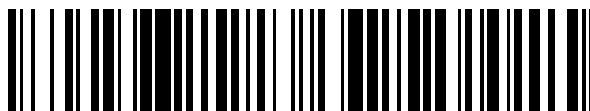


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 654**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/24 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2011 E 17165677 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 3257948**

54 Título: **Procedimiento para vincular resultados de pruebas diagnósticas rápidas de punto de atención con procedimientos basados en laboratorio**

30 Prioridad:

20.07.2010 US 366076 P

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

20.05.2020

73 Titular/es:

**BECTON DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
One Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417 , US**

72 Inventor/es:

**CARRINO, JOHN, J. y
FAN, JAMES**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 761 654 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

Procedimiento para vincular resultados de pruebas diagnósticas rápidas de punto de atención con procedimientos basados en laboratorio.

Antecedentes de la invención

La vinculación entre pruebas rápidas en puntos de atención ("point of care") (POC) y pruebas basadas en laboratorio se ha abordado típicamente mediante la conservación de muestras para soportar procedimientos de pruebas en laboratorio basadas en cultivos. Actualmente, las muestras recogidas en el sitio POC se procesan y se utilizan directamente en una prueba rápida (descartándose la parte de la muestra procesada no utilizada en la prueba rápida), o se diluyen en medios de transporte líquidos para habilitar la transferencia para pruebas basadas en laboratorio tales como inmunoensayo rápido, cultivo y/o una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los especímenes que generan resultados negativos a partir de una prueba de POC se someten frecuentemente a pruebas de reflexión— el resultado negativo se confirma por procedimientos de pruebas basados en laboratorio tales como PCR. Además, los especímenes que generan resultados de pruebas de POC positivos se someten frecuentemente a pruebas para caracterizaciones adicionales tales como subtipado u otra información epidemiológica.

Haciendo referencia a la figura 1, en lugares POC de consultas médicas (y otros lugares diferentes a los laboratorios en los que se ven pacientes o se recogen muestras para pruebas rápidas), se utilizan casi exclusivamente especímenes de hisopo 100 para suministrar la muestra en solución 110 para la prueba rápida 120. El procesamiento y el análisis de la muestra en el consultorio médico y otros sitios de recogida de muestras diferentes a los laboratorios no contemplan unos medios para habilitar las pruebas basadas en laboratorio tales como pruebas de confirmación y/o reflexión u otras pruebas que requieren análisis basados en laboratorio. Con los procedimientos actuales, un médico (u otro administrador de una prueba rápida POC) no puede realizar una prueba rápida POC ni una prueba basada en laboratorio utilizando la muestra recogida en el sitio (por ejemplo, el consultorio médico). Por tanto, se pierde una oportunidad de realizar pruebas basadas en laboratorio sobre tales muestras. Las muestras de hisopo 130 recogidas en lugares POC dentro de un hospital o clínica se ubican casi exclusivamente dentro de un volumen de medios de transporte líquidos 140 para transferir al laboratorio de análisis para pruebas remotas. Las muestras diluidas 150 pueden procesarse además añadiéndolas a una solución 160 para una prueba rápida 170. Sin embargo, este procedimiento da como resultado frecuentemente una muestra POC diluida de 5 a 10 veces o más, lo que puede disminuir las prestaciones de la prueba rápida debido a los efectos de dilución de la muestra.

La recogida y transporte de un segundo hisopo en el sitio POC podrían utilizarse para abordar la necesidad de realizar pruebas basadas en laboratorio, aunque esto obviamente no es el estándar de la práctica y duplica el número de muestras que deben tomarse. Además, aunque se recogen del mismo paciente, las variaciones en los procedimientos de recogida, la carga de organismos, etc., podría llevar a resultados erróneos cuando se comparan los resultados de la prueba entre dos especímenes de hisopo independientemente recogidos. En consecuencia, se desea un sistema y un procedimiento que aborde estos problemas.

El documento Booth, S. *et al.*, "Comparison of two rapid influenza A/B test kits with reference methods showing high specificity and sensitivity for influenza A infection," J. MED. VIR., Vol. 78, No. 5, págs. 619-622 (1 de enero de 2006) describe pruebas en puntos de atención para detectar gripe y los resultados comparados con los de la inmunofluorescencia de cultivo (IFA) y PCR.

El documento FOO, H., *ET AL*: "Laboratory test performance in young adults during influenza outbreaks at World Youth Day 2008", J. CLIN. VIR., Vol. 46, No. 4, págs. 384-386 (1 de diciembre 2009) (Elsevier, Amsterdam, NL) comparó las prestaciones de las pruebas en punto de atención (POC) para la gripe con ensayos de inmunofluorescencia (IFA) y con pruebas de ácido nucleico.

La publicación de patente US nº 2009/306230A1 de Semikhodskii *et al.* (10 de diciembre de 2009) describe la obtención de una muestra en una primera ubicación y la inmovilización de tal muestra en un sustrato y el transporte de la muestra inmovilizada a una segunda ubicación para la prueba.

El documento USAID: "AVIAN INFLUENZA COMMODITIES TRAINING GUIDE", 1 de marzo de 2007 describe kits de prueba para la detección de gripe.

El documento WO 2008/096225 A2 de NATAHNIEL, ANDREW HOMER (14 de agosto de 2008) describe un kit para detección *in situ* de cantidades traza de fármacos sobre una superficie.

Sumario de la invención

Un procedimiento para utilizar una muestra inicialmente recogida en el punto de atención (POC) como fuente de muestras para uso en un laboratorio que no está en el punto de atención (POC) comprende:

a) recoger una muestra sospechosa de contener un microorganismo diana para la prueba de POC, siendo la prueba de POC un inmunoensayo,

5 b) preparar la muestra recogida para uso en la prueba de POC combinando la muestra recogida con un POC con un reactivo de procesamiento configurado para uso con una prueba de POC, consistiendo el reactivo de procesamiento de POC esencialmente en un reactivo de lisis suave que consiste en un amortiguador Tris, NaCl y uno de entre 16% de detergente a un pH de 7.8 o 6% de detergente a un pH de 8.0, y en el que la muestra recogida no se combina después con ningún reactivo adicional antes de la prueba de POC,

10 c) utilizar solo una parte de la muestra procesada para la prueba de POC dejando la parte restante no utilizada para la prueba de POC, y

15 d) utilizar por lo menos una parte de la parte restante de la muestra procesada para una prueba de laboratorio.

El procedimiento anterior en el que se utiliza un instrumento para recoger la muestra y se selecciona el instrumento de entre el grupo que consiste en una espátula y un hisopo.

20 El procedimiento anterior, en el que la ubicación para el ensayo POC es un consultorio médico.

El procedimiento anterior en el que, después de que se ha retirado una parte de la muestra procesada para uso en la prueba de POC, la por lo menos una parte de la parte restante de la muestra procesada y un diluyente de transporte de estabilización se combinan entre sí en un recipiente de transporte para la estabilización de muestras durante el transporte a la prueba de laboratorio.

25 El procedimiento anterior en el que el diluyente de transporte de estabilización estabiliza ácidos nucleicos en la muestra procesada y comprende por lo menos un amortiguador y por lo menos una sal.

30 El procedimiento anterior, en el que después de que se ha retirado una parte de la muestra procesada para uso en la prueba de POC, la por lo menos una parte de la parte restante de la muestra procesada no se combina con un diluyente de transporte de estabilización para la estabilización de la muestra durante el transporte a la prueba de laboratorio.

35 El procedimiento anterior en el que la prueba de laboratorio es un subtipado basado en un ensayo de ácido nucleico, unas pruebas de reflexión o un ensayo de ácido nucleico.

El procedimiento anterior, en el que el ensayo de ácido nucleico es una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

40 El procedimiento anterior, en el que el diluyente de transporte de estabilización se añade a un recipiente que contiene por lo menos una parte de la parte restante de la muestra procesada o por lo menos una parte de la parte restante de la muestra procesada se añade a un recipiente que contiene el diluyente de transporte de estabilización.

45 El procedimiento anterior en el que la muestra sospechosa de contener un microorganismo diana se selecciona de entre el grupo que consiste en una muestra biológica y una muestra ambiental.

Un procedimiento para utilizar una única muestra sospechosa de contener un microorganismo diana para un inmunoensayo de prueba de POC y una prueba de laboratorio, que comprende:

50 a) recoger una muestra para una prueba de POC,

b) procesar la muestra para la prueba de POC combinando la muestra recogida con un reactivo de procesamiento de POC en el que el reactivo de procesamiento de POC consiste esencialmente en un reactivo de lisis suave que consiste en un amortiguador Tris, NaCl y uno de entre 16% de detergente a un pH de 7.8 o 6% de detergente a un pH de 8.0,

55 c) seleccionar la prueba de POC;

60 d) utilizar solo una parte de la muestra procesada para la prueba de POC, dejando una parte restante de la muestra procesada;

e) combinar en un recipiente por lo menos una parte de la parte restante de la muestra procesada y un diluyente de transporte de estabilización que estabiliza por lo menos ácidos nucleicos en la parte de la muestra procesada combinada con el diluyente de transporte de estabilización;

65 f) transferir el recipiente que contiene la parte restante combinada de la muestra procesada y el diluyente de

transporte de estabilización a una ubicación para pruebas de laboratorio, y

- g) utilizar la parte restante combinada de la muestra procesada combinada y el diluyente de transporte de estabilización para pruebas de reflexión o subtipado utilizando PCR.

El procedimiento anterior, en el que se utiliza un instrumento para recoger la muestra biológica y se selecciona el instrumento de entre el grupo que consiste en una espátula y un hisopo.

El procedimiento anterior, en el que la ubicación para la prueba de POC es un consultorio médico.

El procedimiento anterior, en el que el diluyente de transporte de estabilización estabiliza los ácidos nucleicos en la muestra procesada y comprende por lo menos un amortiguador y por lo menos una sal.

El procedimiento anterior, en el que la muestra sospechosa de contener un microorganismo diana se selecciona de entre el grupo que consiste en una muestra biológica y una muestra ambiental.

Un procedimiento para analizar una única muestra biológica o medioambiental utilizando tanto una prueba de POC como una prueba de laboratorio que indiquen la presencia o ausencia de microorganismos en la muestra, que comprende:

- a) recoger una muestra biológica o medioambiental para la prueba de POC, siendo la prueba de POC un inmunoensayo rápido;
- b) procesar la muestra para una prueba de POC combinando la muestra recogida con el reactivo de procesamiento de prueba de POC configurado para uso con una prueba de POC, consistiendo el reactivo de procesamiento de POC esencialmente en un reactivo de lisis suave que consiste en un amortiguador Tris, NaCl y uno de entre 16% de detergente a un pH de 7.8 o 6% de detergente a un pH de 8.0;
- c) utilizar una parte de la muestra procesada para la prueba de POC, y
- d) utilizar por lo menos una parte de la parte restante de la muestra procesada para una prueba de laboratorio.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A ilustra el procedimiento de la técnica anterior para el protocolo estándar para análisis POC y basados en laboratorio.

La figura 1B ilustra el procedimiento para pruebas basadas en POC y laboratorio de la presente invención.

Las figuras 2A/B representan los resultados de RT-PCR para Gripe A de muestras procesadas para pruebas de POC bajo diversas condiciones de dilución.

La figura 3 representa los resultados de RT-PCR para Gripe A de muestras procesadas para pruebas de POC que utilizan dos reactivos de procesamiento de prueba rápida diferentes y diversas condiciones de almacenamiento que utilizan el procedimiento de la presente invención.

La figura 4 representa los resultados de RT-PCR para Gripe A a partir de muestras procesadas para pruebas de POC y seguidamente mezcladas con dos diluyentes de transporte de estabilización diferentes y diversas condiciones de almacenamiento utilizando el procedimiento de la presente invención.

La figura 5 representa los resultados de RT-PCR para Gripe A de las muestras procesadas para pruebas de POC y a continuación mezcladas con un diluyente de transporte de estabilización y diversas condiciones de almacenamiento que utilizan el procedimiento de la presente invención.

Las figuras 6A-C representan los resultados de RT-PCR para dos cepas de Gripe A y una cepa de Gripe B bajo diversas condiciones de almacenamiento utilizando el procedimiento de la presente invención.

Descripción detallada de las formas de realización preferidas

La figura 1A ilustra el protocolo estándar actual para pruebas de POC y basadas en laboratorio. Se recoge un espécimen 105, por ejemplo, utilizando un hisopo 100. Se contemplan para su uso en la presente memoria otros instrumentos convencionales para recoger muestras biológicas. Tales instrumentos, tales como una rasqueta o espátula no se describen en detalle en la presente memoria y se conocen bien por los expertos en la materia. El espécimen 105 se procesa entonces directamente colocando el hisopo 100 con la muestra 105 en solución 110 para prueba rápida POC 120. En esta situación, se descarta cualquier muestra restante y debe recogerse una nueva muestra para pruebas adicionales basadas en laboratorio tales como pruebas confirmatorias o pruebas de

reflexión. En el protocolo estándar alternativo, el espécimen 105 sobre el hisopo 130 se diluye primero en unos medios de transporte 140. Una parte de los medios de transporte diluidos 140 que contiene el espécimen 105 se procesa además en solución 160 para pruebas de POC 170. En esta situación, el espécimen procesado 105 se diluye a un nivel que disminuye los resultados de las pruebas de POC 170 como se ilustra en el Ejemplo 1 siguiente.

La figura 1B ilustra una forma de realización del procedimiento para pruebas de POC y de laboratorio de la presente invención. El espécimen 205 se recoge en un hisopo 200 y se procesa directamente utilizando un reactivo de procesamiento de prueba rápida 210 que se optimiza para producir las prestaciones clínicas máximas para el inmunoensayo particular. El hisopo 200 se retira y el recipiente de prueba rápida 215 se cierra con una tapa dispensadora 216. El recipiente de prueba tapado 215 con tapa dispensadora 216 se utiliza para dispensar una parte de muestra procesada 211 sobre la tira de prueba rápida 220. Las pruebas de POC rápidas 220 se realizan utilizando una parte del espécimen 211 procesado en el reactivo de procesamiento de prueba rápida. La parte restante 212 de la muestra procesada después de las pruebas de POC se transporta 300 al laboratorio clínico para pruebas de laboratorio 400. En la alternativa, la parte restante 212 de la muestra procesada después de las pruebas de POC se añade al vial de transporte 230 que contiene diluyente de transporte de estabilización 240. El diluyente de transporte de estabilización está diseñado para ayudar a mantener la integridad de la muestra. La muestra estabilizada se transporta seguidamente al laboratorio clínico 300 para pruebas confirmatorias u otras pruebas de laboratorio 400. Esta forma de realización ilustra la manera en que una muestra, espécimen 205, puede procesarse en el sitio POC para pruebas de POC y pruebas basadas en laboratorio. Esta forma de realización muestra asimismo que una muestra procesada en condiciones óptimas para pruebas de POC puede utilizarse para pruebas basadas en laboratorio.

Existe una variedad de pruebas rápidas que están disponibles comercialmente en la actualidad. Tales pruebas rápidas no se describen con detalle en la presente memoria, pero están disponibles por una variedad de fuentes, incluyendo Becton Dickinson, Alere, Quidel, Meridian, Genzyme, etc. La invención no está limitada a utilizarse con una prueba rápida particular.

Ejemplos

Ejemplo 1

La capacidad de detectar el ARN viral de la gripe en muestras procesadas para uso en un inmunoensayo rápido POC se demostró utilizando un espécimen clínico positivo H1N1 recogido por un hisopo nasal superior de un individuo que exhibe síntomas de gripe positivos. El hisopo se colocó en 3 ml de medios de transporte comercialmente disponibles (BD™ Universal Viral Transport Media disponible en Becton Dickinson) y se obtuvo confirmación de que la muestra se había probado positivamente para H1N1. Para las pruebas se obtuvieron ciertas partes alícuotas de 50 µl de ese espécimen. Se mezcló directamente una parte alícuota con un reactivo de procesamiento de prueba rápida para el inmunoensayo y otras se diluyeron adicionalmente (5X, 25X, 125X o 625X) con diluyente de transporte de estabilización antes de mezclarse con el reactivo de procesamiento de prueba rápida. Cada parte alícuota de 50 µl de muestra se combinó con 25 µl de reactivo de procesamiento de prueba rápida. El reactivo de procesamiento de prueba rápida (amortiguador Tris, NaCl, 6% de detergente y pH ajustado a 8.0) se optimizó para liberar y preservar la nucleoproteína de la gripe que es el antígeno diana para el inmunoensayo rápido. Los resultados de pruebas de inmunoensayo en las diversas diluciones de muestra se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: resultados de inmunoensayo

Muestra clínica H1N1	Resultado de inmunoensayo rápido
No diluida	Gripe A positiva/Gripe B negativa
Dilución 1:5	Gripe A positiva/Gripe B negativa
Dilución 1:25	Gripe A negativa/Gripe B negativa
Dilución 1:125	Gripe A negativa/Gripe B negativa
Dilución 1:625	Gripe A negativa/Gripe B negativa

Los resultados de prueba de inmunoensayo en la tabla 1 muestran el efecto de la dilución de espécimen en las prestaciones de prueba rápida. Las muestras diluidas mayores que 1:5 dieron como resultado una prueba de inmunoensayo rápida negativa. Por tanto, a fin de proporcionar prestaciones clínicas POC óptimas, deberá minimizarse o evitarse la dilución de espécimen. La dilución del espécimen (excluyendo la ubicación inicial de la muestra en solución) mayor que 1:5 disminuye la posibilidad de detección con una prueba de inmunoensayo rápida. El uso de procesamiento de hisopo directo en el ajuste POC mejora las prestaciones clínicas de inmunoensayos rápidos. Sin embargo, los procedimientos de pruebas de POC estándar que utilizan muestras de hisopo directas, como se hace notar anteriormente, no permiten las pruebas basadas en laboratorio debido a la ubicación inicial de

tales muestras en un diluyente de transporte.

Ejemplo 2

Las partes alícuotas (50 µl) de cada dilución preparadas en el ejemplo 1 se mezclaron con 25 µl de reactivo de procesamiento de prueba rápida. Un conjunto de muestras procesadas se almacenó a temperatura ambiente (RT) durante 5 minutos antes de la extracción de ARN utilizando un kit miniprep de ARN viral Qiagen según las instrucciones del fabricante. Se almacenaron conjuntos adicionales de muestras procesadas durante 4 horas a 4°C o RT antes de la extracción de ARN. Una parte de 5 µl de las muestras de ARN extraídas se utilizó entonces como diana para la transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) con cebadores específicos para el gen matriz del virus de la gripe A. Los resultados RT-PCR se muestran en las figuras 2A y 2B. Las tablas 2 y 3 muestran las condiciones de procesamiento correspondientes a cada línea del gel de agarosa de los resultados RT-PCR mostrados en las figuras 2A y 2B.

Tabla 2: líneas de gel de agarosa de la figura 2A

Procedimiento de procesamiento	Línea de gel de agarosa
Marcador de peso molecular	M
Muestra diluida 1:5, procesada para prueba rápida, extracción de ARN inmediatamente	1
Muestra diluida 1:5, procesada para prueba rápida, almacenada a 4°C durante 4 horas antes de la extracción de ARN	2
Muestra diluida 1:5, procesada para prueba rápida, almacenada a temperatura ambiente durante 4 horas antes de la extracción de ARN	3
Muestra diluida 1:25, procesada para prueba rápida, extracción de ARN inmediatamente	4
Muestra diluida 1:25, procesada para prueba rápida, almacenada a 4°C durante 4 horas antes de la extracción de ARN	5
Muestra diluida 1:25, procesada para prueba rápida, almacenada a temperatura ambiente durante 4 horas antes de la extracción de ARN	6
Muestra diluida 1:5, extracción de ARN (sin prueba rápida/sin reactivo de prueba rápida)	7
Muestra diluida 1:25, extracción de ARN (sin prueba rápida/sin reactivo de prueba rápida)	8
Muestra diluida 1:125, extracción de ARN (sin prueba rápida/sin reactivo de prueba rápida)	9
Muestra diluida 1:625, extracción de ARN (sin prueba rápida/sin reactivo de prueba rápida)	10

Tabla 3: líneas de gel de agarosa de la figura 2B

Procedimiento de procesamiento	Línea de gel de agarosa
Marcador de peso molecular	M
Muestra diluida 1:125, procesada para prueba rápida, extracción de ARN inmediatamente	11
Muestra diluida 1:125, procesada para prueba rápida, almacenada a 4°C durante 4 horas antes de la extracción de ARN	12
Muestra diluida 1:125, procesada para prueba rápida, almacenada a temperatura ambiente durante 4 horas antes de la extracción de ARN	13
Muestra diluida 1:625, procesada para prueba rápida, extracción de ARN inmediatamente	14
Muestra diluida 1:625, procesada para prueba rápida, almacenada a 4°C durante 4 horas antes de la extracción de ARN	15
Muestra diluida 1:625, procesada para prueba rápida, almacenada a temperatura ambiente durante 4 horas antes de la extracción de ARN	16
Muestra diluida 1:5, extracción de ARN (sin prueba rápida/sin reactivo de prueba rápida)	17
Muestra diluida 1:25, extracción de ARN (sin prueba rápida/sin reactivo de prueba rápida)	18
Muestra diluida 1:125, extracción de ARN (sin prueba rápida/sin reactivo de prueba rápida)	19
Muestra diluida 1:625, extracción de ARN (sin prueba rápida/sin reactivo de prueba rápida)	20

Las figuras 2A y 2B ilustran que las muestras procesadas para las pruebas de inmunoensayo rápidas podrían utilizarse asimismo para extracción de ARN que permitieron que se realizaran pruebas PCR basadas en laboratorio. Se extrajo ARN de muestras bien diluidas por debajo del límite de detección para la prueba rápida, indicando que incluso cantidades pequeñas de ARN viral permanecieron estables en la muestra procesada. El almacenamiento de las muestras procesadas a 4°C o a temperatura ambiente durante hasta cuatro horas antes de la extracción de ARN indica asimismo que el ácido nucleico viral permaneció estable después del procesamiento. La comparación de los resultados de la prueba PCR utilizando ARN aislado de las muestras procesadas con el ARN directamente extraído de las diluciones de muestra (líneas 7-10, 17-20) mostró que la integridad del ARN viral se vio mínimamente afectado por la etapa de procesamiento para la prueba rápida.

Ejemplo 3

La estabilidad de ARN viral en muestras procesadas se examinó utilizando dos reactivos de procesamiento de prueba rápida diferentes optimizados para uso en el inmunoensayo rápido para gripe A/B. El procesamiento de muestras para inmunoensayos rápidos implica típicamente el uso de un tratamiento de lisis relativamente suave mediado por un reactivo que contiene diversas sales y detergentes. Dos fórmulas diferentes para el reactivo de procesamiento de prueba rápida se examinaron para compatibilidad con el procedimiento descrito. La fórmula A contenía amortiguador Tris, NaCl, 16% de detergente a un pH de 7.8. La fórmula B contenía amortiguador Tris, NaCl, 6% de detergente a un pH de 8.0. Las partes alícuotas de un espécimen clínico positivo de H1N1 descritas en el ejemplo 1 se procesaron con ambas fórmulas, y las muestras procesadas se utilizaron inmediatamente para extracción de ARN utilizando el kit miniprep de ARN Viral Qiagen, o se almacenaron a RT y 4°C durante hasta 24 horas antes de la extracción de ARN. Una parte de las muestras de ARN extraído se utilizó seguidamente como diana para RT-PCR con cebadores específicos para el gen de matriz del virus de la gripe A. Los resultados de RT-PCR se muestran en la figura 3. La tabla 4 muestra las condiciones de procesamiento correspondientes a cada línea del gel de agarosa de los resultados RT-PCR mostrados en la figura 3.

Tabla 4: líneas de gel de agarosa de la figura 3

Procedimiento de procesamiento	Línea en gel de agarosa
Marcador de peso molecular	M
Muestra procesada con reactivo A de procesamiento de prueba rápida, extracción de ARN inmediatamente	1
Muestra procesada con reactivo A de procesamiento de prueba rápida, almacenada a 4°C durante 4 horas antes de la extracción de ARN	2
Muestra procesada con reactivo A de procesamiento de prueba rápida, almacenada a 4°C durante 24 horas antes de la extracción de ARN	3
Muestra procesada con reactivo B de procesamiento de prueba rápida, extracción de ARN inmediatamente	4
Muestra procesada con reactivo B de procesamiento de prueba rápida, almacenada a 4°C durante 4 horas antes de la extracción de ARN	5
Muestra procesada con reactivo B de procesamiento de prueba rápida, almacenada a 4°C durante 24 horas antes de la extracción de ARN	6
Muestra procesada con reactivo A de procesamiento de prueba rápida, almacenada a temperatura ambiente durante 4 horas antes de la extracción de ARN	7
Muestra procesada con reactivo A de procesamiento de prueba rápida, almacenada a temperatura ambiente durante 24 horas antes de la extracción de ARN	8
Muestra procesada con reactivo B de procesamiento de prueba rápida, almacenada a temperatura ambiente durante 4 horas antes de la extracción de ARN	9
Muestra procesada con reactivo B de procesamiento de prueba rápida, almacenada a temperatura ambiente durante 24 horas antes de la extracción de ARN	10

La figura 3 muestra que tanto la fórmula A como la fórmula B son compatibles con el uso de la muestra procesada para la extracción de ARN y pruebas PCR. El almacenamiento de las muestras procesadas a 4°C durante hasta 24 horas antes de la extracción de ARN sugiere una pequeña degradación del ARN viral ocurrido en muestras procesadas con cualquier fórmula. Sin embargo, el almacenamiento prolongado de las muestras extraídas a RT mostró prestaciones reducidas PCR, posiblemente debido a la degradación del ARN viral a lo largo del tiempo (líneas 8, 10).

Ejemplo 4

Se examinaron dos diluyentes de transporte de estabilización potenciales en un intento de incrementar la estabilidad del ARN viral en muestras procesadas para pruebas de POC. El diluyente de transporte de estabilización se diseñó para ayudar a mantener la integridad de ácidos nucleicos presentes en la muestra. Son posibles diversas fórmulas cuando puedan emplearse condiciones de pH óptimas, tipos de amortiguadores, sales, agentes quelantes, inhibidores de enzimas, proteínas de fijación de ácido nucleico, caótopos, etc. El diluyente de transporte de estabilización A contenía amortiguador de lisis/fijación de ARN viral Quiagen. El diluyente de transporte de estabilización B contenía 6 M de tiocianato de guanidina + 20 mM de EDTA. Las partes alícuotas de un espécimen clínico positivo H1N1 se procesaron utilizando el reactivo B de procesamiento de prueba rápida. Las muestras procesadas se utilizaron inmediatamente para la extracción de ARN o se mezclaron con uno de los dos diluyentes de transporte de estabilización diferentes y se almacenaron a 4°C durante hasta seis días antes de la extracción de ARN. Una parte de las muestras de ARN extraídas se utilizó entonces como diana para RT-PCR con cebadores específicos para el gen de matriz del virus de gripe A. Los resultados de RT-PCR se muestran en la figura 4. La tabla 5 muestra las condiciones de procesamiento correspondientes a cada línea del gel de agarosa de los resultados de RT-PCR mostrados en la figura 4.

Tabla 5: líneas de gel de agarosa de la figura 4

Procedimiento de procesamiento	Línea en gel de agarosa
Marcador de peso molecular	M
Muestra procesada para prueba rápida, extracción de ARN inmediatamente	1
Muestra procesada para prueba rápida, mezclada con diluyente A de transporte de estabilización, almacenada a 4°C durante 3 días antes de la extracción de ARN	2
Muestra procesada para prueba rápida, mezclada con diluyente B de transporte de estabilización, almacenada a 4°C durante 3 días antes de la extracción de ARN	3
Muestra procesada para prueba rápida, mezclada con diluyente A de transporte de estabilización, almacenada a 4°C durante 6 días antes de la extracción de ARN	4
Muestra procesada para prueba rápida, mezclada con diluyente B de transporte de estabilización, almacenada a 4°C durante 6 días antes de la extracción de ARN	5

Utilizando cualquiera de las fórmulas del diluyente de transporte de estabilización, se extrajo ARN viral intacto de muestras procesadas para pruebas de POC que se habían almacenado durante hasta 6 días a 4°C. Comparando los resultados PCR de las muestras almacenadas (líneas 2-5) con los obtenidos utilizando ARN extraído inmediatamente después del procesamiento (línea 1) sugiere poca degradación, si existe, del ARN viral ocurrida a lo largo del tiempo en las muestras procesadas tratadas con cualquiera de los diluyentes de transporte de estabilización.

Ejemplo 5

Se utilizó un diluyente de transporte de estabilización en un intento de incrementar la estabilidad de la ARN viral en muestras procesadas para pruebas de POC, particularmente cuando las muestras se almacenan durante extensos periodos de tiempo a temperatura ambiente.

Las partes alícuotas de un espécimen clínico positivo de H1N1 se procesaron utilizando una fórmula B de reactivo de procesamiento de prueba rápida descrita en el Ejemplo 3, y las muestras procesadas se utilizaron inmediatamente para la extracción de ARN, o se mezclaron con diluyente A de transporte de estabilización y se almacenaron a RT y 4°C durante hasta siete días antes de la extracción de ARN. Una parte de las muestras de ARN extraídas se utilizó entonces como diana para RT-PCR con cebadores específicos para el gen de matriz del virus de gripe A. En la figura 5 se muestran los resultados PCR. La tabla 6 muestra las condiciones de procesamiento correspondientes a cada línea del gel de agarosa de los resultados RT-PCR mostrados en la figura 5.

Tabla 6: líneas de gel de agarosa de la figura 5.

Procedimiento de procesamiento	Línea de gel de agarosa
Marcador de peso molecular	M
Muestra procesada para prueba rápida, extracción de ARN inmediatamente	1
Muestra procesada para prueba rápida, mezclada con diluyente de transporte de estabilización, almacenada a 4°C durante 3 días antes de la extracción de ARN	2
Muestra procesada para prueba rápida, mezclada con diluyente de transporte de estabilización, almacenada a 4°C durante 4 días antes de la extracción de ARN	3
Muestra procesada para prueba rápida, mezclada con diluyente de transporte de estabilización, almacenada a 4°C durante 5 días antes de la extracción de ARN	4
Muestra procesada para prueba rápida, mezclada con diluyente de transporte de estabilización, almacenada a 4°C durante 6 días antes de la extracción de ARN	5
Muestra procesada para prueba rápida, mezclada con diluyente de transporte de estabilización, almacenada a 4°C durante 7 días antes de la extracción de ARN	6
Muestra procesada para prueba rápida, mezclada con diluyente de transporte de estabilización, almacenada a temperatura ambiente durante 1 día antes de la extracción de ARN	7
Muestra procesada para prueba rápida, mezclada con diluyente de transporte de estabilización, almacenada a temperatura ambiente durante 2 días antes de la extracción de ARN	8
Muestra procesada para prueba rápida, mezclada con diluyente de transporte de estabilización, almacenada a temperatura ambiente durante 3 días antes de la extracción de ARN	9
Muestra procesada para prueba rápida, mezclada con diluyente de transporte de estabilización, almacenada a temperatura ambiente durante 4 días antes de la extracción de ARN	10

La mezcla de la muestra procesada con un diluyente de transporte de estabilización incrementó la estabilidad del ácido nucleico viral, y permitió el almacenamiento a largo plazo y el transporte de la muestra procesada a diversas

temperaturas. La figura 5 muestra que puede extraerse ARN viral intacto de las muestras procesadas mezcladas con el diluyente de transporte de estabilización después del almacenamiento de las muestras durante hasta 7 días a 4°C o hasta 4 días a temperatura ambiente.

5 Ejemplo 6

El diluyente B de transporte de estabilización se utilizó para examinar las propiedades de estabilización en las diferentes cepas de gripe: cepa A de gripe A/Isla Salomón/03/06 (H1N1); B: cepa A de gripe A/Wisconsin/67/2005 (H3N2); y C: cepa B de gripe B/Jiangsu/10/2003. Se recogieron partes alícuotas (50 µl) de sobrenadantes de cultivos celulares en los que se había introducido el virus de hisopos nasales de un paciente que mostraba síntomas de gripe, y estas partes alícuotas se combinaron con un reactivo B de procesamiento de prueba rápida (25 µl) y las muestras procesadas se utilizaron inmediatamente para la extracción de ARN o se mezclaron con diluyente de transporte de estabilización B (75 µl) y se almacenaron a 4°C o -20°C durante hasta catorce días antes de la extracción de ARN. Una parte de las muestras de ARN extraídas se utilizaron entonces como diana para reacciones RT-PCR con cebadores específicos para el gen de matriz de gripe A o el gen de nucleoproteína de gripe B. Los resultados PCR se muestran en la figura 6. La tabla 7 muestra las condiciones de procesamiento correspondientes a cada línea del gel de agarosa de los resultados RT-PCR mostrados en la figura 6.

Tabla 7: Tabla 6: líneas de gel de agarosa de la figura 6.

Procedimiento de procesamiento	Línea de gel de agarosa
Muestra procesada para prueba rápida, extracción de ARN inmediatamente	1
Muestra procesada para prueba rápida, mezclada con diluyentes B de transporte de estabilización, almacenada a 4°C durante 2 días antes de la extracción de ARN	2
Muestra procesada para prueba rápida, mezclada con diluyentes B de transporte de estabilización, almacenada a 4°C durante 7 días antes de la extracción de ARN	3
Muestra procesada para prueba rápida, mezclada con diluyentes B de transporte de estabilización, almacenada a 4°C durante 10 días antes de la extracción de ARN	4
Muestra procesada para prueba rápida, mezclada con diluyentes B de transporte de estabilización, almacenada a 4°C durante 14 días antes de la extracción de ARN	5
Muestra procesada para prueba rápida, mezclada con diluyentes B de transporte de estabilización, almacenada a -20°C durante 7 días antes de la extracción de ARN	6

La mezcla de la muestra procesada con un diluyente de transporte de estabilización aumentó la estabilidad del ácido nucleico viral en las tres cepas de gripe durante hasta 14 días a 4°C o hasta 7 días a -20°C. La figura 6 muestra que el ARN viral intacto de las diversas cepas puede extraerse de muestras procesadas mezcladas con el diluyente de transporte de estabilización después del almacenamiento de las muestras durante hasta 7 días a 4°C o hasta 14 días a -20°C. Para las cepas A y B, se extrajo ARN viral intacto después del almacenamiento bajo todas las condiciones.

30 Ejemplo 7

La utilidad de una forma de realización del procedimiento de la presente invención ilustrada en la figura 1B se demostró en un ensayo clínico realizado durante la temporada de gripe 2010-2011. Se recogieron hisopos emparejados nasofaríngeos (NPS) o nasales superiores de pacientes inscritos en el estudio de gripe POC. Se procesó directamente un hisopo para uso en un inmunoensayo rápido de investigación en el sitio POC y a continuación una parte (3 a 5 gotas) de la muestra restante se mezcló con el diluyente B de transporte de estabilización (200 µl) y se almacenó a entre 2 y 8°C durante hasta 5 días o -20°C durante hasta dos semanas antes de enviarse a un laboratorio para análisis PCR. El segundo hisopo se colocó en 3 ml de medios de transporte virales y se envió directamente a un laboratorio clínico para pruebas PCR.

Todas las pruebas PCR se realizaron utilizando el ensayo Prodesse ProFlu+ disponible en GenProbe, Inc. (San Diego, CA). La prueba Prodesse ProFlu+ está homologada por la FDA y es capaz de detectar y diferenciar la gripe A, la gripe B y RSV en especímenes respiratorios. Para los especímenes de hisopo en medios de transporte, se extrajo ARN utilizando el sistema NucliSENS easyMAG (bioMérieux) según el folleto de Prodesse ProFlu+. Para las muestras procesadas POC en el diluyente de transporte de estabilización, se extrajo ARN utilizando el kit miniprep de ARN viral Qiagen según el fabricante. Se utilizaron cinco microlitros de ARN extraídos para amplificación PCR utilizando un instrumento Cepheid SmartCycler II según el procedimiento de ensayo descrito en el folleto de Prodesse ProFlu+. La interpretación de los resultados PCR para especímenes y controles se determinó utilizando el software Cepheid SmartCycler Dx según los protocolos esbozados en el folleto de Prodesse ProFlu+. Las concordancias porcentuales positiva y negativa entre los resultados obtenidos a partir de la muestra estabilizada POC (POC PCR) y la muestra de hisopo en medios de transporte (referencia PCR) se muestran a continuación en la Tabla 7.

Tabla 7: comparación de los resultados de muestras procesadas POC en comparación con la referencia PCR.

Gripe A				Gripe B				RSV			
	Referencia PCR				Referencia PCR				Referencia PCR		
POC PCR	P	N		POC PCR	P	N		POC PCR	P	N	
P	150	22	172	P	91	12	103	P	18	2	20
N	5	335	340	N	8	401	409	N	1	491	492
	155	357	512		99	413	512		19	493	512
Procedimiento de referencia: PCR de hisopo en medios de transporte Concordancia porcentual positiva: 96,8% Concordancia porcentual negativa: 93,8%				Procedimiento de referencia: PCR de hisopo en medios de transporte Concordancia porcentual positiva: 91,9% Concordancia porcentual negativa: 97.1%				Procedimiento de referencia: PCR de hisopo en medios de transporte Concordancia porcentual positiva: 94,7% Concordancia porcentual negativa: 99,6%			

- 5 La Tabla 7 ilustra que las muestras pueden procesarse para pruebas de POC rápidas y una parte de esa muestra procesada puede utilizarse para pruebas basadas en laboratorio tales como PCR. Se obtuvo una concordancia mayor que 91,9% en diversas cepas virales cuando se compara una muestra que se procesó directamente para PCR con una muestra que se procesó primero en condiciones óptimas para pruebas de POC rápidas y entonces seguidamente se procesó para PCR.
- 10 Aunque la invención se ha descrito en la presente memoria haciendo referencia a formas de realización particulares, debe apreciarse que estas formas de realización son únicamente ilustrativas de los principios y aplicaciones de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para utilizar una muestra recogida inicialmente en el punto de atención (POC) como fuente para muestra para utilización en un laboratorio que no está en el punto de atención (POC) que comprende:

- a) recoger una muestra sospechosa de contener un microorganismo diana para la prueba de POC, en el que la prueba de POC es un inmunoensayo,
- b) preparar la muestra recogida para utilización en la prueba de POC combinando la muestra recogida con POC con un reactivo de procesamiento configurado para utilización con una prueba de POC, en el que el reactivo de procesamiento de POC consiste esencialmente en un reactivo de lisis suave que consiste en un amortiguador Tris, NaCl y uno de entre 16% de detergente a un pH de 7.8 o 6% de detergente a un pH de 8.0 y en el que la muestra recogida no se combina con ningún reactivo adicional a partir de entonces antes de la prueba de POC,
- c) utilizar únicamente una parte de la muestra procesada para la prueba de POC dejando la parte restante no utilizada para la prueba de POC, y
- d) utilizar por lo menos una parte de la parte restante de la muestra procesada para una prueba de laboratorio.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se utiliza un instrumento para recoger la muestra y el instrumento se selecciona de entre el grupo que consiste en una espátula y un hisopo.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la ubicación para la prueba de POC es un consultorio médico.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que, después de que una parte de la muestra procesada se haya retirado para utilización en la prueba de POC, la por lo menos una parte de la parte restante de la muestra procesada y un diluyente de transporte de estabilización se combinan entre sí en un recipiente de transporte para la estabilización de la muestra durante el transporte a la prueba de laboratorio.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el diluyente de transporte de estabilización estabiliza unos ácidos nucleicos en la muestra procesada y comprende por lo menos un amortiguador y por lo menos una sal.

6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que, después de que se haya retirado una parte de la muestra procesada para utilización en la prueba de POC, la por lo menos una parte de la parte restante de la muestra procesada no se combina con un diluyente de transporte de estabilización para la estabilización de la muestra durante el transporte a la prueba de laboratorio.

7. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6, en el que la prueba de laboratorio es un subtipado basado en un ensayo de ácido nucleico, unas pruebas de reflexión o un ensayo de ácido nucleico.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el ensayo de ácido nucleico es una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

9. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el diluyente de transporte de estabilización se añade a un recipiente que contiene por lo menos una parte de la parte restante de la muestra procesada o por lo menos una parte de la parte restante de la muestra procesada se añade a un recipiente que contiene el diluyente de transporte de estabilización.

10. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 9, en el que la muestra sospechosa de contener un microorganismo diana se selecciona de entre el grupo que consiste en una muestra biológica y una muestra ambiental.

11. Procedimiento para utilizar una única muestra sospechosa de contener un microorganismo diana para un inmunoensayo de prueba de POC y una prueba de laboratorio que comprende:

- a) recoger una muestra para una prueba de POC,
- b) procesar la muestra para la prueba de POC combinando la muestra recogida con un reactivo de procesamiento de POC, en el que el reactivo de procesamiento de POC consiste esencialmente en un reactivo de lisis suave que consiste en un amortiguador Tris, NaCl y uno de entre 16% de detergente a un pH de 7.8 o 6% de detergente a un pH de 8.0,
- c) seleccionar la prueba de POC;

- d) utilizar únicamente una parte de la muestra procesada para la prueba de POC, dejando una parte restante de la muestra procesada;
- 5 e) combinar en un recipiente por lo menos una parte de la parte restante de la muestra procesada y un diluyente de transporte de estabilización que estabiliza por lo menos unos ácidos nucleicos en la parte de la muestra procesada combinada con el diluyente de transporte de estabilización;
- 10 f) transferir el recipiente que contiene la parte restante combinada de la muestra procesada y el diluyente de transporte de estabilización a una ubicación para pruebas de laboratorio, y
- g) utilizar la parte restante combinada de la muestra procesada combinada y el diluyente de transporte de estabilización para pruebas de reflexión o subtipado que utiliza PCR.
- 12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que se utiliza un instrumento para recoger la muestra biológica y el instrumento se selecciona de entre el grupo que consiste en una espátula y un hisopo.
- 15 13. Procedimiento según la reivindicación 11 o 12, en el que la ubicación para la prueba de POC es un consultorio médico.
- 20 14. Procedimiento según las reivindicaciones 11 a 13, en el que el diluyente de transporte de estabilización estabiliza unos ácidos nucleicos en la muestra procesada y comprende por lo menos un amortiguador y por lo menos una sal.
- 25 15. Procedimiento según las reivindicaciones 11 a 14, en el que la muestra sospechosa de contener un microorganismo diana se selecciona de entre el grupo que consiste en una muestra biológica y una muestra ambiental.
- 30 16. Procedimiento para analizar una única muestra biológica o medioambiental que utiliza tanto una prueba de POC como una prueba de laboratorio que indiquen la presencia o ausencia de microorganismos en la muestra, que comprende:
 - a) recoger una muestra biológica o medioambiental para la prueba de POC, en el que la prueba de POC es un inmunoensayo rápido;
 - 35 b) procesar la muestra para una prueba de POC combinando la muestra recogida con el reactivo de procesamiento de prueba de POC configurado para una utilización con una prueba de POC en el que el reactivo de procesamiento de POC consiste esencialmente en un reactivo de lisis suave que consiste en un amortiguador Tris, NaCl y uno de entre 16% de detergente a un pH de 7.8 o 6% de detergente a un pH de 8.0;
 - 40 c) utilizar una parte de la muestra procesada para la prueba de POC, y
 - d) utilizar por lo menos una parte de la parte restante de la muestra procesada para una prueba de laboratorio.

FIG. 1A

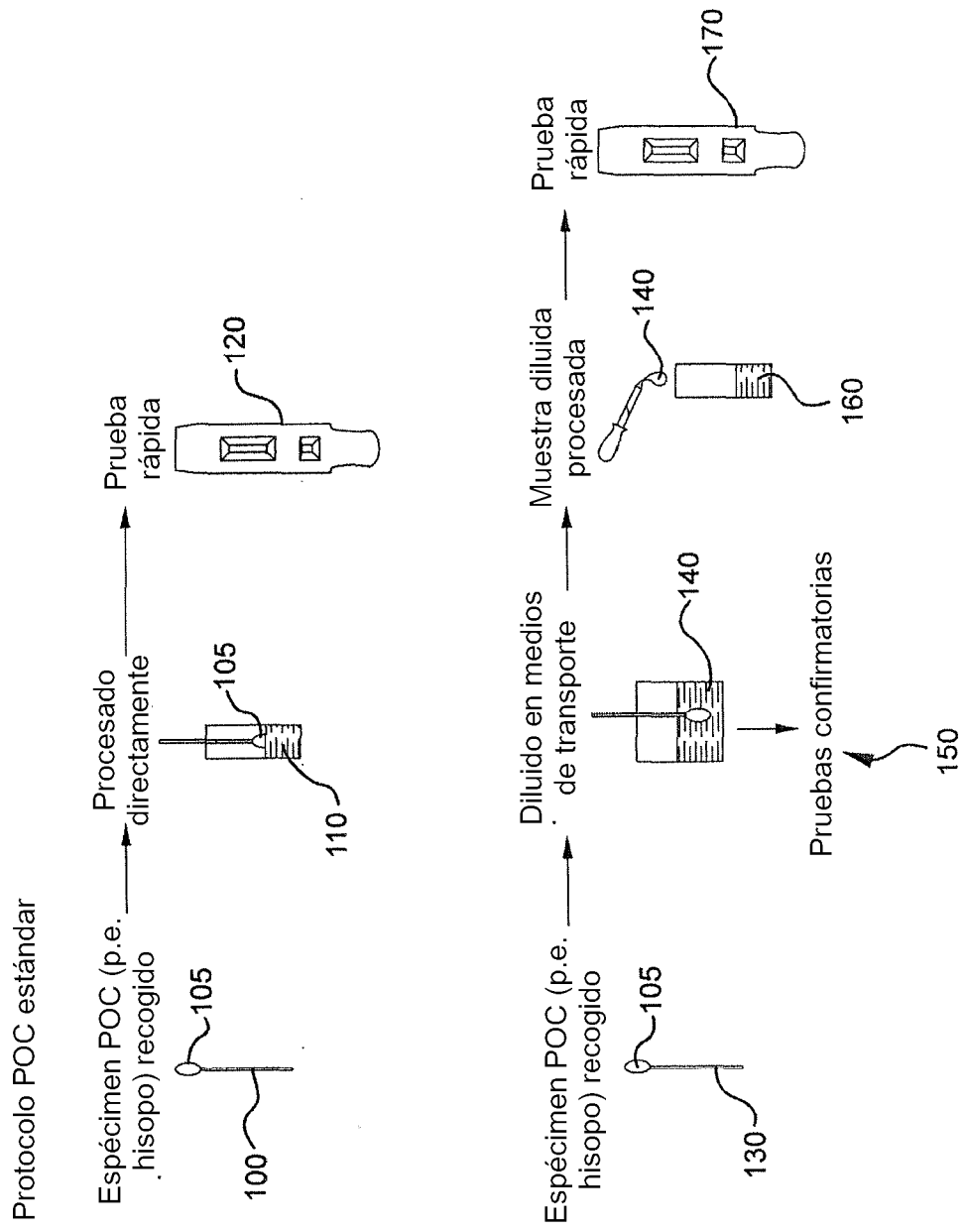


FIG. 1B

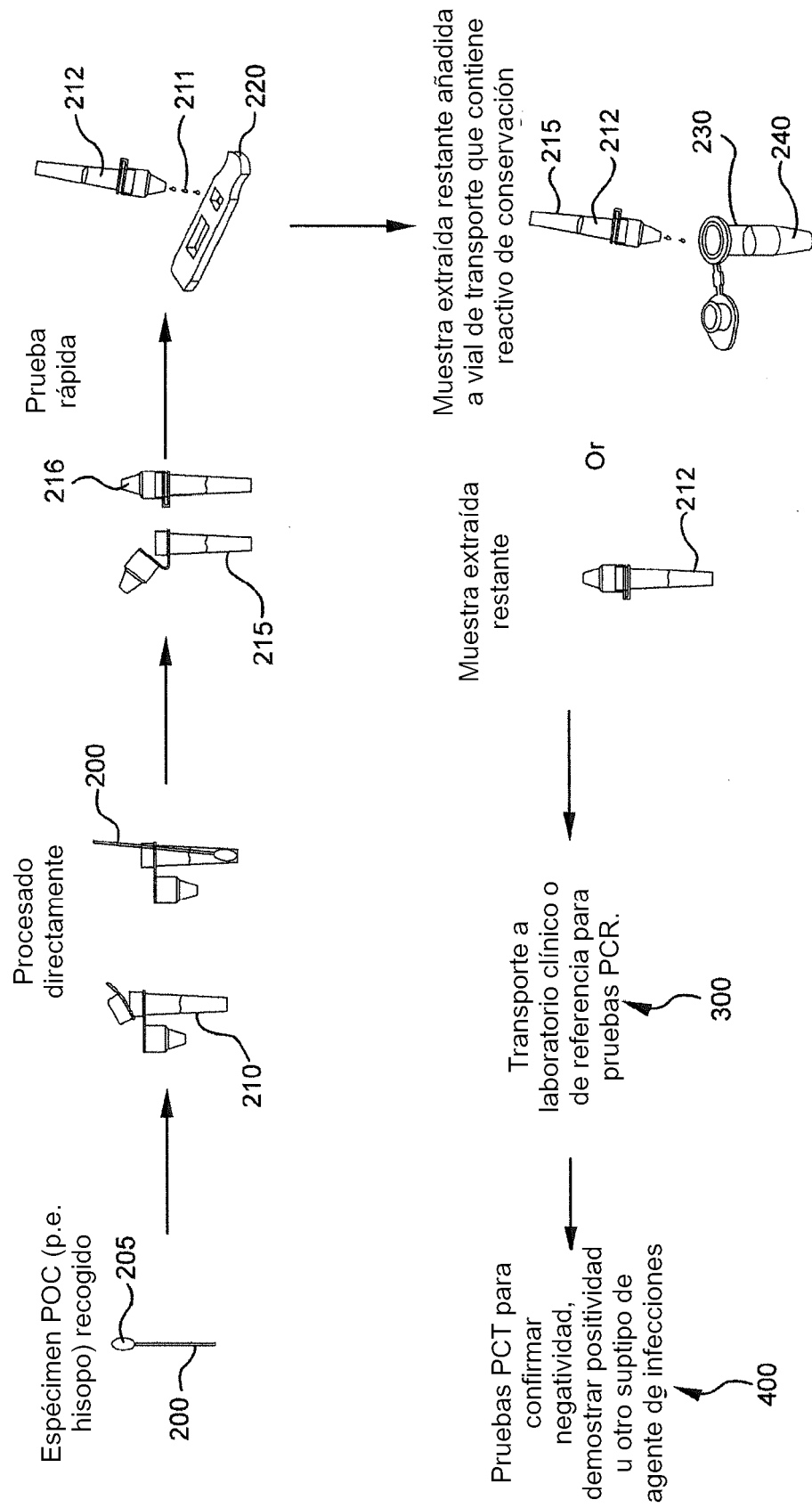


FIG. 2A

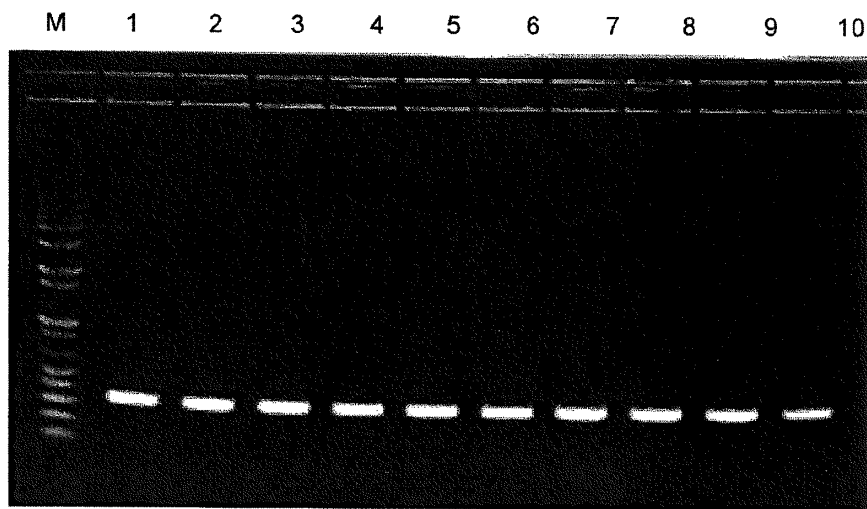


FIG. 2B

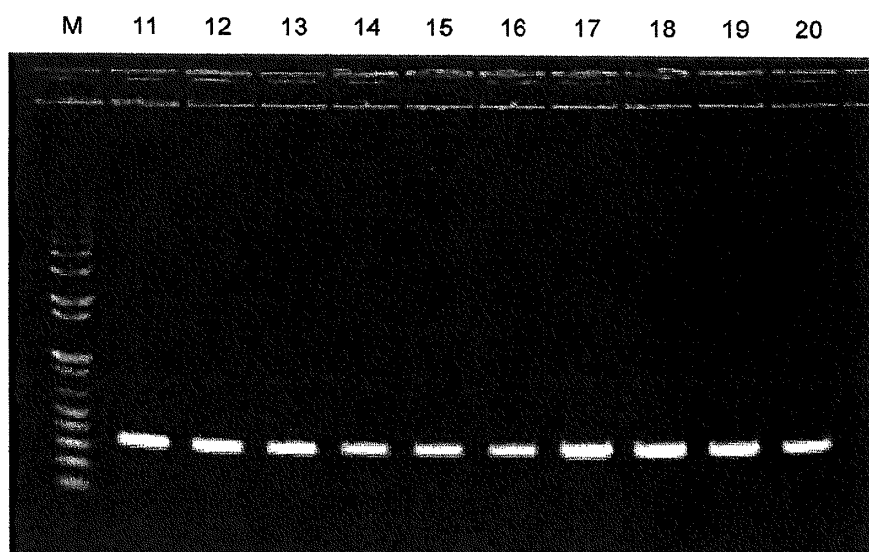


FIG. 3

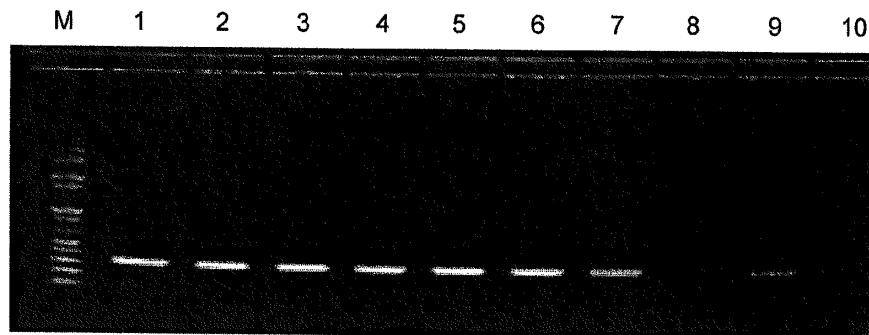


FIG. 4

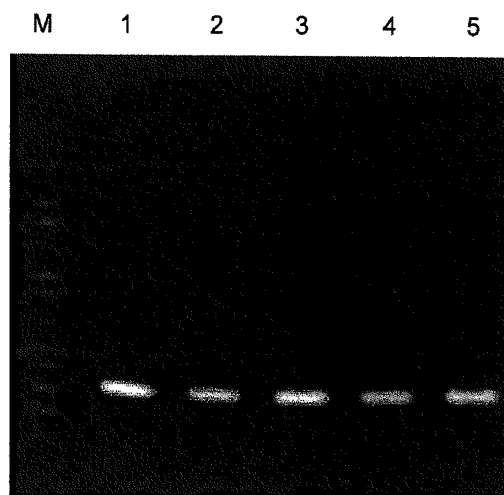


FIG. 5

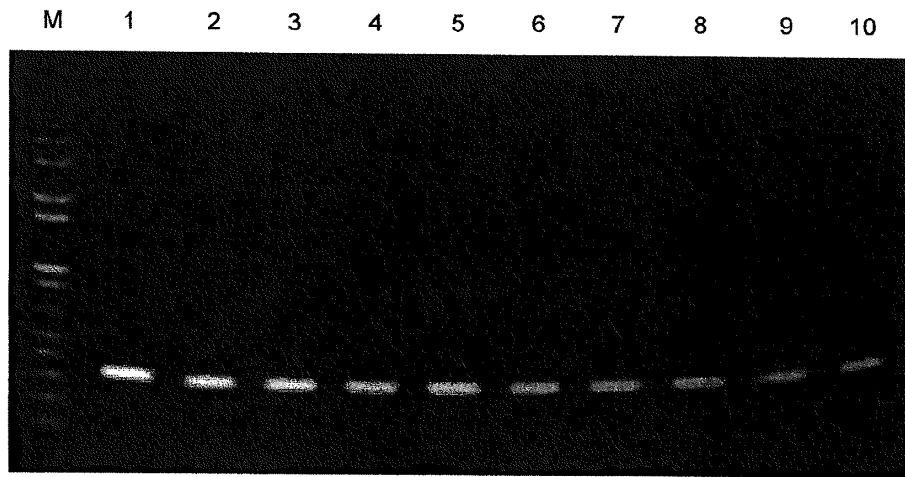


FIG. 6A

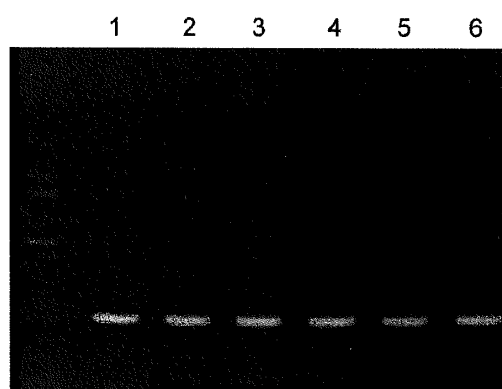


FIG. 6B

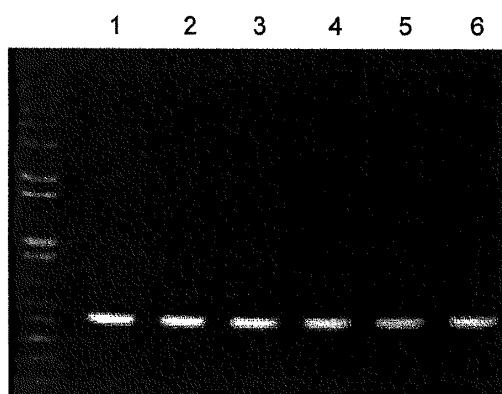


FIG. 6C

