones muy bajas y pueden ser detectables y, además, distinguirse del cfNA hospedador normal. La extracción de una cantidad suficiente de dichos cfNA desde el plasma o el suero para su análisis requiere procesar un volumen relativamente grande de fluido, lo cual impone un inevitable reto técnico en situaciones de diagnóstico clínicas. Por consiguiente, existe la necesidad en el campo de nuevos procedimientos para satisfacer dichos retos.

15 En la solicitud publicada PCT pendiente WO2012135815, del mismo autor de la invención que la presente solicitud, se describen ejemplos de dichos procedimientos para detectar, por ejemplo, tuberculosis. Dichos análisis, sin embargo, pueden ser sobre todo útiles en regiones del mundo en las que se carece de un fácil acceso al caro equipo de procesamiento que se utiliza en los análisis de muestras. Por consiguiente, existe la necesidad en la técnica de un sistema de recogida y una metodología que permita capturar ácidos nucleicos en cantidades suficientes a partir de un gran volumen de muestras biológicas, para poner en marcha análisis posteriores, para prevenir la contaminación del entorno y los operadores y para conservar y transportar los ácidos nucleicos de manera que se puedan recoger los ácidos nucleicos en el centro de atención sanitaria utilizando un equipo relativamente económico y enviarse después en forma estabilizada a un emplazamiento central para posteriores procesamientos y ensayos.

20 Se conocen varios procedimientos de extracción adecuados para aislar ADN o ARN en circulación a partir de grandes volúmenes de fluidos biológicos, como los descritos por ejemplo en QIAamp® Circulating Nucleic Acid Handbook, (2ª edición, 02, 2011, Qiagen), y un mejor procedimiento de extracción en columna de centrifugación descrito en la patente estadounidense No. 5.234.809 (Boom Technology). La patente estadounidense No. 5.346.994 describe la tecnología de un procedimiento de extracción de líquido orgánico utilizando fenol-cloroforno. Ambos procedimientos se pueden utilizar para la extracción de grandes volúmenes, como por ejemplo desde muestras de plasma o suero, pero los reactivos orgánicos son tóxicos, lo cual limita su uso.

25 En las patentes estadounidenses N° 7.897.378 y 8.158.349 se describen dispositivos y procedimientos para purificar y aislar ácidos nucleicos a partir de volúmenes de muestra más grandes, incluyendo sistemas que comprenden un par de cuerpos huecos de cooperación a través de los cuales se pasan las muestras hasta un vaso de recogida, uniéndose los ácidos nucleicos con un material de unión en uno de los cuerpos huecos. Se transfiere el cuerpo hueco que contiene la muestra retenida a un primer vaso de recepción para su lavado, después se eluyen los ácidos nucleicos purificados o aislados y se recogen en un segundo vaso de recepción para su posterior análisis.

30 En la patente estadounidense N° 5.234.809 (Boom), por ejemplo, se desvela un procedimiento para aislar ácidos nucleicos que es adecuado para una multiplicidad de usos diferentes. Se describe un procedimiento para aislar ácidos nucleicos a partir de materiales de partida que contienen ácido nucleico incubando dicho material de partida con un tampón caotrópico y una fase sólida de unión a ADN. Los tampones caotrópicos, si es necesario, efectúan tanto la lisis del material de partida como la unión de ácidos nucleicos con la fase sólida.

Sumario de la invención

35 La invención se define por el ámbito de las reivindicaciones. Un aspecto de la invención se refiere a un procedimiento y a un sistema para procesar una muestra biológica. El procesamiento, tal como se hace referencia a ello en el presente documento comprende lisis, unión, lavado, estabilización y elución de las biomoléculas de la muestra biológica.

40 Una realización comprende un sistema para la recogida de una muestra de ácido nucleico, comprendiendo dicho sistema un receptáculo que define un volumen interno, un tapón desmontable para el receptáculo y que tiene una interfaz de conexión en comunicación fluida con el puerto de conexión de muestra en el tapón, una columna filtrante adaptada para fijarse de forma desmontable a la interfaz de conexión del tapón del receptáculo, un recipiente de recogida de muestra y un recipiente de transporte. El tapón desmontable para el receptáculo tiene un lado interno enfrente al volumen interno del receptáculo y un lado externo en el lado opuesto del volumen interno. El tapón tiene un puerto de ventilación que comunica el lado interno con el lado externo y un puerto de conexión de muestra que comunica el lado interno con el lado externo. El puerto de conexión de muestra tiene un primer componente de enclavamiento para enclavar de forma desmontable el puerto de conexión de muestra en el segundo componente de

enclavamiento de cooperación. La interfaz de conexión en comunicación fluida con el puerto de conexión de muestra está situada en el lado interno del tapón. La columna filtrante tiene un primer extremo abierto y un segundo extremo abierto y un paso interno entre ambos que contiene un sustrato para recoger el ácido nucleico. El recipiente de recogida de muestra comprende un segundo componente de enclavamiento adaptado para conectar el primer componente de enclavamiento del puerto de conexión de muestra en el tapón de receptáculo. El recipiente de transporte tiene un extremo abierto y define un volumen adaptado para contener la columna filtrante. El recipiente de transporte está adaptado para engancharse de forma desmontable a la columna filtrante para desprenderla de la interfaz de conexión del tapón de receptáculo. El recipiente de transporte comprende además una tapa desmontable para sellar temporalmente la columna filtrante dentro del recipiente de transporte. El recipiente de transporte contiene un desecante en algunas realizaciones.

El sustrato de la columna filtrante puede comprender un filtro, una frita de soporte aguas abajo del filtro y un anillo de retención aguas abajo del filtro. Los componentes de enclavamiento del puerto de conexión de muestra pueden comprender una conexión de enclavamiento Luer. En algunas realizaciones, el sistema puede comprender además una cámara de vacío que tiene una porción interna adaptada para estar conectada a una fuente de vacío y una porción externa que tiene uno o más pocillos, cada uno de los pocillos adaptado para recibir uno de los receptáculos, con uno o más puertos de conexión de vacío en comunicación con la porción interna de la cámara y adaptado para estar conectado con el puerto de ventilación del receptáculo a través de un conducto flexible.

En algunas realizaciones, la columna filtrante y el tapón de receptáculo están conectados funcionalmente mediante una interfaz roscada. La columna filtrante puede tener un primer elemento, como por ejemplo una primera lengüeta, dispuesta en su superficie externa adaptada para engancharse de forma desmontable a través de un segundo medio de cooperación, como pueda ser una segunda lengüeta dispuesta en la superficie interna del recipiente de transporte, de tal modo que el segundo elemento transmita la fuerza al primer elemento cuando se aplica una fuerza de torsión en la columna filtrante en una dirección de desenroscado de la columna filtrante desde la conexión roscada con el tapón del receptáculo.

El sistema puede comprender además a puerto de tres vías que tiene un primer puerto adaptado para quedar dispuesto para el puerto de conexión de muestra del tapón de receptáculo, un segundo puerto adaptado para su conexión con el recipiente de recogida y un tercer puerto adaptado para su conexión con una fuente de fluido que contiene un fluido para tratar la muestra una vez recogida. Pueden estar conectados al tercer puerto uno o más recipientes de fluido, como fluido de lavado, como por ejemplo etanol.

El recipiente de recogida puede comprender una jeringuilla y el puerto de tres vías puede comprender una válvula de retención adaptada para permitir exclusivamente el flujo desde el recipiente de recogida al receptáculo cuando existe una presión relativa positiva entre el recipiente de recogida de la muestra y el receptáculo, y para permitir exclusivamente el flujo desde la fuente de fluida al recipiente de recogida cuando existe una presión relativa negativa ente el recipiente de recogida de la muestra y la fuente de fluido.

Se desvela además un tapón desmontable estéril para un receptáculo, teniendo el tapón un lado interno para quedar enfrentado al volumen interno del receptáculo y un lado externo opuesto al lado interno, comprendiendo el tapón un puerto de ventilación que comunica el lado interno con el lado externo y un puerto de conexión de muestra que comunica el lado interno con el lado externo, comprendiendo el puerto de conexión de muestra un primer componente de enclavamiento para enclavar de forma desmontable el puerto de conexión de muestra con el segundo componente de enclavamiento de cooperación, comprendiendo el lado interno del tapón una interfaz de conexión en comunicación fluida con el puerto de conexión de muestra. Puede fijarse una columna filtrante estéril de manera desmontable a la interfaz de conexión del tapón de receptáculo, teniendo la columna filtrante un primer extremo abierto, un segundo extremo abierto y un conducto interno entre ambos que contiene un sustrato para recoger el ácido nucleico.

Otro aspecto de la invención comprende un procedimiento para recoger una muestra de ácido nucleico, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) proporcionar el sistema de recogida descrito en el presente documento; (b) recoger un volumen de fluido que contiene la muestra en el recipiente de recogida de muestra; (c) conectar el recipiente de recogida de muestra con el receptáculo a través del puerto de conexión de muestra; (d) pasando el volumen de fluido que contiene la muestra del recipiente de recogida de muestra a través de la columna filtrante, con lo cual se recoge la muestra sobre el sustrato y se recoge el resto en el receptáculo; (e) colocar el extremo abierto del recipiente de transporte sobre la columna filtrante, enganchar la columna filtrante con el recipiente de transporte y desprender la columna filtrante del tapón de receptáculo; y (f) sellar temporalmente el recipiente de transporte con la tapa desmontable. El fluido que contiene muestra puede comprender, por ejemplo, un lisado que comprende un extracto de fluido corporal recogido de un paciente. Cuando el recipiente de recogida de muestra comprende una jeringuilla, la etapa de pasar el volumen a través de la columna filtrante puede comprender aplicar presión manualmente al émbolo de la jeringuilla en una realización, o fijar el puerto de ventilación del tapón de receptáculo a una fuente de vacío y aplicar después una presión negativa a través de la columna filtrante utilizando una fuente de vacío, en otra realización.

En ciertas realizaciones, la muestra recogida sobre el sustrato puede tratarse además después de la etapa (d) pasando uno o más volúmenes de fluido, como por ejemplo un fluido de lavado deshidratante como etanol, a través

de la columna filtrante antes de realizar la etapa (e). Por otra parte, se puede proporcionar un desecante en el recipiente de transporte. Se puede transportar una muestra deshidratada y mantenida seca con un desecante en condiciones ambiente, sin climatización y puede ser estable hasta 4 semanas antes de un procesamiento posterior una vez completada la etapa (f). Dicho procedimiento puede ser particularmente útil para procesar el ácido nucleico recogido en una situación de un centro de atención mínimamente equipado, como pueda ser una clínica pequeña, remota y/o periférica y enviar las muestras recogidas a un laboratorio central mejor equipado para el posterior análisis de las muestras recogidas para detección de una enfermedad, como pueda ser la detección de una tuberculosis latente.

Breve descripción de los dibujos

- 10 Fig. 1A representa una vista plana de una realización de un ejemplo de tapón de receptáculo.
 Fig. 1B representa una vista en perspectiva lateral del ejemplo de tapón de receptáculo de la Fig. 1A.
 Fig. 1C representa una vista transversal del ejemplo de tapón de receptáculo de la Fig. 1A.
 Fig. 2A representa un ejemplo de columna filtrante para fijarse al tapón de receptáculo ilustrativo de la Fig. 1.
 Fig. 2B representa una sección transversal del ejemplo de columna filtrante de la Fig. 2A
 15 Fig. 3 es una vista despiezada de la columna filtrante de la Fig. 2A y el tapón de receptáculo de la Fig. 1 que muestra cómo forman una interfaz uno con otro.
 Fig. 4 representa el tapón de receptáculo de la Fig. 1A fijado a un ejemplo de receptáculo.
 Fig. 5 representa un ejemplo de diseño de cámara de vacío para sujetar una pluralidad de receptáculos ilustrativos de la Fig. 4.
 20 Fig. 6A representa un ejemplo de porción inferior de recipiente de transporte.
 Fig. 6B ilustra cómo el recipiente de transporte ilustrativo de la Fig. 6A encaja en la columna filtrante ilustrativa para desenroscarla del tapón de receptáculo 1A ilustrativo.
 Fig. 6C es un dibujo en sección transversal de una porción superior de un recipiente de transporte ilustrativo.
 Fig. 6D es un dibujo transversal de la porción inferior del recipiente de transporte ilustrativo de 6A sellado con la
 25 porción superior del recipiente de transporte ilustrativo de la Fig. 6C.
 Fig. 6E es una vista en perspectiva del recipiente de transporte sellado de la Fig. 6D.
 Fig. 7A representa un recipiente de lisis que contiene solución de lisis en forma acuosa.
 Fig. 7B representa el contenedor de lisis de 7A que contiene solución de lisis en forma deshidratada.
 Fig. 8A presenta curvas de amplificación por RT-qPCR y qPCR para los fragmentos de gen humano B2M, PPIA y un gen TB IS6110, mediante pares de cebadores HB2M11, HPPIA11 e IS6110, para extractos de plasma humano de donantes de HC y LTBI, respectivamente.
 30 Fig. 8B presenta las curvas de fusión de amplicón para fragmentos de gen humano B2M, PPIA y un gen TB IS6110, mediante pares de cebadores HB2M11, HPPIA11 e IS6110, para extractos de plasma humano de donantes de HC y LTBI, respectivamente.

Descripción detallada de la invención

Un aspecto de la invención es un sistema para recoger una muestra de ácido nucleico. El sistema ilustrativo comprende un receptáculo, como por ejemplo receptáculo 400 de la Fig. 4, que define un volumen interno. Si bien se muestra con una geometría ilustrativa, la invención no queda limitada a ningún tamaño ni forma en particular del receptáculo. El receptáculo tiene un tapón desmontable 101, como por ejemplo la realización ilustrativa representada en las Figs. 1A-1C, que tiene un lado interno 107 enfrentado al volumen interno del receptáculo y un lado externo 102 opuesto al volumen interno. La Fig. 1A muestra el lado externo del tapón. El tapón tiene un puerto de ventilación 105, como por ejemplo una conexión de deslizamiento Luer macho, que comunica el lado interno con el lado externo a través del paso 106, y un puerto de conexión de muestra 103 que comunica el lado interno con el lado externo, a través del paso 104. El puerto de conexión de muestra comprende un primer componente de enclavamiento, como por ejemplo una conexión de enclavamiento Luer 120, para enclavar de forma desmontable el puerto de conexión de muestra a un segundo componente de enclavamiento de cooperación de un recipiente de transferencia de muestra (no se muestra), como por ejemplo una jeringuilla. Ambos puertos 120 y 105 pueden abrirse o cerrarse fácilmente mediante los tapones o clavijas de conexión Luer (no se muestra). Cuando se aplica una presión hacia abajo en el émbolo de la jeringuilla conectada al puerto 120 para forzar el movimiento del líquido, se abre el puerto 105 para permitir que se desplace el aire para que salga por el receptáculo 400. Cuando se utiliza vacío para forzar el movimiento del líquido desde una fuente conectada (que puede seguir siendo una jeringuilla), se conecta el puerto 105 a una fuente de vacío. El lado interno del tapón comprende una interfaz de conexión 108 en comunicación fluida con el puerto de conexión de muestra 103. El tapón puede roscarse con una rosca hembra 110 para roscarse a un receptáculo que tiene roscas macho (no se muestran), si bien puede utilizarse cualquier conexión funcional entre el tapón y el receptáculo.

Se adapta de forma desmontable una columna filtrante con una matriz de extracción de fase sólida dentro, como por ejemplo una membrana de gel de sílice, frita de vidrio poroso sinterizado o papel de filtro de fibra de vidrio, como pueda ser la columna filtrante 200 ilustrativa representada en las Figs. 2A y 2B, con la interfaz de conexión del tapón de receptáculo. Por ejemplo, tal como se muestra en Fig. 1C, la interfaz de conexión 108 puede tener roscas hembra que encajan con las roscas macho 220 en la columna filtrante 200. La columna filtrante tiene extremos abiertos 202 y 204 y un paso interno 206 entre ambos que contiene un sustrato 212 para recoger el ácido nucleico. La columna filtrante puede denominarse también "cuerpo hueco" ya que está diseñada para que pase el fluido a través suyo sin

que se quede retenido el fluido dentro de manera que el fluido queda retenido dentro en un vaso o un receptáculo. El sustrato de la columna filtrante 212 puede estar adyacente a una frita porosa 214 y un anillo de retención 210 puede crear un enganche por fricción contra el interior de la columna para retener el sustrato y la frita en una posición adyacente al cuello de la columna filtrante.

5 El sustrato 212 puede comprender una matriz de unión a columna que comprende una matriz sólida que permite que el fluido pase a través de la matriz. En ciertos aspectos, la matriz es altamente porosa de manera que aumenta al máximo el área superficial expuesta a las soluciones de tampón y de este modo aumenta al máximo la capacidad de unión de la matriz. Una matriz puede estar hecha de varios materiales. En ciertas realizaciones específicas, la matriz de unión puede ser un material de sílice (formado principalmente de SiO_2), como por ejemplo fibra de vidrio, perlas de sílice, gel de sílice, frita de vidrio poroso sinterizado, etc., Se conocen diversos proveedores de matriz de sílice en el mercado, como por ejemplo filtros de fibra de vidrio de tipo GF/A, GF/B, GF/C, GF/D y GF/F producidos por Whatman (NJ). Dichos filtros son particularmente conocidos para su uso en la purificación de moléculas de ácido nucleico. En otras realizaciones, se pueden aplicar diversas matrices sólidas, como matrices modificadas superficialmente, de afinidad y de intercambio de iones adecuadas para determinada extracción de biomolécula y separación. La matriz de unión puede ser cualquier material en el que se puedan integrar partículas fibras del material de unión de ácido nucleico. El material de matriz es generalmente permeable a los líquidos de manera que la muestra puede pasar a través de la matriz, los ácidos nucleicos hacen contacto con el material de unión de ácido nucleico y se unen a él y otros componentes de la muestra pueden salir de la matriz. La matriz de unión puede comprender cualquier material de soporte conocido en la técnica, incluyendo materiales seleccionados del grupo que consiste en materiales silíceos, gel de sílice, vidrio, zeolita, óxido de aluminio, dióxido de titanio, dióxido de zirconio, caolín, sílice gelatinosa, partículas magnéticas, una frita de vidrio poroso sinterizado y materiales de soporte cerámicos o poliméricos. El material de unión a ácido nucleico puede ser cualquier material al que se unan los ácidos nucleicos (normalmente, no covalentemente) en determinadas condiciones, al mismo tiempo que otras sustancias en la muestra no se unen en dichas condiciones. La unión de ácido nucleico es normalmente reversible, de manera que los ácidos nucleicos pueden eluirse posteriormente de nuevo desde el material cambiando las condiciones.

En una realización, la columna 200 puede tener una geometría similar a la columna Mobicol, distribuida por Boca Scientific (FL), o puede ser una versión especialmente modificada o especialmente fabricada de la misma. Un diseño con dicha geometría puede centrifugarse en una microcentrífuga y permite que se puedan procesar muestras con un gran volumen fácilmente con una jeringuilla. La frita porosa 214 puede comprender plástico inerte con un tamaño de poro de 10-90 μm . La matriz de extracción sólida (sustrato) puede comprender papel de filtro GF/D (Whatman, NJ), como por ejemplo fabricado por troquelado del papel de filtro en discos que encajan dentro del diámetro interior de la columna. Se pueden colocar dos o más capas de los discos de filtro en la parte superior de la frita. Puede colocarse un anillo de apoyo (Ring-Store, WA), por ejemplo un anillo hecho de PTFE (como Teflon®) o plástico como polietileno (PE) o polipropileno (PP), encima de los discos de filtro (tal como se observa en la Fig. 2A) para prevenir que se desplacen los discos de filtro.

El agente de apertura y el recipiente de transporte, como pueda ser el recipiente ilustrativo 650 representado en una configuración completamente ensamblada en la Fig. 6E, comprende una porción inferior 600 y una porción superior que se acopla 610. La porción inferior de cooperación y la porción superior definen un volumen adaptado para contener la columna filtrante para el transporte. La porción inferior 600 del recipiente de transporte tiene una parte superior abierta y está adaptada para engancharse de forma desmontable con la columna filtrante para desprenderla de la interfaz de conexión del tapón de receptáculo. Por ejemplo, la columna filtrante puede tener una lengüeta 222 representada en la Fig. 2A que está enganchada mediante una escotadura 602 de la Fig. 6A. El recipiente de transporte encerrado está sellado con respecto al entorno para evitar que la contaminación y la humedad puedan causar una degradación acelerada (hidrólisis) del ácido nucleico, en particular ARN. El recipiente de transporte encerrado puede comprender además un desecante pre-embalado que induce o sostiene un estado de sequedad (deseccación), como pueda ser un granulado o una forma en perlas de gel de sílice, como por ejemplo el desecante 612 representado en la porción superior del recipiente en las Figuras 6C y 6D. El emplazamiento del desecante también podría estar en una porción inferior del recipiente y no está limitado a ningún emplazamiento o configuración concreta. El desecante puede comprender cualquier material adecuado conocido en la técnica para proporcionar y sostener desecación, como por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, arcilla de montmorillonita, cloruro de litio, alúmina activada, silicato de aluminio alcalino, briquetas DQ11, gel de sílice, tamiz molecular, sulfato de calcio u óxido de calcio. El desecante puede contener un indicador de humedad que cambia gradualmente su color cuando experimenta una transición desde el estado anhidro (seco) al hidratado (húmedo), tal como se sabe para algunos geles de sílice.

Aunque se presenta con el puerto de conexión de muestra que sobresale desde el lado externo del tapón con una conexión de enclavamiento Luer, la invención no queda limitada a ningún tipo en particular de conexión de enclavamiento, ni tampoco a ninguna configuración en particular del puerto de conexión de muestra. Si bien son preferentes ciertos tipos de enganches de enclavamiento entre el puerto de conexión de muestra y el recipiente de muestra, es posible proporcionar cualquier tipo de enganche de enclavamiento reversible. No se muestra el recipiente de transferencia de muestra, pero puede ser una jeringuilla convencional con una conexión de enclavamiento Luer de cooperación. En un procedimiento ilustrativo por tanto, se enclava la jeringuilla con el tapón del receptáculo y se presiona el émbolo de la jeringuilla para forzar la solución que contiene ácido nucleico en

presencia de reactivos de unión, como por ejemplo reactivos caotrópicos y alcohol, para que pase a través de la columna filtrante. De esta forma se retiene el ácido nucleico en el filtro 212, al tiempo que el filtrado pasa al receptáculo 400. Tal como se ha señalado, el émbolo de la jeringuilla puede presionarse manualmente con el puerto 105 abierto o puede fijarse una fuente de vacío al puerto 105 de manera que el vacío hace que se presione el émbolo de la jeringuilla a medida que la solución deja vacía la jeringuilla.

Los reactivos caotrópicos son muy conocidos en la técnica como sustancias que cambian la estructura secundaria, terciaria y/o cuaternaria de las proteínas o ácidos nucleicos pero no afectan al menos su estructura primaria. Entre los ejemplos se incluyen guanidinio, tiocianato, clorhidrato de guanidinio, NaI, KI, tiocianato de sodio o combinaciones de estas sustancias. Los reactivos caotrópicos alteran la estructura ordenada de agua líquida y hacen que el ADN o ARN se unan desde esta solución acuosa a una superficie de vidrio. En ciertas condiciones, la inclusión de alcohol, como etanol o alcohol isopropílico facilita la unión de NA a la superficie. Pueden estar presentes sustancias como NaCl, KCl o CaCl₂ en la solución para modificar la concentración iónica. La propiedad de ADN y ARN de unirse en condiciones caotrópicas a las superficies de vidrio se utiliza para aislarlos de la solución que contiene otros materiales biológicos. La unión a la superficie de vidrio es reversible, como por ejemplo, cuando se reduce la concentración de reactivos caotrópicos o se eliminan completamente los reactivos caotrópicos, es posible volver a eluir ADN o ARN.

Por lo tanto, el sistema de recogida puede comprender además una cámara de vacío 500, tal como se representa en la Fig. 5. La cámara de vacío está adaptada para su conexión a una fuente de vacío, como por ejemplo a través del puerto de conexión 530, que está en comunicación con el volumen interior de la cámara de vacío a través del paso 540. La parte exterior de la cámara de vacío 500 tiene una pluralidad de pocillos 520, adaptado cada pocillo para recibir uno de los receptáculos 400. Hay una pluralidad de puertos de conexión de vacío 510 en comunicación con la porción interna de la cámara y adaptada para su conexión con el puerto de ventilación 105 del tapón del receptáculo 101 a través de un conducto flexible (no se muestra). Por lo tanto, por ejemplo, la pluralidad de pocillos puede cargarse con los receptáculos, conectarse cada tapón de receptáculo a uno de los puertos de vacío 510 de modo que el vacío haga que el fluido que contiene muestra en una pluralidad de recipientes de transferencia de muestra se filtre a través de una pluralidad de columnas filtrantes hasta una pluralidad de receptáculos. Si bien se muestra con una pluralidad de pocillos en la cámara de vacío, la cámara de vacío puede tener solamente un único pocillo, o más o menos pocillos, que los representados. Los puertos de vacío en la cámara de vacío pueden tener tapones o válvulas desmontables de manera que la cámara pueda utilizarse con menos que la totalidad de puertos de vacío conectados a receptáculos en los pocillos de receptáculo.

El sistema de recogida puede comprender además un recipiente de lisis (Fig. 7A and 7B) que contiene reactivos de lisis pre-formulados y una primera jeringuilla para transferir la muestra de líquido (suero, plasma) al recipiente de lisis y una segunda jeringuilla para transferir al dispositivo de extracción. Cada jeringuilla comprende preferentemente una aguja de metal o de plástico que es segura (roma) y lo suficientemente larga como para alcanzar el fondo del recipiente correspondiente desde el que se extrae el líquido utilizando la jeringuilla y tiene un diámetro interior (DI) lo suficientemente grande como para permitir el flujo de líquido relativamente rápido. Los reactivos de lisis pueden comprender por ejemplo al menos un detergente iónico, como Triton X-100 o BJ58 o una combinación del detergente no iónico con un detergente aniónico, como lauroil sarcosinato sódico, una proteasa como proteinasa K, una sal o un agente caotrópico, como cloruro de litio, guanidina, tiocianato de guanidina, urea, un agente reductor como ditiotreitól (DTT), un quelante como y ácido etilen diamina tetraacético (EDTA) y un tampón como tris(hidroximetil)aminometano (Tris). Se sabe perfectamente que guanidina y tiocianato de guanidina tiene una fuerte actividad inhibidora de ADNasa y ARNasa a concentración molar. Los reactivos de lisis pueden estar en forma de solución o seca (deshidratados) por ejemplo por liofilización (deshidratado por congelación) o revestir por pulverización el recipiente de lisis.

Las muestras en formas de fluidos acuosos, como sangre, plasma, suero, esputo, saliva, orina, líquido cefalorraquídeo (CSF), derrame pleural, fluido peritoneal, fluido sinovial, etc., puede agregarse directamente, o con agua adicional, en el recipiente de lisis, por pipeteado o a través de un recipiente de transferencia de muestra, como por ejemplo, la primera jeringuilla con una aguja relativamente larga (tal como se ha explicado, no se muestra). Cuando se agrega el fluido acuoso en el recipiente de lisis, se mezcla el fluido de muestra con la solución de lisis o se rehidratan los reactivos de lisis deshidratados para formar una mezcla de muestra- tampón de lisis completa. Las muestras preferentes son plasma o suero y los volúmenes preferentes de plasma o suero recogidos se encuentra en el intervalo de 1-20 ml, más preferentemente al menos 2 ml, incluso más preferentemente 2-10 ml y lo más preferente 2-5 ml.

Pueden agregarse al recipiente de lisis otras muestras en forma de alta viscosidad o en forma semisólida y sólida, como por ejemplo pusos, suspensiones celulares y tejidos con agua adicional en la cantidad que sea necesaria para rehidratar los reactivos de lisis deshidratados, para mantener la relación óptima entre el volumen de la muestra y la solución de lisis.

La incubación en el proceso de lisis puede acelerarse a temperaturas elevadas (por encima de la temperatura ambiente), colocando el recipiente de lisis en un baño de agua caliente o un bloque de calentamiento. La temperatura elevada para la lisis puede ser a 50-65 °C, por ejemplo, cuando la encima de digestión es proteinasa K. El período de incubación para completar la lisis de la muestra se encuentra normalmente en el intervalo de 5

minutos a 4 horas o, más preferentemente, en el intervalo entre 10 y 30 minutos, pero la invención no queda limitada a ningún período de incubación en particular.

Una vez completada la lisis de la muestra tras un breve período de incubación, puede agregarse la solución de unión-extracción en el recipiente de lisis por pipeteado, vertido o mediante una jeringuilla en el recipiente de solución de unión-extracción (no se muestra).

Se transfiere la mezcla completa de los fluidos de unión-extracción de lisis de la muestra al receptáculo a través de un recipiente de transferencia de muestra, como por ejemplo una jeringuilla (no se muestra) para el proceso de extracción. El receptáculo sirve como recipiente de recogida de residuos, que recoge todos los líquidos residuales de los procesos de extracción y lavado que se realicen.

En una realización preferente, tras la extracción, se puede procesar la muestra recogida por:

1. Lavado con un tampón de lavado para eliminar la contaminación de las muestras biológicas y para lavar las sales del tampón de extracción y lisis que podría interferir o inhibir, si no, en las aplicaciones aguas abajo. En una realización preferente, se puede utilizar un volumen relativamente grande en una sola etapa de lavado. El volumen preferente puede estar en el intervalo de 1 a 10 ml, más preferentemente de 1 a 5 ml y lo más preferente de 2 a 4 ml. En cambio, en los procedimientos convencionales se emplean generalmente dos tampones de lavado diferentes y se realizan dos etapas de lavado, normalmente, menos de 1 ml cada una, debido a las limitaciones de tamaño en la columna dictadas por el tamaño de la centrifuga.

2. Aclarado con un lavado deshidratante que no es agua, como por ejemplo etanol al 100 % (preferente) o acetona al 100 % para limpiar mejor los contaminantes y deshidratar la matriz. En este punto, además, se utiliza un volumen relativamente grande para deshidratar la matriz para preservar el NAc. El volumen preferente del líquido de lavado de etanol o acetona está en el intervalo de 1 a 10 ml, más preferentemente al menos 2 ml o lo más preferente de 2 a 6 ml. También en este caso, en cambio, en los procedimientos convencionales se emplea generalmente menos de 1 ml debido a las limitaciones de tamaño que se han mencionado. Es posible que algunos procedimientos convencionales no utilicen lavado con etanol, acetona u otro deshidratante en absoluto.

Aunque se presenta con una lengüeta en la columna filtrante y una muesca de acoplamiento en el recipiente de transporte, es posible proporcionar cualquier elemento dispuesto en la columna filtrante adaptado para engancharse de forma desmontable con un segundo elemento de cooperación dispuesto en el recipiente de transporte y capaz de transmitir suficiente fuerza a la columna filtrante como para desenroscarla de la conexión roscada con el tapón del receptáculo. De manera similar, aunque se muestra con una conexión roscada entre la columna filtrante y el tapón de receptáculo, puede emplearse cualquier tipo de conexión de enclavamiento y los correspondientes elementos de dicho sistema pueden utilizar cualquier tipo de cooperación entre el recipiente de transporte y la columna filtrante para desprender la columna filtrante del tapón y, preferentemente, de forma estéril.

El sistema de recogida puede tener una válvula de tres vías dispuesta entre el recipiente de transferencia de muestra y el puerto de conexión de la muestra sobre el tapón de receptáculo. Dicha válvula de tres vías puede tener un primer puerto adaptado para quedar dispuesto para el puerto de conexión de muestra del tapón de receptáculo, un segundo puerto adaptado para su conexión con el recipiente de recogida y un tercer puerto adaptado para su conexión con una fuente de fluido que contiene un fluido, como un fluido de lavado que contiene etanol, para tratar la muestra una vez recogida. Un kit para recoger el ácido nucleico puede incluir una cantidad de fluido necesaria para proporcionar un nivel deseado de lavado, estabilización u otro tipo de tratamiento. En una realización, el recipiente de recogida puede comprender una jeringuilla y la válvula de tres vías puede comprender una válvula de retención adaptada para permitir exclusivamente el flujo desde el recipiente de transferencia hasta el receptáculo cuando existe una presión relativa positiva entre el recipiente de transferencia de muestra y el receptáculo y para permitir exclusivamente el flujo entre la fuente de fluido hasta el recipiente de transferencia cuando existe una presión relativa negativa entre el recipiente de transferencia de muestra y la fuente de fluido. Por tanto, cuando se presiona el émbolo de la jeringuilla, se descarga el fluido a través de la columna filtrante y cuando se saca el émbolo de la jeringuilla, el fluido llena la jeringuilla desde la fuente de fluido conectada. Por consiguiente, un movimiento repetido de empuje, tracción, empuje con la jeringuilla puede descargar la muestra original, extraer el fluido de lavado hasta la jeringuilla y descargar el fluido de lavado hasta el receptáculo. Por tanto, el empuje y tracción repetidos del émbolo puede realizar tantas etapas de lavado como se desee.

Las columnas filtrantes pueden dimensionarse para encajar en el soporte de muestra (no se muestra) para recibir una pluralidad de columnas filtrantes y adaptarse para encajar una centrifuga para centrifugar la pluralidad de columnas filtrantes en conjunto de una vez, como por ejemplo, pero sin limitarse a ellos un tamaño acomodado para encajar un formato de 96 pocillos para el manejo y procesamiento semiautomático y completamente automático.

El sistema de recogida puede venderse como parte de un kit que comprende uno o más de los materiales requeridos para realizar un tipo de análisis en particular, como por ejemplo, pero sin limitarse a los siguientes: medios para extraer una muestra de fluido de un paciente (por ejemplo una aguja y una jeringuilla para extraer sangre, suero, plasma u otros fluidos del cuerpo), lisis para descomponer las células o partículas en la muestra de fluido, el recipiente de lisis para soportar la muestra más la solución de lisis durante un período de tiempo deseado, el recipiente de transferencia de muestra (como por ejemplo una jeringuilla u otro tubo), tal como se ha explicado

anteriormente para acoplarse con el receptáculo tal como se ha explicado, el tapón de receptáculo tal como se ha explicado anteriormente con la columna filtrante instalada en él, cualquier fluido de lavado u otro tipo de tratamiento necesario para preparar o estabilizar la muestra para transporte y el recipiente de transporte, tal como se ha explicado.

- 5 En otras realizaciones, las diversas partes mencionadas pueden venderse por separado. Teóricamente, para la mayoría de los tipos de análisis y, en particular, para el procedimiento de detección de tuberculosis al que se ha hecho referencia, todas las partes que tocan la muestra o la muestra que contiene fluido desde el momento que se extrae del paciente hasta que se deposita el ácido nucleico en el sustrato en la columna filtrante, deberán ser estériles y no estar contaminados por ácido nucleico de otras fuentes, como por ejemplo, del operador ni del entorno, ni tampoco deberán estar contaminados por ADNasas y ARNasas universalmente existentes, que degradan rápidamente el ácido nucleico. Los distintos recipientes, jeringuillas y receptáculos que se han explicado pueden ser componentes convencionales muy conocidos en el laboratorio/centros de atención clínica. El tapón de receptáculo innovador, sin embargo, con una columna filtrante conectada, está especializado para este sistema de recogida en particular.
- 10
- 15 Por lo tanto, se desvela además un tapón desmontable estéril para un receptáculo que tiene un lado interno para estar enfrentado al volumen interno del receptáculo y un lado externo opuesto al lado interno, comprendiendo el tapón un puerto de ventilación que comunica el lado interno con el lado externo y un puerto de conexión de muestra que comunica el lado interno con el lado externo, comprendiendo el puerto de conexión un primer componente de enclavamiento para enclavar de forma desmontable el puerto de conexión de la muestra con el segundo
- 20 componente de enclavamiento de cooperación, comprendiendo el lado interno del tapón una interfaz de conexión en comunicación fluido con el puerto de conexión de muestra. El tapón desmontable descrito puede venderse por separado o en otra realización, completo con una columna filtrante estéril, tal como se ha explicado, fijada de forma desmontable con la interfaz de conexión del tapón de receptáculo.

25 Todas las partes del sistema descritas en el presente documento pueden realizarse a través de un procedimiento conocido en la técnica, como por ejemplo, moldeo por inyección de termoplástico. Los termoplásticos preferentes incluyen polietileno (PE), polipropileno (PP) y poli(tereftalato de etileno) (PET), pero la invención no queda limitada a ningún material ni procedimiento de construcción en particular.

Un procedimiento ilustrativo para utilizar el sistema que se explica en el presente documento puede llevarse a cabo del siguiente modo:

- 30 (a) recoger un volumen de fluido que contiene la muestra, que puede tratarse o incubarse con un tapón de lisis y un tampón de unión con agentes caotrópicos, sales y precipitantes, como alcohol, en un recipiente para liberar los ácidos nucleicos de complejos, células u otras partículas en una muestra biológica. El lisado en bruto puede transferirse al recipiente de transferencia de muestra (como por ejemplo una jeringuilla) o puede tener lugar la etapa de recogida dentro de un recipiente de transferencia de muestra adecuado;
- 35 (b) conectar el recipiente de transferencia de muestra con el receptáculo a través del puerto de conexión de muestra;
- (c) pasar el volumen de fluido que contiene la muestra desde el recipiente de transferencia de muestra a través de la columna filtrante, recogiendo así ácido nucleico en la muestra lisada en bruto sobre el sustrato y recoger el resto en el receptáculo;
- 40 (d) lavar la matriz de filtro unida al ácido nucleico en la columna con tampones de lavado.
- (e) deshidratar (y también lavar y desalar también simultáneamente) la matriz unida a ácido nucleico pasando un volumen de disolvente a través de la columna, preferentemente con 100 % de etanol o acetona.
- (f) colocar la porción inferior del recipiente de transporte sobre la columna filtrante, enganchar la columna filtrante con el recipiente de transporte y desprender la columna filtrante de tapón de receptáculo;
- 45 (g) Sellar temporalmente el recipiente de transporte acoplado la porción superior del recipiente de transporte a la porción inferior del recipiente de transporte. El recipiente de transporte sellado contiene preferentemente un bolsillo de absorbente de humedad (desecante) como por ejemplo un gel de sílice granulado o en perlas.

50 A diferencia de las moléculas de ADN que son relativamente estables, las moléculas de ARN son más susceptibles de degradación debido a la capacidad de los grupos 2'-hidroxilo adyacentes a los enlaces fosfodiéster en el ARN de actuar como nucleófilos intramoleculares en la hidrólisis catalizada tanto por una base como por una enzima.

La etapa de lavado (d) puede comprender el tratamiento de la muestra recogida en el sustrato pasando uno o más volúmenes de fluido de tratamiento a través de la columna filtrante. Por ejemplo, el tratamiento puede comprender estabilizar la muestra de ácido nucleico para el transporte, por ejemplo lavar la muestra con un fluido de lavado, como pueda ser un fluido que comprende etanol. En una realización en la que el recipiente de transferencia de muestra comprende una jeringuilla el procedimiento de pasar el volumen a través de la columna filtrante puede comprender aplicar manualmente presión sobre el émbolo de la jeringuilla. En otra realización en la que el recipiente de transferencia de muestra comprende una jeringuilla, el procedimiento de pasar el volumen a través de la columna filtrante puede comprender fijar el puerto de ventilación del tapón de receptáculo a una fuente de vacío y aplicar después una presión negativa a través de la columna utilizando la fuente de vacío. Dicho procedimiento puede realizarse colocando el receptáculo en uno de los pocillos de la cámara de vacío que se muestra en la Fig. 5 y

60

conectar el puerto de ventilación del tapón de receptáculo a un puerto de vacío adyacente. Cuando está listo para el ensayo de ácido nucleico aguas abajo, el ácido nucleico unido al sustrato en la columna filtrante se libera y sale por elución de la columna filtrante, por ejemplo añadiendo una pequeña cantidad de tampón de elución o agua pura al filtro (matriz sólida) para liberar el ácido nucleico unido y recoger el eluido en otro recipiente pequeño aplicando presión a través de la columna o, preferentemente, por centrifugación.

Sin limitarse a ningún uso en particular, el sistema de recogida mencionado puede ser particularmente útil en conexión con un procedimiento de detección de tuberculosis, tal como se señala a continuación, en el presente documento. El sistema y el procedimiento pueden ser particularmente útiles, sin embargo, por lo que respecta a cualquier procedimiento en el que se utilice la recogida de cfNA para diagnóstico, como puedan ser procedimientos para el diagnóstico precoz de trastornos genéticos del feto, diagnóstico de tumor e infecciones en los tejidos profundos como LTBI. En suma, el sistema y el procedimiento pueden ser particularmente útiles por lo que respecta a cualquier procedimiento basado en evaluación de material de NA que contenga alteraciones en la información de NA que se puedan distinguir desde el organismo hospedador. El sistema y el procedimiento descritos en el presente documento son particularmente útiles en los campos en los que es importante la extracción y la conservación. Detectar bajas concentraciones de cfNA en la sangre requiere un volumen de muestra relativamente grande (2-5-10 ml) ya que, cuando se agregan los reactivos, el volumen total alcanza fácilmente 20-50 ml, que es un volumen difícil de manejar o automatizar mediante el uso de los procesos existentes anteriormente. ARN presenta problemas debido a su estabilidad. Por consiguiente, el método y el sistema son particularmente adecuados para procesos que se basan en la detección de bajas concentraciones de cfNA, específicamente ARN, en fluidos corporales.

Ejemplos

Ejemplo 1- Construcción de dispositivo MOE

Se construyó un prototipo de la columna filtrante 200, tal como se representa en la Fig. 4. La columna filtrante Mobicol fue suministrada por Boca Scientific (FL) con una frita de filtro poroso 214 acoplada a la columna. Se troqueló un disco de matriz de absorción 212 de un tamaño adecuado a partir de papel de filtro de fibra de vidrio GF/D (Whatman, NJ) y se insertó en la parte superior del filtro poroso, a continuación, se colocó firmemente un anillo de refuerzo de Teflón 216 (theoringstore.com) sobre la parte superior del disco de matriz de absorción, para fijar el conjunto. Se roscó un tapón con una conexión de enclavamiento Luer en la parte superior y se selló la columna filtrante. El tapón con la columna filtrante ensamblada se roscó entonces y selló en un tubo de centrifuga desechable de plástico de 50 ml vacío. En adelante, se hace referencia en el presente documento al dispositivo en su conjunto, tal como se ha descrito, como dispositivo MOE (Extracción de operación manual). Se rosca y se sella el tapón de enclavamiento Luer con la columna filtrante MOE debajo sobre un tubo de centrifuga desechable de plástico de 50 ml. Los múltiples dispositivos de filtro MOE utilizados en los ejemplos a continuación pueden construirse de la misma forma.

Ejemplo 2 – Extracción de ácidos nucleicos sin células de suero de becerro bovino

En este experimento, se utilizó suero de becerro bovino (BCS) congelado, disponible en el mercado, como biomaterial modelo experimental, ya que es económico, es una fuente suficiente y contiene ácidos nucleicos sin célula bovinos de origen natural. La interpretación de los resultados cuantitativos de este BCS, en lo que respecta a las secuencias de ácidos nucleicos detectadas deberán limitarse a este lote. El BCS utilizado, suero de becerro bovino HyClone™ (Cat. SH30072.03), fue suministrado por Fisher Scientific (MA). Tras su recepción, se descongeló el BCS a temperatura ambiente con agitación. Una vez descongelado completamente, se repartió el BCS en partes alícuotas y se volvieron a congelar hasta su uso. Para mayor consistencia, se descongelaron todas las partes alícuotas de BCS a temperatura ambiente una vez solamente inmediatamente antes de su uso.

Se extrajeron los cfNA en BCS con un kit de ácido nucleico circulante QIAamp (cat. 55114, Qiagen Estados Unidos, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante, como referencia. Para el análisis del dispositivo y el procedimiento de la invención poniéndolo en funcionamiento manualmente de forma total para extracción y con fines comparativos, se utilizaron columnas filtrantes MOE en lugar de las columnas Qiagen Mini (QM column) contenidas en el kit. Por otra parte, durante el uso de la columna filtrante MOE, se completaron los procedimientos de extracción y lavado con jeringuillas de enclavamiento Luer desechables de plástico conectadas al tapón de enclavamiento Luer en la columna MOE y se pusieron en funcionamiento manualmente, mientras que durante el uso de la columna Qiagen Mini, se transfirieron los líquidos por pipeteado y se favorecieron los procedimientos de extracción-lavado con un colector de distribución de vacío WIAvac 24 Plus (Qiagen, Estados Unidos, CA) conectado a una bomba de vacío eléctrica, según las instrucciones del manual de usuario del kit.

Se añadieron cuatro partes alícuotas de BCS descongelado (2 ml cada una) en tubos de centrifuga de 50 ml (marcados como QM y MOE respectivamente) que contenían tampón de lisis ACL y Proteinasa K y se incubaron a 60 °C durante 30 minutos. Se agregó una cantidad adecuada de tampón de unión ACB con isopropanol a cada tubo según las indicaciones en el manual de instrucciones. El volumen total de la mezcla de lisis fue aproximadamente 8 ml.

Para comparar la recuperación utilizando dos columnas de extracción diferentes, se realizaron adiciones de 2 µl de solución "TB-ADN" (1,5 x 10⁶ copias/µl), con un contenido de 60 pb de ADN de doble cadena corto, en cada uno de los tubos QM y MOE y se marcaron QMTB y MOE-TB, respectivamente. Se preparó la solución "TB-ADN" en un amplicón de PCR del fragmento de gen IS6110 con la cepa del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* h37Rv. Se realizó la adición de los ADNds en los BCS como control de ADN extraño (exógeno para el hospedador). De esta forma, se marcaron 4 tubos como QM, QM+TB, MOE y MOE+TB respectivamente.

Se transfirió la mezcla de ACB-lisado en el tubo QM a un tubo de extensión que conectaba la columna QM con el colector de vacío. Se completaron los procedimientos de extracción y lavado utilizando tampones de lavado ACW1 y ACW2 con contenido en isopropanol por pipeteado y aspiración.

Se extrajo la mezcla de ACB-lisis en el tubo MOE hacia una jeringuilla de enclavamiento Luer de 20 ml con una aguja larga fijada. A continuación, se retiró la aguja y se enroscó la jeringuilla firmemente en el conector de enclavamiento Luer del tapón 101 sobre un tubo de centrifuga de 50 ml (400). Se empujó esta mezcla de lisis en la jeringuilla a través de la matriz de unión en la columna filtrante MOE por presión manual. Se transfirieron también los tampones de lavado ACW1 y ACW2 y se pasaron a través de la columna filtrante MOE utilizando jeringuillas más pequeñas. El volumen de la jeringuilla utilizado en la invención tuvo que ser lo suficientemente grande para que además de la fase líquida que ocupa la jeringuilla, se reservara una fase de aire suficiente para purgar los residuos de líquido restantes en la matriz de filtro y en la columna en la mayor medida de lo posible.

Se eluyeron los fragmentos de cNA absorbidos en ambas columnas en 60 µl de tampón AVE por centrifugación a alta velocidad 15.000 G). Se usaron los eluatos inmediatamente o se mantuvieron congelados.

Se transcribió reversiblemente una porción de los eluatos que contenían ANRm sin células extraído con M-MLV transcriptasa inversa (cat. M170, Promega, WI) y cebadores al azar de ADNc de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se determinó la cuantificación de cfDNA y cf-mRNA por PCR en tiempo real cuantitativa con un kit de mezcla de qPCR SIBO™-SYBR (distribuido en el mercado por Occam Biolabs, DE). Pueden emplearse también para este fin otros kits de qPCR de SYBR disponibles en el mercado como SYBR® Premix DimerEraser™ (Perfect Real Time, Takara-Clontech, CA), Power SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies, CA) e iQ™ SYBR® Green Supermix 2x Real-Time PCR Mix (Bio-Rad, CA). Los pares de cebadores utilizados para el ensayo qPCR se enumeran en la Tabla 1. Dichos cebadores, dirigidos a una secuencia exógena del gen de *M. tuberculosis* IS6110 y una secuencia endógena del gel *B. B.Taurus* mitocondrial Nd2, están diseñados específicamente para amplificar secuencias de ADN cortas. En el ensayo de RT-qPCR, los cebadores directos y los cebadores inverso, dirigidos a secuencias diferentes de genes constitutivos comúnmente utilizados B2M (beta-2-microglobulina), están diseñados para ser complementarios con diferentes exones que cruzan intrones de gran tamaño; por lo tanto, solamente se amplifican y se detectan los ADNc cortos que se transcriben reversiblemente desde ARNm, pero que no se contaminan con ADN genómico.

Tabla 1. Cebadores utilizados en la detección de cNA en suero de becerro bovino

ID cebador PCR		Secuencia (5'-)	Gen	En Exón	Intrón (pb)	Amplicón (pb)
Organismo		<i>B. Taurus</i>				
BB2m11	F	CCTTGGTCCTTCTCGGGCTG (SEQ ID NO: 1)	B2m	1	5735	98
	R	TTCCATCTTCTGGTGGGTGTC (SEQ ID NO: 2)		2		
BB2m22	F	CTTCGTGGCCTTGGTCCTTC (SEO ID NO: 3)	B2m	1	5735	100
	R	TTCTGGTGGGTGTCTTGAGT (SEQ ID NO: 4)		2		
BB2m33	F	CTTCGTGGCCTTGGTCCTTCTC (SEQ ID NO: 5)	B2m	1	5735	143
	R	GATGGAACCCATACACATAGCA (SEQ ID NO: 6)		2		
BB2m44	F	CGAGTGAAACACGTTACTTTGGA (SEQ ID NO: 7)	B2m	2	522	71
	R	GATGGTGCTGCTTACAGGTCTC (SEQ ID NO: 8)		3		
BNd211	F	TCCAGAAGTAACACAGGGCA (SEQ ID NO: 9)	Nad2	mt DNA	NA	48
	R	GTAGGATAAGGCCTGAGGATAG (SEQ ID NO: 10)				
Organismo		<i>M. tuberculosis</i>				
IS611065	F	GGTCAGCACGATTTCGGAG (SEQ ID NO: 11)	IS6110		NA	60
	R	GCCAACACCAAGTAGACGG (SEQ ID NO: 12)				

Tabla 2. Resumen de resultados de PCR cuantitativa para cfDNA y cfRNA

ID cebador	Especie cfNA	Amplicón (pb)	Temp. fusión (°C)	(Tf	Ct			
					QM	MOE	M+TB	MOE+TB
BB2m11	ARNm	98	84,1		28,58	28,13	28,95	27,79
BB2m22	ARNm	100	85,1		28,06	27,93	27,51	27,68
BB2m33	ARNm	143	84,8		28,61	27,63	27,97	28,21
BB2m44	ARNm	71	80,0		24,43	24,80	25,05	24,17
BNd211	ADN	48	77,6		27,16	28,09	27,77	28,56
IS611065	ADN*	60	83,2		ND	ND	22,08	22,26

*ADN con adición exógeno

ND: No detectable

5 Los resultados muestran que cuando se utilizan los mismos tampones, es decir, ACL, ACB, ACW1, ACW2 y AVE del kit de NA circulante QIAamp, tanto la columna filtrante MOE en la que se utilizan procedimientos de operación con jeringuilla manual de acuerdo con una realización de la presente invención, como la columna Qiagen Mini con un proceso en el que se utiliza una bomba de vacío, tienen una eficiencia de extracción de cfDNA y cfRNA comparable. Los resultados también presentan la posibilidad de utilizar fragmentos de ARN en la circulación periférica como un patrón de referencia endógeno y control de calidad para una muestra biológica.

Ejemplo 3

10 En este ejemplo, solamente se utilizó la columna filtrante MOE con los siguientes tampones y protocolo:

Tampones:

Tampón de lisis (LB): con contenido de tiocianato de guanidina (GITC), 4 M, Triton X-100 8 %, Qiagen Proteínasa K (cat. 19131, Qiagen, CA), 100 µl/ml LB.

15 Tampón de unión (BB): con contenido de 3 M GITC, 40 % isopropanol (IPA, concentración final), mezclado a fondo.

Tampón de lavado (WB): con contenido de 10 mM Tris, 2 mM EDTA, 10 mM NaCl, 70 % etanol, pH 7,0.

Tapón de elución: Tampón Qiagen AVE (incluido en kit de ácido nucleico circulante QIAamp).

Protocolo:

20 1. Lisis: extraer 2 ml de BCS descongelado con una jeringuilla de 10 ml con una aguja larga, en un tubo de centrifuga de plástico de 50 ml que contiene 2 ml de LB, mezclar a fondo con vórtice, incubar en un bloque de calentamiento a 60 °C durante 30 minutos. Enfriar hasta la temperatura ambiente.

2. Unión: extraer 10 ml de BB al tubo de lisado de la muestra, mezclar con vórtice, mantener a temperatura ambiente durante 10 minutos.

25 3. Unión y extracción: extraer todo el contenido en un tubo de lisado de 50 ml en una jeringuilla de enclavamiento Luer de 20-30 ml con una aguja larga, continuar hasta extraer aproximadamente 5 ml de aire en la jeringuilla, roscar la jeringuilla de enclavamiento Luer en el conector de enclavamiento Luer en el tampón del dispositivo MOE ensamblado 400, que se asienta en la rejilla firmemente. Presionar el émbolo de la jeringuilla hacia abajo hasta que todo el líquido y el aire en la jeringuilla pasa a través de la columna filtrante. Recoger el residuo en un tubo de 50 ml del dispositivo MOE. Este procedimiento puede tardar 1-2 minutos. Desenroscar la jeringuilla de 20 ml.

4. Extraer 4 ml de WB a una jeringuilla de enclavamiento Luer de 10 ml, presionar el émbolo para dejar que pase WB a través de la columna. Desenroscar la jeringuilla de 10 ml.

5. Extraer 4 ml de etanol al 100 % en una jeringuilla de 10 ml, presionar el émbolo para permitir que el etanol pase a través de la columna.

35 6. Desenroscar el tapón del dispositivo MOE y desprender la columna filtrante del tapón. Insertar la columna en un tubo de micro-centrifuga sin ADNsa, ARNsa de 1,5-2 ml, secar con aire el residuo de etanol en la columna completamente.

40 7. Agregar 100 µl de tampón AVE de elución directamente en la matriz de absorción en la columna filtrante, enroscar un tapón en la columna filtrante para evitar la contaminación durante el manejo. Esperar 10-30 minutos para rehidratar y liberar el NA unido de la matriz de absorción.

8. Centrifugar el micro tubo con la columna insertada en su interior a 15.000-20.000 G durante 3 minutos. Recoger el eluato de las aplicaciones aguas abajo o almacenar a entre -20 y -80 °C.

5 En este experimento, se añadieron 2 ml de LB en 6 tubos de centrifuga de 50 ml y seguido de 2 ml de BCS. Por otra parte, se realizó la adición de 2 µl de solución "TB-ADN" diluida 10 veces ($1,5 \times 10^5$ copias/µl) en cada uno de los tubos de lisis. Se llevó a cabo el siguiente procedimiento, de acuerdo con el protocolo anterior hasta la etapa 6.

Después de la etapa 6, se dividieron las 6 columnas MOE en 3 grupos de duplicados idénticos (A y B) y se marcaron como MOE-0 sem, MOE-2 sem y MOE-4 sem, para cada grupo, lo cual indicó tratamiento adicional durante cero semanas, 2 semanas y 4 semanas, respectivamente.

10 El tratamiento posterior fue el siguiente: el grupo marcado MOE-0 sem fue sometido inmediatamente a la etapa 7 del procedimiento anterior; los grupos marcados MOE-2 sem y MOE-4 sem se guardaron en tubos de centrifuga de 50 ml nuevos, con un paquete de desecante de gel de sílice, paquetes absorbentes Minipax® (cat. Z163554, 0,5g/paquete, Sigma-Aldrich, MO). Se cerraron los tubos de 50 ml firmemente y se envolvieron con piezas de Parafilm (VWR, PA) para asegurar un sellado completo. Se expusieron los tubos sellados con la columna filtrante dentro a temperatura ambiente durante 2 semanas (MOE-2 sem.) y 4 semanas (MOE-4 sem.), respectivamente. Al final de la exposición, se abrieron los dos grupos y se procesaron las columnas filtrantes a través de la etapa 7 del procedimiento indicado.

Tras la etapa 8, se analizó cada uno de los eluatos por qPCR y RT-qPCR, tal como se demuestra en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

20 Al comparar los valores Ct de las muestras eluidas de las columnas inmediatamente con las muestras eluidas después de la exposición a temperatura ambiente durante 2 semanas y 4 semanas, se observó sorprendentemente que en todas las diferentes especies de fragmentos cfNA examinados por qPCR y RT-qPCR, la cantidad y por tanto la integridad (amplificable) fueron prácticamente idénticas. En contraposición, cuando se expusieron las columnas filtrantes tras la etapa 7 a humedad normal y temperatura ambiente durante unos días, se degradó el cfNA absorbido, en particular especies ARN, y no pudo ampliarse (no se muestran los datos).

25 El sorprendente descubrimiento significa que tras la extracción, el cfNA absorbido, en particular, cfRNA vulnerable sobre la matriz de filtro, puede estabilizarse y conservarse perfectamente a temperatura ambiente. Un gran volumen de etanol (4 ml en este caso), lavando con descarga de la matriz de absorción porosa y, además, el mantenimiento del NA absorbido en estado deshidratado en un entorno cerrado con desecante protege de manera eficaz el ARN de la degradación. El tratamiento sencillo y económico del NA absorbido proporciona una cómoda manera de manejar, almacenar y transportar muestras biológicas.

30

Tabla 3

ID cebador	Especie cfNA	Amplicón (pb)	Temp. fusión (Tf °C)	Grupo muestra	Ct		
					Temperatura ambiente durante		
					0 sem	2 sem	4 sem
BB2m11	ARNm	98	84,1	A	25.23	25.38	26.24
				B	25.51	26.61	25.75
BB2m22	ARNm	100	85,1	A	26.56	25.32	26.68
				B	26.39	27.2	25.89
BB2m33	ARNm	143	84,8	A	28.15	27.49	27.84
				B	27.22	27.83	27.81
BB2m44	ARNm	71	80,0	A	24.21	26.01	25.70
				B	24.26	26.26	24.96
BNd211	ADN	48	77,6	A	27.08	27.34	26.27
				B	27.24	27.87	27.09
IS611065	ADN*	60	83,2	A	26.78	26.24	26.47
				B	26.26	25.82	26.32

Ejemplo 4: Detección de secuencia nucleicos específica de patógena en sangre periférica humana

35 Se extrajo la sangre periférica humana reciente de dos personas adultas (uno de control de salud y otro con sospecha de infección de tuberculosis latente, HC y LTBI, respectivamente). El sujeto con LTBI se define como positivo según la prueba cutánea PPD, vive en un país con baja carga de TB durante 25 años, pero tiene una historia de contacto con TB en un país de alta carga de TB durante los últimos dos años. Durante los dos últimos años, se le han hecho pruebas a esta persona de examen de rayos X CT tres veces, prueba de frotis de esputo cuatro veces y cultivo TB tres veces. Todas estas pruebas han resultado negativas, pero la prueba cutánea de

tuberculina (PPD) pasó de negativo a positivo (1,8 cm). Esta persona no presentaba síntomas relacionados con la tuberculosis. Un profesional médico definió presuntamente a esta persona como LTBI. Se sabe perfectamente que existen barreras importantes en el diagnóstico de LTBI; en particular, no existe modo de obtener una evidencia directa en cuanto a la infección bacteriana en el organismo utilizando la tecnología actual. Para este caso no se ha utilizado ninguna otra prueba adicional para el diagnóstico de LTBI.

Se separó el plasma de la sangre completa por centrifugación (2000 g, 10 minutos). Se extrajeron cNA siguiendo el mismo procedimiento que se ha demostrado en el Ejemplo 3. Se detectaron los fragmentos cNA endógenos humanos en plasma y se cuantificaron por qPCR y RT-qPCR, a través de tres pares de cebadores de genes constitutivos comúnmente utilizados, B2M (beta-2- microglobulina) y PPIA (peptidil propil isomerasa A o ciclofilina A) y ND4 (subunidad 4 dehidrogenasa NADH, en ADN mitocondrial) así como TB IS6110-65, para la detección de fragmentos de ADN específicos de TB en sangre periférica de una persona supuestamente LTBI. Los cebadores utilizados en el Ejemplo 4 se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

ID cebador PCR		Secuencia (5'-)	Gen	En Exón	Intrón (pb)	Amplicón (pb)
HB2M11	F	CGCGCTACTCTCTCTTTCTGG (SEQ ID NO: 13)	B2M	1	3809	146
	R	AGTCAACTTCAATGTCGGATGG (SEQ ID NO: 14)		2		
HPPIA11	F	CCAACACAAATGGTTCCCAG (SEQ ID NO: 15)	PPIA	4	1412	180
	R	CGAGTTGTCCACAGTCAGCA (SEQ ID NO: 16)		5		
HND411	F	GCCTACGACAAACAGACCTAAA (SEQ ID NO: 17)	ND4	ADN mt	NA	45
	R	TTGAAGAGTATGCAATGAGCGA (SEQ ID NO: 18)				
IS611065	F	GGTCAGCACGATTCCGGAG (SEQ ID NO: 11)	IS6110		NA	60
	R	GCCAACACCAAGTAGACGG (SEQ ID NO: 12)				

Los resultados se muestran en la Tabla 5 y en la Fig. 8.

Tabla 5

ID cebador	Especie cfNA	Amplicón (pb)	Temp. fusión (Tf °C)	Ct		Ref. FIG
				HC*	LTBI**	
HB2M11	ARNm humano	146	81,9	22,90	23,29	FIG, 8 B2M
HPPIA11	ARNm humano	180	84,0	28,29	28,61	FIG, 8 PPIA
HND411	ADNmt humano	45	75,5	20,99	22,32	No se muestra
IS611065	ADN TB	60	82,6	ND	31,47	FIG, 8 IS6110

HC*: Control de salud

LTBI**: Infección TB latente

ND: No detectable

Si bien se ha ilustrado y descrito la invención en el presente documento haciendo referencia a realizaciones específicas, no se pretende que la invención quede limitada a los detalles presentados. Por el contrario, es posible introducir diversas modificaciones en los detalles dentro del ámbito de las reivindicaciones sin alejarse de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Qian, Mingwei

<120> SISTEMA Y PROCEDIMIENTO PARA RECOGER UNA MUESTRA DE ÁCIDO NUCLEICO

<130> OCC-104WO

<150> US 61/827.244

<151> 24-05-2013

<160> 18

<170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 10 <400> 1
 ccttggtcct tctcgggctg 20
 <210> 2
 15 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Cebador
 <400> 2
 ttccatcttc tggagggtg c 21
 25 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Cebador
 <400> 3
 35 cttcgtggcc ttggtccttc 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Cebador
 <400> 4
 45 ttctggtggg tgtcttgagt 20
 <210> 5
 <211> 22
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 55 <400> 5
 cttcgtggcc ttggtccttc tc 22
 <210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 65 <400> 6

ES 2 716 114 T3

	gatggaacc atacacatag ca	22
5	<210> 7 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador	
	<400> 7 cgagtgaaac acgttacttt gga	23
15	<210> 8 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador	
25	<400> 8 gatggtgctg cttacaggtc tc	22
30	<210> 9 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador	
	<400> 9 tcccagaagt aacacagggc a	21
40	<210> 10 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador	
	<400> 10 gtaggataag gcctgaggat ag	22
50	<210> 11 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador	
	<400> 11 ggtcagcacg attcggag	18
60	<210> 12 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Cebador	
	<400> 12	

ES 2 716 114 T3

	gccaacacca agtagacgg	19
5	<210> 13 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador	
	<400> 13 cgcgctactc tctcttctg g	21
15	<210> 14 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador	
25	<400> 14 agtcaacttc aatgtcggat gg	22
30	<210> 15 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador	
	<400> 15 ccaacacaaa tggttcccag	20
40	<210> 16 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador	
	<400> 16 cgagttgtcc acagtcagca	20
50	<210> 17 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador	
	<400> 17 gcctacgaca aacagaccta aa	22
60	<210> 18 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Cebador	
	<400> 18	

ttgaagagta tgcaatgagc ga

22

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de recogida de una muestra de ácido nucleico, comprendiendo el sistema:
- un receptáculo que define un volumen interno;
 - un tapón desmontable para el receptáculo, teniendo el tapón un lado interno enfrentado al volumen interno del receptáculo y un lado externo en el lado opuesto del volumen interno, comprendiendo el tapón un puerto de ventilación que comunica el lado interno con el lado externo y un puerto de conexión de muestra que comunica el lado interno con el lado externo, comprendiendo el puerto de conexión de muestra un primer componente de enclavamiento para enclavar de forma desmontable el puerto de conexión de muestra en un segundo componente de enclavamiento de cooperación, comprendiendo el lado interno del tapón una interfaz de conexión en comunicación fluida con el puerto de conexión de muestra;
 - una columna filtrante adaptada para fijarse de forma desmontable a la interfaz de conexión del tapón de receptáculo, teniendo la columna filtrante un primer extremo abierto, un segundo extremo abierto y un conducto interno entre ambos que contiene un sustrato para recoger el ácido nucleico;
 - un recipiente de recogida de muestra que comprende el segundo componente de enclavamiento adaptado para conectarse con el primer componente de enclavamiento del puerto de conexión de muestra en el tapón de receptáculo;
 - un recipiente de transporte que tiene un extremo abierto y que define un volumen adaptado para contener la columna filtrante, el recipiente de transporte adaptado para enganchar de modo desmontable la columna filtrante para desprenderla de la interfaz de conexión del tapón de receptáculo, comprendiendo además el recipiente de transporte un desecante y una tapa desmontable para sellar temporalmente la columna filtrante dentro del recipiente de transporte.
2. El sistema de recogida de la reivindicación 1, en el que el sustrato de columna filtrante comprende un filtro, una frita aguas abajo del filtro y un anillo de retención aguas abajo del filtro.
3. El sistema de recogida de la reivindicación 2, en el que el primer componente de enclavamiento puerto de conexión de muestra comprende un extremo de una conexión de enclavamiento Luer.
4. El sistema de recogida de la reivindicación 1 que comprende además una cámara de vacío, teniendo la cámara de vacío una porción interna adaptada para su conexión con una fuente de vacío, una porción externa que tiene uno o más pocillos, adaptado cada pocillo para recibir uno de los receptáculos y uno o más puertos de conexión de vacío en comunicación con la porción interna de la cámara y adaptada para conectarse con el puerto de ventilación del receptáculo a través de un conducto flexible.
5. El sistema de recogida de la reivindicación 1, en el que la columna filtrante comprende un primer componente de una interfaz roscada y el tapón de receptáculo comprende un segundo componente de la interfaz roscada.
6. El sistema de recogida de la reivindicación 5 en el que la columna filtrante comprende además un primer elemento dispuesto sobre una superficie externa del mismo adaptada para engancharse de forma desmontable a un segundo elemento de cooperación dispuesto en una superficie interna del recipiente de transporte, estando el segundo elemento adaptado para transmitir fuerza al primer elemento cuando se aplica una fuerza de torsión en la columna filtrante en una dirección para desenroscar la columna filtrante de su conexión roscada con el tapón de receptáculo.
7. El sistema de recogida de la reivindicación 1, que comprende además un puerto de tres vías que tiene un primer puerto adaptado para quedar dispuesto para el puerto de conexión de muestra del tapón del receptáculo, un segundo puerto adaptado para conectarse con el recipiente de recogida y un tercer puerto adaptado para conectarse a una fuente de fluido que contiene un fluido para tratar la muestra tras su recogida.
8. El sistema de recogida de la reivindicación 7, en el que el recipiente de recogida comprende una jeringuilla y el puerto de tres vías comprende una válvula de retención adaptada para permitir exclusivamente el flujo desde el recipiente de recogida al receptáculo cuando existe una presión relativa positiva entre el recipiente de recogida de muestra y el receptáculo y para permitir exclusivamente el flujo desde la fuente de fluido hasta el recipiente de recogida cuando existe una presión relativa negativa entre el recipiente de recogida de muestra y la fuente de fluido.
9. El sistema de recogida de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 8, que comprende un soporte de muestra para recibir una pluralidad de columnas filtrantes y adaptado para ajustar una centrífuga para centrifugar una pluralidad de columnas filtrantes.
10. Un procedimiento de recogida de una muestra de ácido nucleico, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- (a) proporcionar el sistema de recogida de la reivindicación 1;
 - (b) recoger un volumen de fluido que contiene la muestra en el recipiente de recogida de muestra;
 - (c) conectar el recipiente de recogida de muestra con el receptáculo a través del puerto de conexión de muestra;
 - (d) pasar el volumen de fluido que contiene la muestra desde el recipiente de recogida de muestra a través de la columna filtrante, recogiendo así la muestra sobre el sustrato y recogiendo un resto en el receptáculo;

- (e) colocar el extremo abierto del recipiente de transporte sobre la columna filtrante, enganchar la columna filtrante con el recipiente de transporte y desprender la columna filtrante desde el tapón de receptáculo;
- (f) sellar temporalmente el recipiente de transporte con la tapa desmontable.

- 5 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el fluido que contiene muestra comprende un lisado que comprende un extracto de fluido del cuerpo recogido de un paciente.
12. El procedimiento de la reivindicación 10 o 11, en el que el recipiente de recogida de muestra comprende una jeringuilla y el procedimiento de pasar el volumen a través de la columna filtrante comprende aplicar presión manualmente en un émbolo de la jeringuilla.
- 10 13. El procedimiento de las reivindicaciones 10 - 12, en el que el recipiente de recogida de muestra comprende una jeringuilla y el procedimiento de pasar el volumen a través de la columna filtrante comprende fijar el puerto de ventilación del tapón de receptáculo a una fuente de vacío y aplicar después una presión negativa a través de la columna filtrante utilizando la fuente de vacío.
- 15 14. El procedimiento de las reivindicaciones 10 - 13, que comprende además lavar y deshidratar la muestra recogida sobre el sustrato después de la etapa (d) pasando uno o más volúmenes de fluido de lavado y deshidratación a través de la columna filtrante antes de realizar la etapa (e).
15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que el fluido de lavado y deshidratación comprende etanol al 100 % o acetona al 100 %, y el procedimiento comprende además colocar un desecante en el recipiente de transporte y transportar el recipiente de transporte en condiciones ambiente, sin climatización.

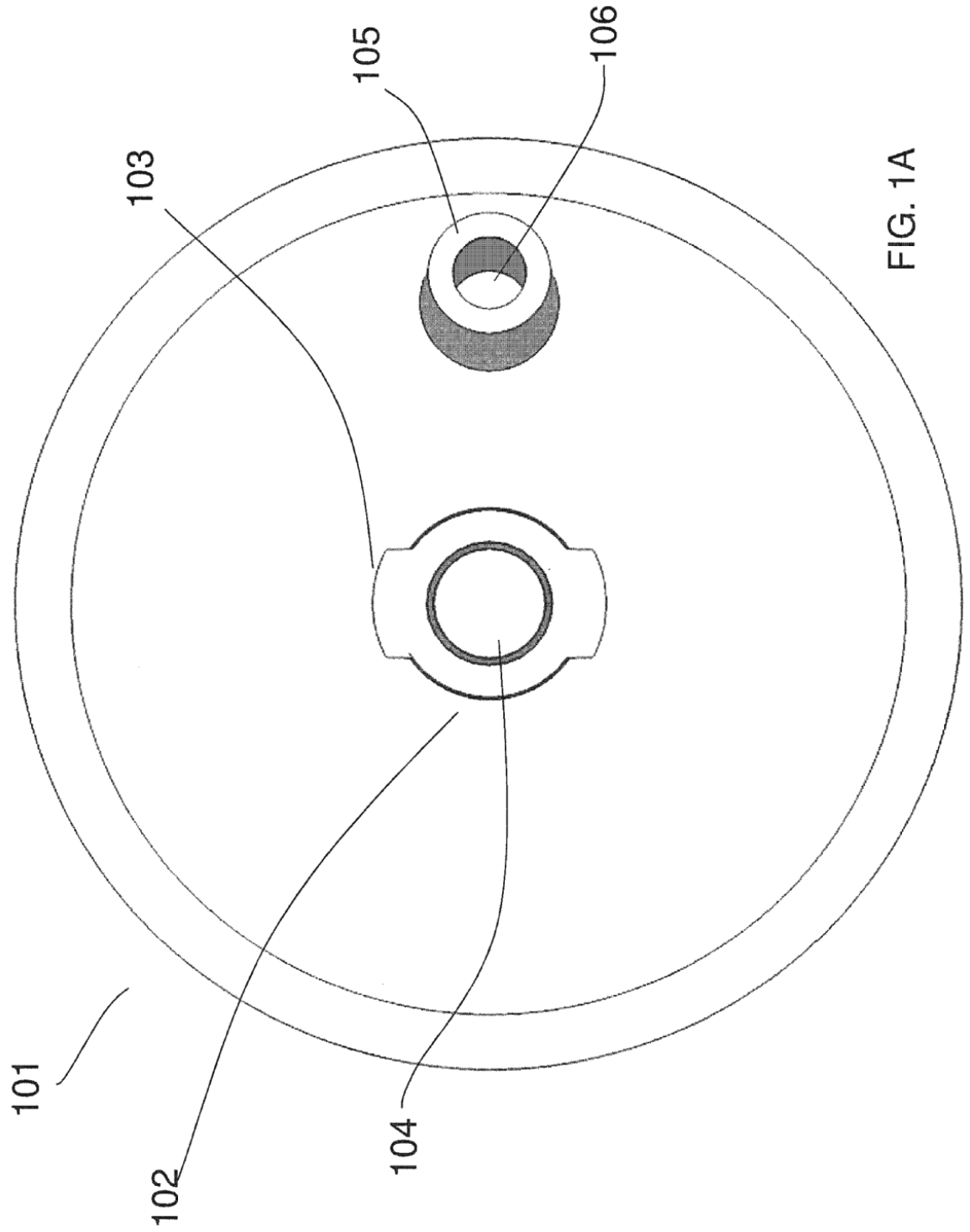


FIG. 1A

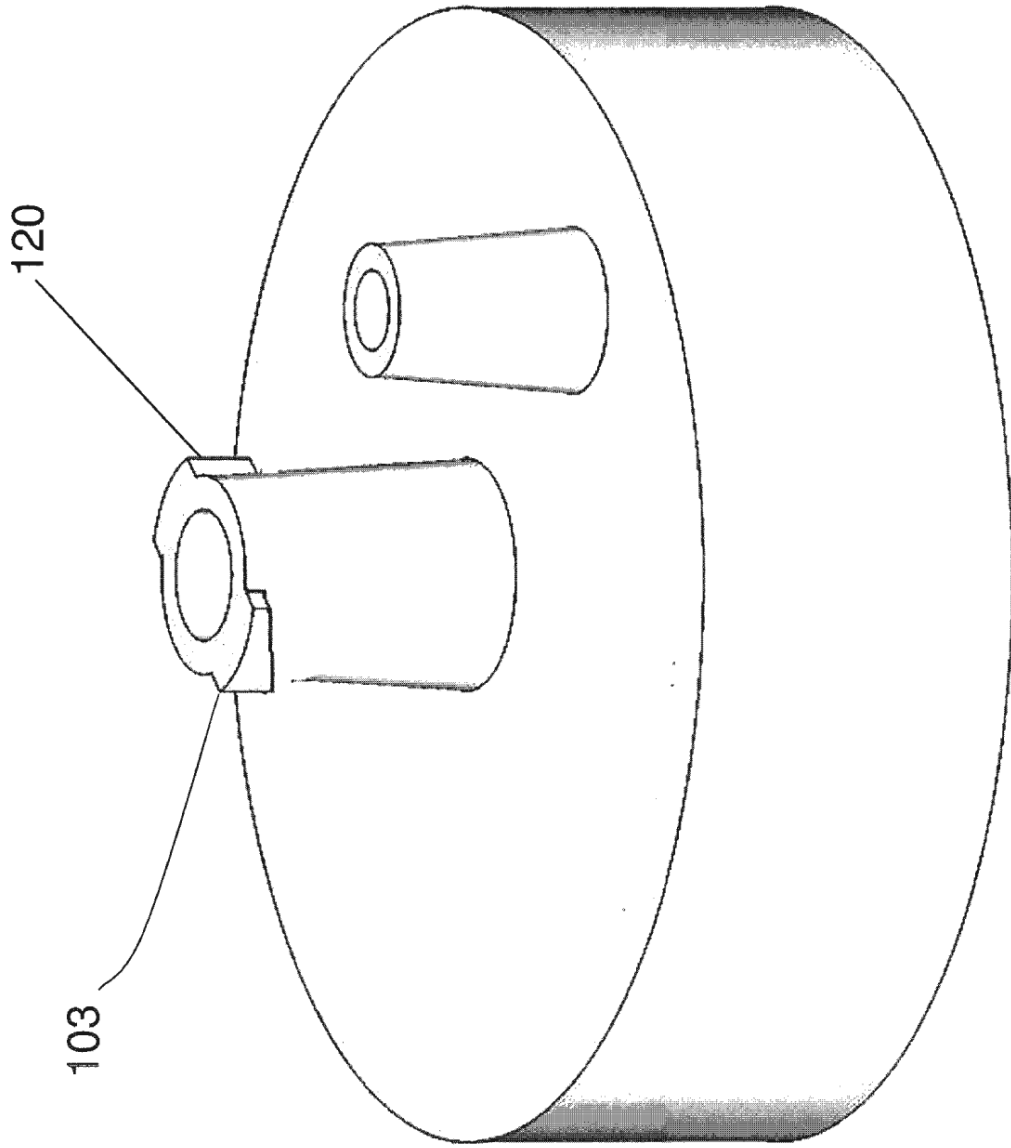


FIG. 1B

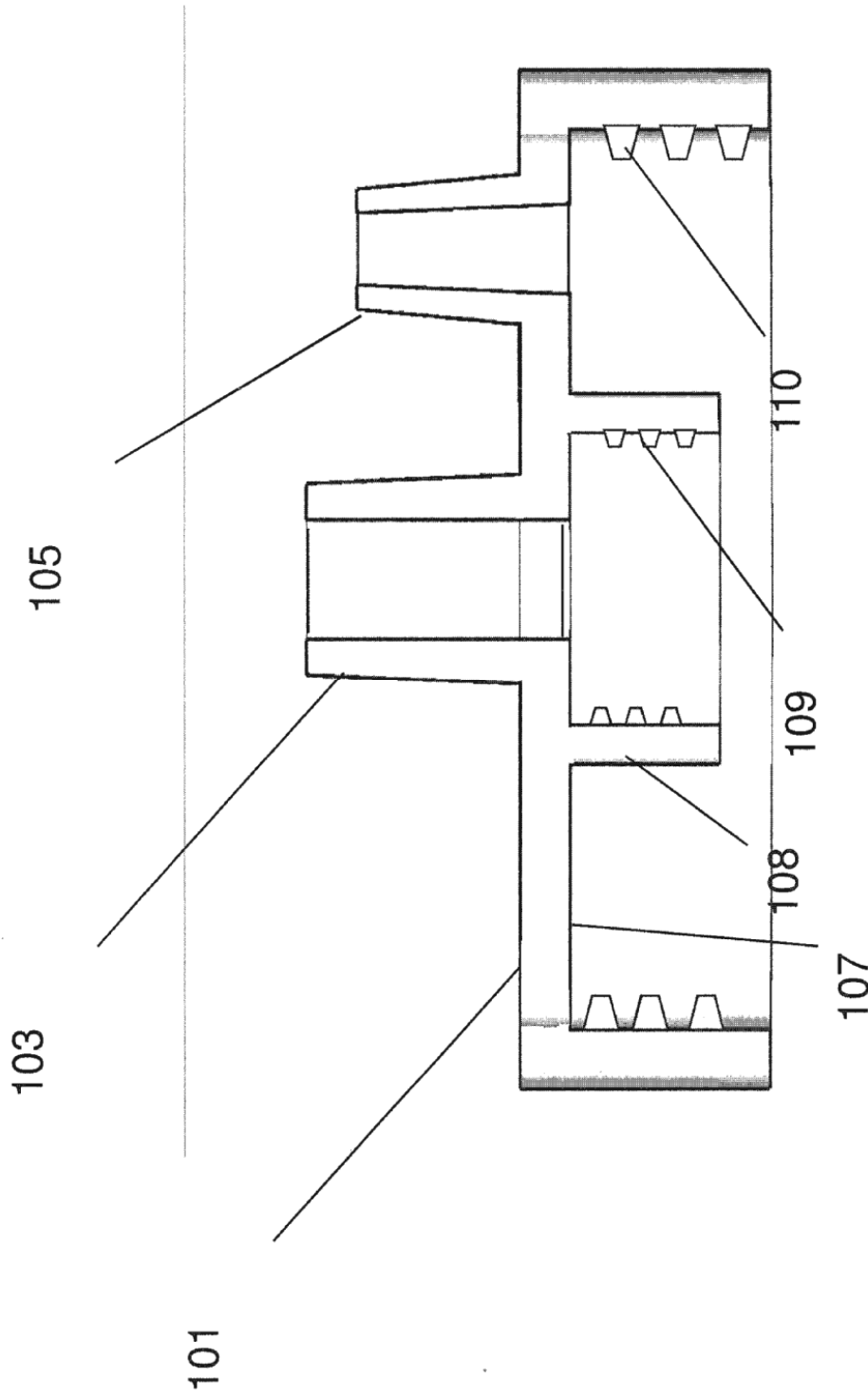
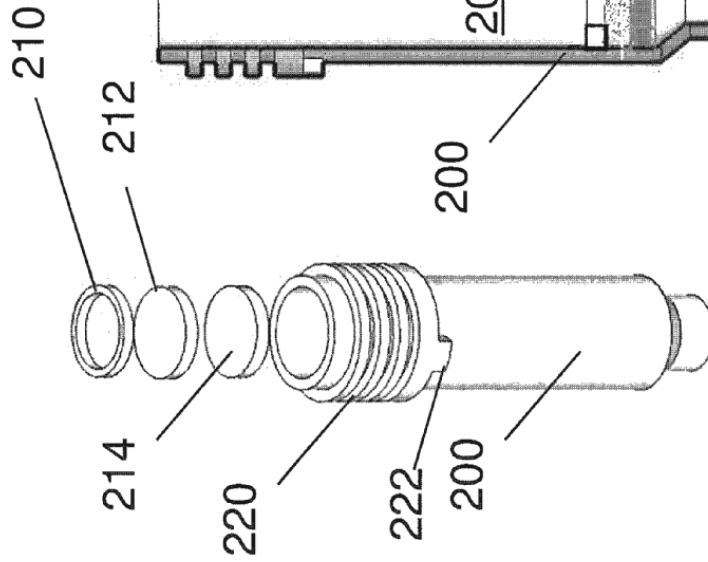
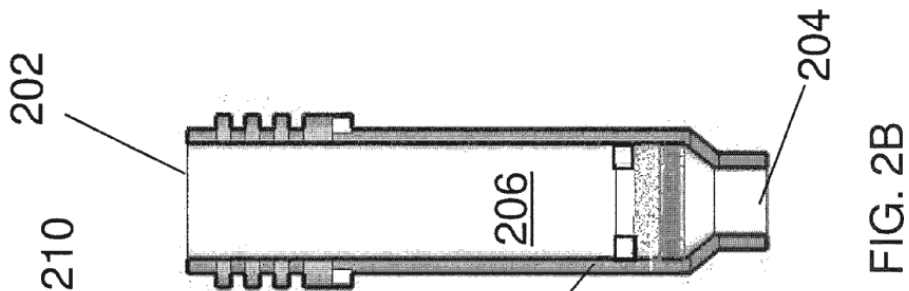
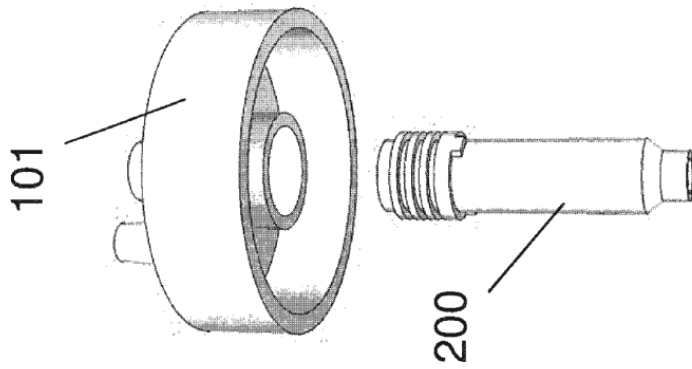
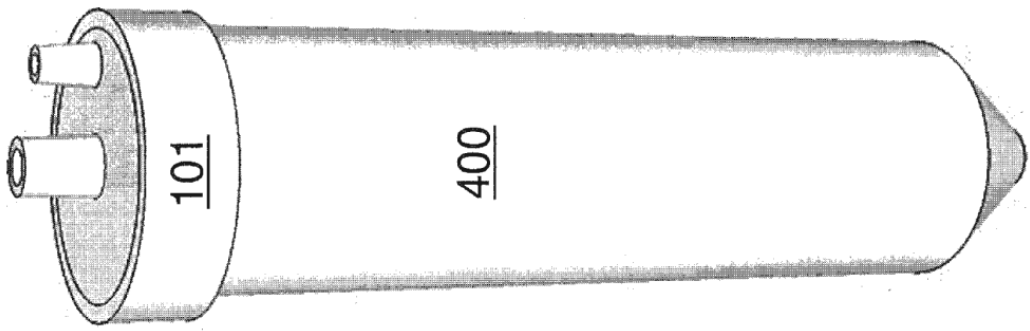


FIG.1C



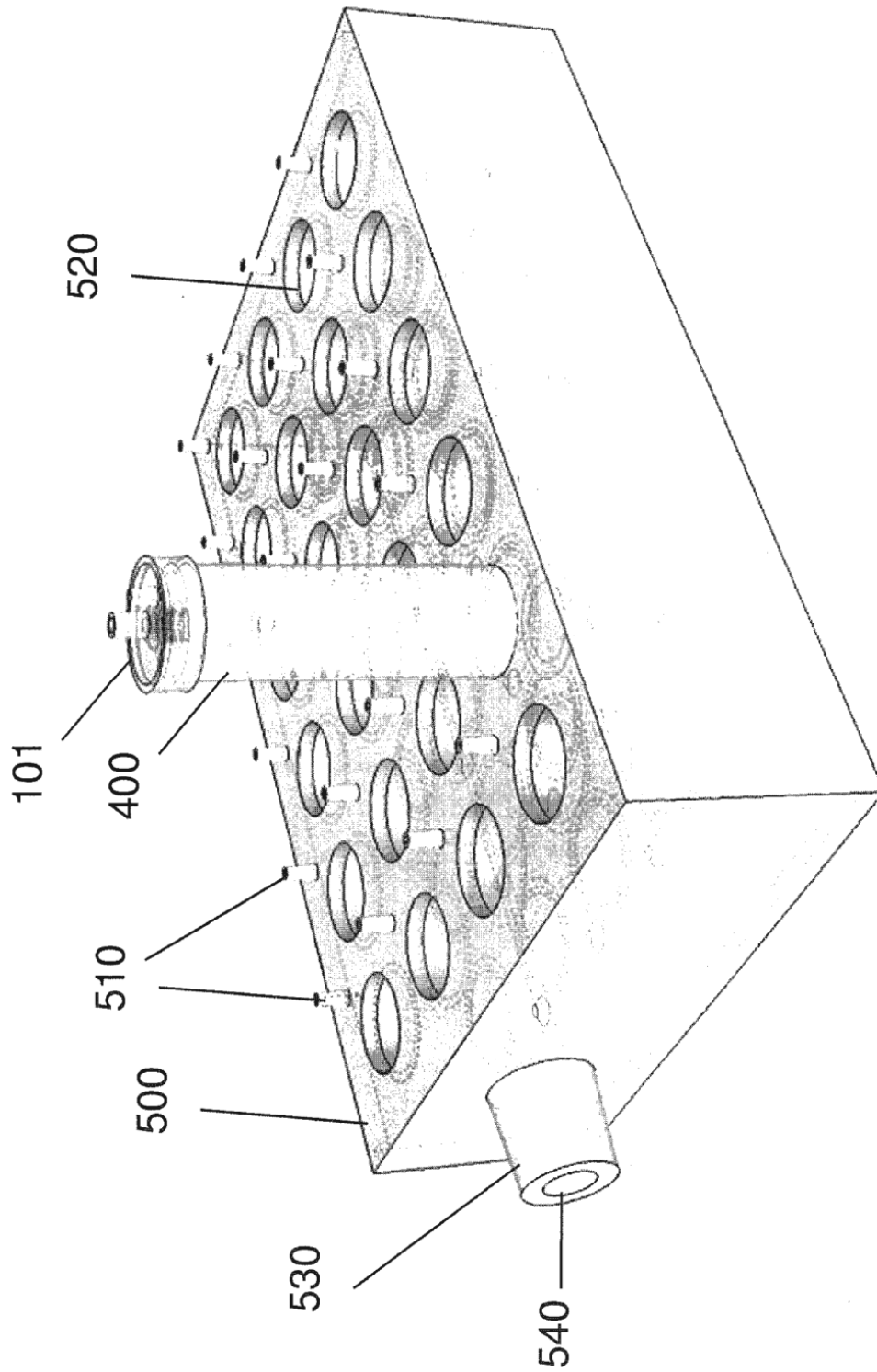
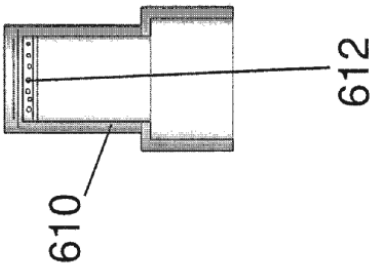
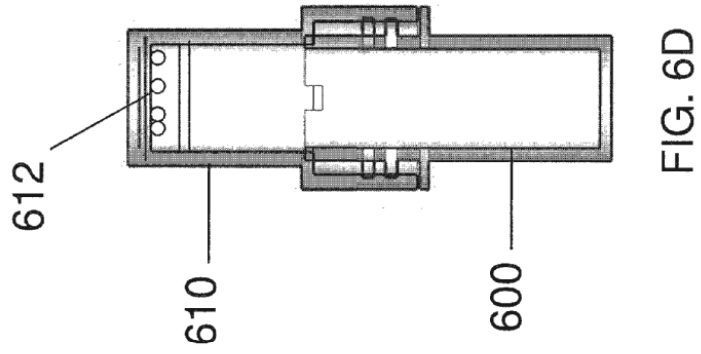
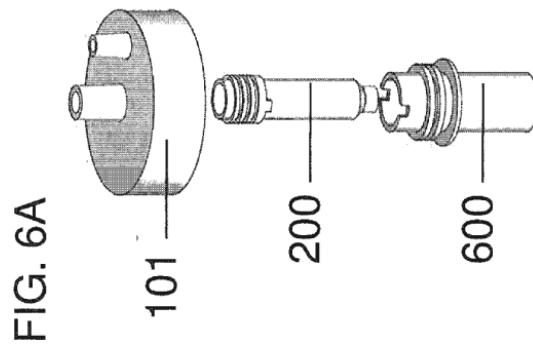
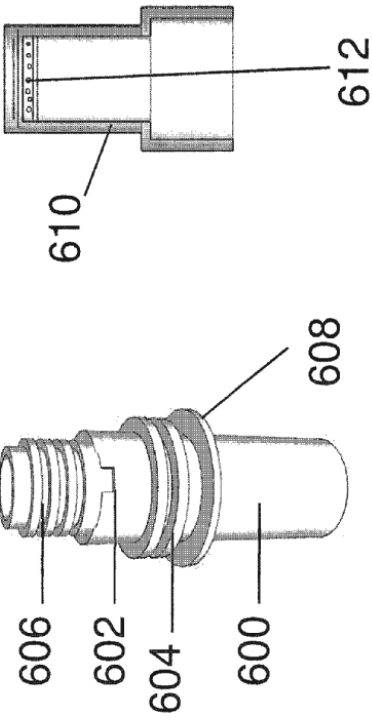
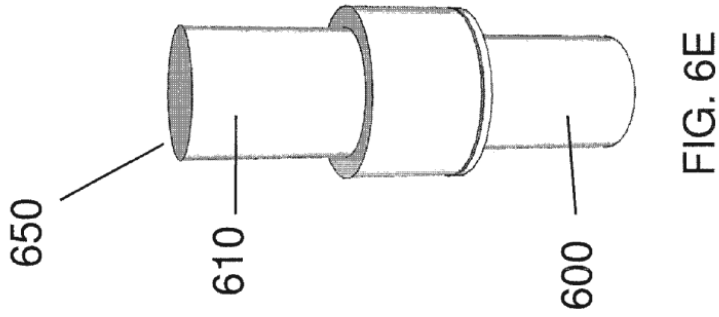


FIG. 5



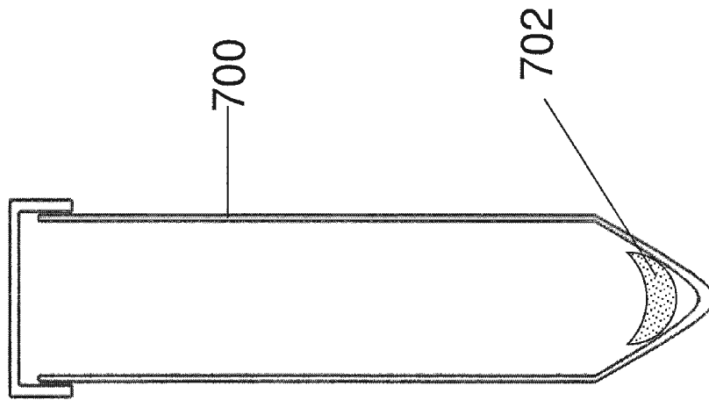


FIG. 7B

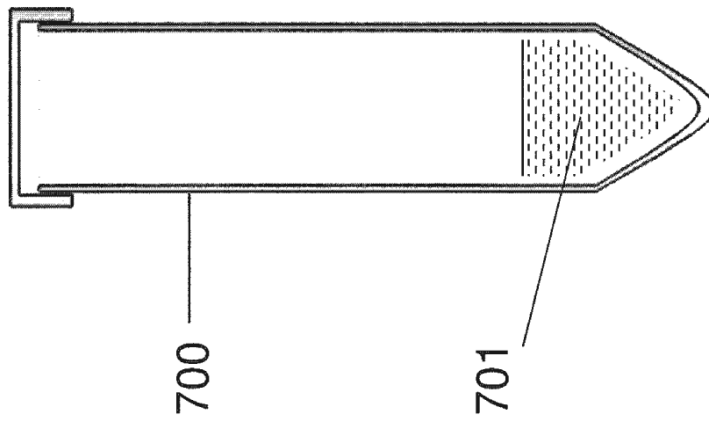


FIG. 7A

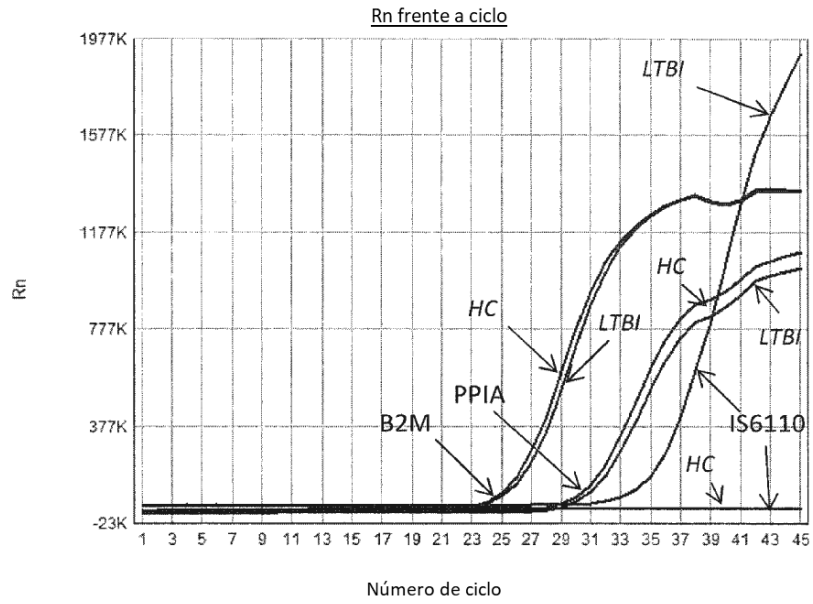


FIG. 8A

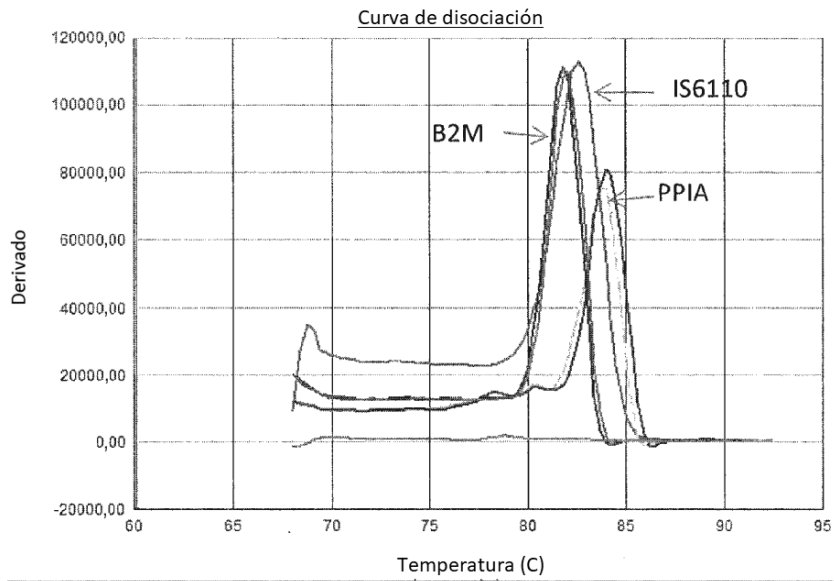


FIG. 8B