



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 347 564**

51 Int. Cl.:  
**B01L 3/14** (2006.01)  
**A61B 5/145** (2006.01)  
**A61B 5/15** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04780224 .4**  
96 Fecha de presentación : **05.08.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1656205**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.05.2006**

54 Título: **Dispositivo y métodos para la recogida de una muestra de fluido biológico y el tratamiento de componentes seleccionados.**

30 Prioridad: **05.08.2003 US 492313 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.11.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.11.2010**

73 Titular/es: **Becton, Dickinson and Company**  
**1 Becton Drive**  
**Franklin Lakes, New Jersey 074, US**

72 Inventor/es: **Dastane, Ajit, N.;**  
**Manoussakis, Dimitrios;**  
**Battles, Christopher, A.;**  
**Decesare, Paul y**  
**Radziunas, Jeffrey**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 347 564 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

**CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a dispositivos y métodos para recoger y estabilizar una muestra biológica, particularmente una muestra de sangre completa, directamente de un paciente. Más concretamente, la presente invención se refiere a dispositivos de recogida de muestras que tengan un aditivo de estabilización contenido en la misma para estabilizar los ácidos nucleicos tras la recogida de muestras biológicas y para inhibir la degradación durante el almacenaje o transporte de la misma.

10

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Las pruebas de diagnóstico pueden requerir la separación de una muestra de sangre completa de los pacientes dentro de componentes, tales como plasma o suero (es decir, los componentes de la fase más ligera) y células de la sangre roja (es decir, el componente de la fase más pesado). Por ejemplo, una muestra de plasma puede ser ensayada usando técnicas de amplificación conocidas para vigilar la carga vírica HIV RNA de pacientes infectados de HIV para diagnosticar y gestionar la enfermedad. Una respuesta del paciente a las drogas aprobadas, nuevas drogas y terapias de una combinación de drogas podrían ser evaluadas vigilando la carga vírica de HIV RNA del paciente. En adición al virus HIV, hay un número de otras enfermedades infecciosas que se beneficiarían vigilando la carga viral, tales como el virus de la Hepatitis C.

15

20

Actualmente, la comprobación del plasma viral se ejecuta típicamente extrayendo muestras de sangre completas mediante la perforación de venas por medio de una cánula o aguja fijadas a una jeringa o un tubo de recogida evacuado. La separación de la sangre en plasma y otros componentes celulares, o en suero y células de sangre rojas se efectúa entonces mediante la centrifugación de la jeringa o tubo en una centrífuga. Tales técnicas típicamente usan una barrera que se mueve entre las dos fases de la muestra que están separadas, manteniendo de ese modo la separación de componentes para el examen subsiguiente de los componentes individuales. Típicamente, las muestras debes entonces ser transportadas aun lugar diferente, tal como un laboratorio, en el que el personal efectúa ensayos específicos sobre las muestras. Generalmente, una cantidad considerable de tiempo transcurre entre la obtención de la muestra y el análisis de esta. Un problema común y recurrente, por lo tanto, es el mantenimiento de la muestra biológica de una manera que impida la degradación, alteración o destrucción de materiales esenciales durante

25

30

35

las manipulaciones y/o análisis precedente de las preparaciones de la muestra biológica.

Actualmente, las muestras de sangre son recogidas en tubos EDTA y centrifugados para obtener plasma, Las muestras de plasma son entonces transportadas en tubos primarios o secundarios sobre hielo o sometidos a condiciones refrigeradas para posterior análisis. La fría temperatura de transporte reduce la degradación de vRNA.

EP-A-1106252 describe un tubo para la recogida de sangre que tiene cierres en ambos extremos y un separador mecánico capaz de separar la sangre recogida en componentes discretos. Además este comprende un reagente (agente de estabilización de ácido nucleico) posicionado entre el miembro de separación t el extremo de fondo del tubo. Un tubo similar se halla en US-A-2003/108447.

Existe la necesidad de un dispositivo estándar para reunir, procesar y transportar muestras de plasma para ser usadas con tecnologías de amplificación. Con la máxima preferencia, el dispositivo debe ser capaz de ayudar en la manipulación de normalización de muestras estándar, que proporcionan un sistema cerrado que aísla el plasma de de los componentes celulares, produce dilución mínima del plasma, e interferencia minimizada con el ensayo del ácido nucleico.

## 20 **SUMARIO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a un dispositivo para reunir una muestra biológica que comprende un recipiente que tiene una porción de depósito para recibir la muestra, un miembro de separación dispuesto en el recipiente para separar la muestra entre sus componentes, y al menos un reactivo,, por ejemplo, un agente de estabilización tal como para la estabilización del ácido nucleico, posicionado en el recipiente para interaccionar selectivamente con al menos un componente de la muestra separada. En una realización, el recipiente es un tubo que tiene un primer extremo y un segundo extremo, y el tubo puede ser parcialmente evacuado.

Típicamente la muestra biológica es sangre completa. Preferiblemente, el reactivo está posicionado para impedir la interacción con la totalidad de la sangre. Más particularmente, el reactivo puede estar posicionado para interaccionar selectivamente con un componente de plasma o suero mientras está sustancialmente aislado de otros componentes de la sangre completa.

En una realización, el miembro de separación es un elemento de separación mecánico, y en una realización alternativa, el miembro de separación es un gel. El miembro gel de separación puede también estar físicamente separado del reactivo.

En particular, la presente invención se refiere a un dispositivo para recoger una muestra biológica, que comprende:

un recipiente que tiene un primer extremo abierto, y un extremo inferior cerrado;

un miembro de separación dispuesto en el recipiente, siendo el miembro de separación capaz de separar tras la centrifugación la muestra en componentes discretos;

al menos un mecanismo de liberación de reactivo posicionado encima del miembro de separación; y

al menos un reactivo situado dentro del mecanismo de liberación de reactivo;

en donde dicho mecanismo de liberación de reactivo impide el contacto entre dicho reactivo y dicha muestra biológica hasta después de la separación de dicha muestra biológica en componentes discretos.

La presente invención se refiere también a métodos para la recogida y preparación de una especie de plasma o suero para el ensayo subsiguiente, por ejemplo, el ensayo de ácido nucleico. Los métodos comprenden proporcionar un tubo para recibir una muestra de sangre completa. El tubo comprende un extremo superior y un extremo inferior, un miembro de separación dispuesto dentro del tubo para separar la muestra en sus componentes, y al menos un reactivo, por ejemplo, un agente de estabilización de ácido nucleico. Los métodos comprenden además recoger una muestra de sangre completa dentro del tubo, mantener la muestra de sangre completa separada del reactivo, separar plasma o suero de otros componentes de la sangre, y mezclar el plasma o suero en el tubo con el reactivo.

En particular, la presente invención se refiere a un método para la recogida y preparación de un espécimen, que comprende:

proporcionar un tubo, en donde el tubo comprende un extremo superior que contiene un cierre y un extremo inferior cerrado, un miembro de separación dispuesto en el recipiente donde el miembro es capaz de separar la muestra en componentes discretos, y al menos un mecanismo de liberación de reactivo que comprenda un reactivo situado encima del miembro de separación;

recoger una muestra dentro del tubo, de modo que la muestra esté separada del reactivo;

someter el tubo a un procedimiento de centrifugación que induce la separación de la mezcla en componentes discretos;

activar el mecanismo de liberación de reactivo para permitir el contacto del reactivo con el componente discreto, siendo efectuada la activación manualmente o mediante la acción del proceso que induce la separación; y

mezclar el componente discreto deseado de la muestra con el reactivo ya sea permitiendo el proceso que induce la separación para inducir el mezclado o mediante una operación de mezclado distinta.

Las realizaciones preferidas de la invención son evidentes a partir de las reivindicaciones dependientes.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La Figura 1 es una vista en sección transversal de un dispositivo de recogida de sangre.

La Figura 2 es una vista en sección transversal del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 1, durante la introducción de la muestra dentro del dispositivo, pero antes de la centrifugación.

La Figura 3 es una vista en sección transversal de la muestra de la Figura 2 girada a través de 180° y después de la centrifugación facilitando la separación en sus componentes.

La Figura 4 es una vista en sección transversal de una realización alternativa de un dispositivo de recogida de sangre que tiene un miembro de separación de gel.

La Figura 5A es una vista en sección transversal de una realización alternativa de un dispositivo de recogida de sangre que tiene un miembro de separación de gel.

La Figura 5B es una vista en sección transversal ampliada de un mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 5A.

La Figura 5C es una vista en sección transversal del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 5A que contiene la muestra completa durante las etapas iniciales de centrifugación.

La Figura 5D es una vista en sección transversal del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 5A después de la centrifugación que facilita la separación de sus componentes y la activación del mecanismo de liberación de reactivo.

La Figura 6A es una vista en sección transversal de una realización alternativa de un dispositivo de recogida de sangre de la presente invención que tiene un miembro de separación de gel.

La Figura 6B es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 6A antes de la centrifugación.

5 La Figura 6C es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 6A durante la centrifugación.

La Figura 6D es una vista en sección transversal del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 6A después de la centrifugación que facilita la separación en sus componentes y la activación del mecanismo de liberación de reactivo.

10 La Figura 6E es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 6A después de la centrifugación.

La Figura 7A es una vista en sección transversal de una realización alternativa de un dispositivo de recogida de sangre de la presente invención que tiene un miembro de separación de gel.

La Figura 7B es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo de la Figura 7A antes de la centrifugación.

20 La Figura 7C es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 7A durante la etapa inicial de centrifugación.

La Figura 7D es una vista en sección transversal del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 7A durante la etapa final de la centrifugación.

25 La Figura 7E es una vista en sección transversal del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 7A después de la centrifugación.

La Figura 7F es una vista en sección transversal del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 7A después de la centrifugación que facilita la separación en sus componentes y la activación del mecanismo de liberación de reactivo.

30 La Figura 8A es una vista en sección transversal de una realización alternativa del dispositivo de recogida de sangre de la presente invención que tiene un miembro de separación de gel.

35 La Figura 8B es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 8A antes de la centrifugación.

La Figura 8C es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 8A durante la centrifugación.

5 La Figura 8D es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 8A inmediatamente después de la centrifugación.

La Figura 8E es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 8A antes de la centrifugación.

10 La Figura 8F es una vista en sección transversal del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 8A después de la centrifugación que facilita la separación entre sus componentes y la activación del mecanismo de liberación de reactivo.

La Figura 9A es una vista en sección transversal de una realización alternativa de un dispositivo de recogida de sangre de la presente invención que tiene un miembro de separación de gel.

La Figura 9B es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 9A antes de la centrifugación.

20 La Figura 9C es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 9A durante la centrifugación.

La Figura 9D es una vista en sección transversal del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 9a después de la centrifugación que facilita la separación en sus componentes y la activación del mecanismo de liberación de reactivo.

La Figura 10A es una vista en sección transversal de una realización alternativa de un dispositivo de recogida de sangre de la presente invención que tiene un miembro de separación de gel.

30 La Figura 10B es una vista en sección transversal amplificada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de recogida de sangre e la Figura 10A antes de la centrifugación.

La Figura 10C es una vista en sección transversal del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 10A durante la centrifugación.

35 La Figura 10D es una vista en sección transversal del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 10A después de la

centrifugación facilitando la separación en sus componentes y la activación del mecanismo de liberación de reactivo.

La Figura 11A es una vista en sección transversal de una realización alternativa de un dispositivo de recogida de sangre de la presente invención que tiene un miembro de separación de gel.

La Figura 11B es una vista en sección transversal amplificada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 11A antes de la centrifugación.

La Figura 11C es una vista en sección transversal del mecanismo de liberación del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 11A desde el plano M-M.

La Figura 11D es una vista en sección transversal del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 11A durante la centrifugación.

La Figura 11E es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo de la Figura 11A durante la centrifugación.

La Figura 11F es una vista en sección transversal del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 11A después de la centrifugación que facilita la separación en sus componentes y la activación del mecanismo de liberación de reactivo.

La Figura 12A es una vista en sección transversal de una realización alternativa del dispositivo de recogida de sangre de la presente invención que tiene un miembro de separación de gel.

La Figura 12B es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 12A antes de la centrifugación.

La Figura 12C es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 6A durante la centrifugación.

La Figura 12D es una vista de la sección transversal del dispositivo de la Figura 6A de recogida de sangre después de la centrifugación que facilita la separación en sus componentes y la activación del mecanismo de liberación de reactivo.

La Figura 12E es una vista de la sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de la Figura 12A de recogida de sangre después de la centrifugación.

La Figura 13A es una vista de la sección transversal de una realización alternativa del dispositivo de recogida de sangre de la presente invención que tiene un miembro de separación de gel.

La Figura 13B es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de la Figura 13A de recogida de sangre antes de la centrifugación.

5 La Figura 13C es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de la Figura 13A de recogida de sangre durante la centrifugación.

La Figura 13D es una vista en sección transversal del dispositivo de la Figura 13A de recogida de sangre después de centrifugación que facilita la separación dentro de sus componentes y la activación del mecanismo de liberación de reactivo.

10 La figura 13E es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 13A después de la centrifugación.

La Figura 14A es una vista en sección transversal de una realización alternativa de un dispositivo de recogida de sangre de la presente invención que tiene un miembro de separación de gel.

15 La Figura 14B es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 14A antes de la centrifugación.

20 La Figura 14C es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 14A durante la etapa inicial de centrifugación.

La Figura 14D es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de la Figura 14A de recogida de sangre durante la etapa final de centrifugación.

25 La Figura 14E es una vista en sección transversal del dispositivo de la Figura 14A de recogida de sangre después de la centrifugación que facilita la separación entre sus componentes y la activación del mecanismo de liberación de reactivo.

30 La Figura 15A es una vista en sección transversal de una realización alternativa de un dispositivo de recogida de sangre de la presente invención que tiene un miembro de separación de gel.

La Figura 15B es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de la Figura 15A de recogida de sangre antes de la centrifugación.

La Figura 15C es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de la Figura 15A de recogida de sangre durante la centrifugación.

5 La Figura 15D es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de la Figura 15A de recogida de sangre después de la centrifugación.

La Figura 15E es una vista en sección transversal del dispositivo de la Figura 15A de recogida de sangre después de la centrifugación que facilita la separación en sus componentes y la activación del reactivo del mecanismo de liberación.

10 La Figura 16A es una vista en sección transversal de una realización alternativa de un dispositivo de recogida de sangre de la presente invención que tiene un miembro de separación de gel.

La Figura 16B es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de la Figura 16A de recogida de sangre.

15 La Figura 16C es una vista en sección transversal del dispositivo de la Figura 16A de recogida de sangre que contiene la muestra completa durante la centrifugación.

20 La Figura 16D es una vista en sección transversal del dispositivo de la Figura 16A de recogida de sangre después de la centrifugación que facilita la separación entre sus componentes y la activación del mecanismo de liberación de reactivo.

La Figura 17A es una vista en sección transversal de una realización alternativa de un dispositivo de recogida de sangre de la presente invención que tiene un miembro de separación de gel.

25 La Figura 17B es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de recogida de sangre de la Figura 17A.

La Figura 17C es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo 17A de recogida de sangre durante la centrifugación.

30 La Figura 17D es una vista en sección transversal del dispositivo de la Figura 17A de recogida de sangre después de la centrifugación que facilita la separación en sus componentes y la activación del mecanismo de liberación de reactivo.

La Figura 18A es una vista en sección transversal de una realización alternativa de un dispositivo de recogida de sangre de la presente invención que tiene un miembro de separación de gel.

La Figura 18B es una vista en sección transversal del dispositivo de la Figura 18A de recogida de sangre después de la centrifugación que facilita la separación en sus componentes y la activación del mecanismo de liberación de reactivo.

5 La Figura 19A es una vista en sección transversal de una realización alternativa de un dispositivo de recogida de sangre de la presente invención que tiene un miembro de separación de gel.

La Figura 19B es una vista en sección transversal del dispositivo de la Figura 19A de recogida de sangre después de la centrifugación que facilita la separación entre sus componentes y la activación del mecanismo de liberación de reactivo.

10 La Figura 20A es una vista en sección transversal de una realización alternativa de un dispositivo de recogida de sangre de la presente invención que tiene un miembro de separación de gel.

La Figura 20B es una vista en sección transversal del dispositivo de la Figura 20 de recogida de sangre después de la centrifugación que facilita la separación de sus componentes y la activación del mecanismo de liberación de reactivo.

15 La Figura 20C es una vista en sección transversal del dispositivo de la Figura 20A de recogida de sangre después de la centrifugación, invertida a través de 180°, que facilita el mezclado del reactivo con el componente discreto deseado.

La Figura 20D es una vista en sección transversal de una realización alternativa del dispositivo de la Figura 20A de recogida de sangre que tiene un miembro de separación de gel.

La Figura 21A es una vista en sección transversal de una realización alternativa de un dispositivo de recogida de sangre de la presente invención que tiene un miembro de separación de gel.

25 La Figura 21B es una vista en sección transversal del dispositivo de la Figura 21A de recogida de sangre después de la centrifugación que facilita la separación en sus componentes y la activación del mecanismo de liberación del reactivo.

La Figura 22A es una vista en sección transversal de una realización alternativa de un dispositivo de recogida de sangre de la presente invención que tiene un miembro de separación de gel.

La Figura 22B es una vista en sección transversal ampliada del mecanismo de liberación de reactivo del dispositivo de la Figura 22A de recogida de sangre.

35 La Figura 22C es una vista en sección transversal del dispositivo de la Figura 22A de recogida de sangre después de la centrifugación que facilita la separación en sus componentes y la activación del mecanismo de liberación de reactivo.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

En particular aunque la invención ha sido descrita con respecto al reactivo que es un agente de estabilización del ácido nucleico, otros reactivos son posibles, tales reactivos capaces de proporcionar una diversidad de funciones distintas, o en adición a, la estabilización. Una de tales alternativas es un reactivo de estabilización de proteínas.

Aunque es posible usar la presente invención con cualquier muestra biológica que contenga ácidos nucleicos, preferiblemente la muestra biológica es cualquier cuerpo fluido extraído de un paciente. Con la máxima preferencia, la muestra biológica es sangre entera o un componente de la misma. Ejemplos de otras muestras biológicas incluyen plasmas, sueros, orina, aspiraciones de médula ósea, fluido espinal cerebral, tejidos, células, heces, saliva y secreciones orales, secreciones nasales, lavado bronquial, fluidos cervicales, fluido linfático y similares.

Haciendo referencia a los dibujos en los que caracteres de referencia similares se refieren a partes similares a través de las diversas vistas de los mismos, la Figura 1, que no está de acuerdo con la invención, represente una realización de la invención, que generalmente comprende un recipiente 10 de recogida de la muestra que tiene un miembro 12 de separación (por ejemplo, un elemento de separación mecánico o un gel) para separar componentes de la sangre y un agente 14 de estabilización para estabilizar la muestra biológica. Miembros separados se conocen en la técnica, como se examina con más detalle más adelante, y son proporcionados con una densidad intermedia entre las densidades de los componentes que están separados. Tras la centrifugación, las relaciones de densidad originan que el miembro que se separa se mueva entre los componentes. En la realización ilustrada, el recipiente 10 comprende un tubo hueco que define un depósito o cámara interna 16 que tiene una pared lateral 17 que se extiende desde un extremo 18 de fondo abierto hasta un extremo 20 superior abierto. El miembro 12 de separación se proporciona dentro de la cámara 16 del recipiente, y el agente 14 de estabilización se proporciona dentro de la cámara 16 debajo del miembro 12 de separación hacia el extremo inferior 18. El miembro 12 de separación sirve para ayudar en la separación de componentes de la muestra, por ejemplo, mediante centrifugación. El recipiente 10 está dimensionado para que almacene un volumen adecuado de fluido biológico, preferiblemente sangre. Unos medios 22 de cierre son proporcionados para cubrir ambos extremos 18, 20 para cerrar el recipiente. Para vaciar los tubos de recogida, se emplea generalmente un

tapón elastómero de ajuste apretado para contener el vacío durante los periodos de almacenamiento requeridos. Preferiblemente, el cierre 22 forma una obturación capaz de cerrar eficazmente el recipiente 10 y mantener una muestra biológica en la cámara 16. La presión en la cámara 16 es seleccionada preferiblemente para introducir un volumen predeterminado de muestra biológica dentro de la cámara 16. Preferiblemente, el cierre 22 es de un material elástico que es capaz de mantener la presión interna diferencial entre la presión atmosférica y una presión menor que la atmosférica. El cierre 22 es tal que puede ser perforado con una aguja 26 u otra cánula para introducir una muestra biológica dentro del recipiente 10 como se sabe en la técnica. Preferiblemente, el cierre 22 puede ser cerrado de nuevo. Materiales adecuados para el cierre 22 incluyen, por ejemplo, caucho de silicona, caucho natural, caucho de butadieno estireno, copolímeros de etileno- propileno y policloroprenos.

Los métodos de la presente invención incluyen la obtención de una muestra biológica y la introducción de la muestra dentro del recipiente 10. Diversos dispositivos para pinchar en las venas han sido desarrollados para facilitar la obtención de una muestra biológica, un tipo de estos dispositivos incorpora un montaje de aguja que tiene un alojamiento que define una cámara en su interior, en la que una cánula única con una muesca o dos cánulas separadas que tienen punta en ambos extremos, están adheridas al alojamiento. El extremo intravenoso (IV) de la cánula está adaptado para la penetración en una vena de paciente, y el extremo de no paciente de la cánula tiene un manguito obturable y adaptado para atravesar una detención penetrable posicionada dentro de un recipiente evacuado. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 2, (no de acuerdo con la invención), una muestra 28 específica de sangre puede ser transferida dentro del recipiente 10 a través del extremo superior 20, y el espécimen es mantenido inicialmente dentro de la cámara 16 y la muestra es mantenida inicialmente dentro de la cámara 16 por encima del miembro 12 de separación, pues el miembro 12 de separación obtura la muestra desde el extremo inferior 18 e impide que la muestra haga contacto con el agente 14 de estabilización. Después de la recogida, la muestra de sangre es separada en plasma y otros componentes celulares, o en suero y células rojas de la sangre, tal como haciendo girar el recipiente 10 en una centrífuga. En una realización preferida, el recipiente se coloca dentro de una centrífuga con el extremo inferior 18 enfrentado hacia arriba, y el tubo es centrifugado. Tras la centrifugación el miembro 12 de separación se alarga permitiendo la circulación a su alrededor. Debido a la mayor densidad de los componentes celulares de la sangre, estos componentes se mueven hacia abajo

alrededor del separador, mientras el separador se mueve hacia arriba debido a su densidad relativa. Tras el cese de la centrifugación, el separador forma una obturación entre los componentes de modo que el plasma o suero es adyacente al agente de estabilización. De esta manera, el agente es aislado sustancialmente de los componentes celulares de la sangre por medio del procedimiento, como se examina con más detalle más adelante, Haciendo referencia a la Figura 3, (no de acuerdo con la invención) después de la centrifugación, el componente celular de la sangre permanece debajo del miembro 12 de separación y el plasma o suero permanece encima del miembro 12 de separación en contacto con el agente 14 de estabilización. Tras la separación, el plasma o suero 32 es mezclado entonces típicamente con el agente 14 de estabilización, de modo que invirtiendo el recipiente 10 de modo que el agente de estabilización se disuelva en, o interaccione de otra manera con, el fluido de plasma o suero y la degradación de los ácidos nucleicos (u otros elementos) contenidos en el mismo sea minimizada.

En realizaciones preferidas, el agente de estabilización se mezcla con el plasma o suero pronto después de ser obtenida la muestra y antes del almacenamiento o transferencia. Se ha hallado que recogiendo la muestra biológica directamente del paciente, como cuando se recoge una muestra de sangre completa, y separando inmediatamente el plasma o suero del componente celular de la sangre e introduciendo entonces al agente de estabilización dentro del plasma reduce sustancialmente, o puede incluso impedir, la degradación y/o fragmentación de los ácidos nucleicos que de otra manera se produce cuando la muestra es almacenada o transferida sin combinarla con un agente de estabilización. Afortunadamente, una vez que el agente de estabilización es introducido dentro del plasma, no hay necesidad de almacenar o transferir la muestra sometida a condiciones de refrigeración.

En la realización mostrada en la Figura 1 el recipiente 10 de recogida de la muestra comprende un tubo de doble fondo adecuado para la separación de plasma. El recipiente 10 puede ser cualquier dispositivo de recogida adecuado para plasma sanguíneo o preparación de suero. Ejemplos adecuados del recipiente 10 incluyen tubos de extremos cerrados, tubos de pared única, y tubos multicapa. Un ejemplo de un recipiente 10 adecuado se describe en la Patente U.S. N° 3.919.085 a Ayres.

El recipiente 10 puede fabricarse de vidrio, plástico u otros materiales adecuados. Algunos materiales preferidos usados para fabricar el recipiente de recogida incluyen el polipropileno, polietileno, polietileno tereftalato, poliestireno, policarbonato y compuestos celulósicos. Plásticos más caros tales como el

politetrafluoretileno y otros polímeros fluorados pueden ser usados también. En adición a los materiales mencionados anteriormente, ejemplos de otros materiales adecuados incluyen poliolefinas, poliamidas, poliésteres, siliconas, poliuretanos, epoxidicos, acrílicos, poliacrilatos, polisulfonas, polimetacrilatos, PEEK, polimidas y fluoropolímeros tales como Teflón®, FEP Teflón®, Tefzel®, poli(fluoruro de vinilideno), PVDF y resinas perfluoroelcoxídicas. Productos de vidrio que incluyan vidrio de sílice pueden ser usados también para fabricar los dispositivos de recogida. A modo de ejemplo un producto de vidrio es PYREX® (disponible de Corning Glass, Corning, New York). Los dispositivos de recogida cerámicos pueden ser usados de acuerdo con realizaciones de la invención. Productos celulósicos tales como recipientes de papel y papel reforzado se usan también para configurar dispositivos de recogida según la invención.

En una realización el reactivo de la invención es cualquier ácido nucleico adecuado que estabilice el reactivo que sea capaz de inhibir la destrucción de ácidos nucleicos durante el almacenamiento o transferir muestras biológicas. Estos reactivos incluyen sales que precipitan el ácido nucleico junto con las proteínas celulares. En la mayoría de estos casos estas sales tienden a ser agentes deshidratantes. El reactivo estabiliza el plasma o muestra de suero para producir una composición estable que inhiba o impida la degradación y/o la fragmentación de ácidos nucleicos. Una diversidad de agentes de estabilización del ácido nucleico conocidos en la técnica puede ser usada. Ejemplos adecuados incluyen sales sulfatadas como el sulfato amónico, bisulfato amónico, sulfato de cesio, sulfato de cadmio, sulfato de cesio y hierro(II), sulfato de cobalto (I), sulfato de cobre (II), sulfato de litio, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, sulfato de potasio, sulfato sódico, y sulfato de Zinc. Al menos un agente de estabilización adecuado es comercialmente disponible bajo el nombre comercial RN-Alater™ de Ambion, Inc. Como se ha observado anteriormente, otros reactivos que efectúan cualquier acción deseada son posibles también, donde se desea evitar el contacto entre los componentes celulares y el reactivo. Uno de tales reactivos posibles es un estabilizador de proteínas.

Como se ha indicado anteriormente, son también posibles otros reactivos que ejecutan cualquier acción deseada, donde se desea evitar el contacto entre los componentes celulares y el reactivo. Por ejemplo, donde un reactivo hace daño a las células en la totalidad de la sangre, es aconsejable mantener el reactivo fuera de la muestra de sangre completa hasta que el suero o plasma ha sido separado.

El reactivo puede estar en cualquier forma adecuada incluyendo, pero sin limitarse a, una solución, suspensión u otra forma líquida, una pastilla, una tableta, una

cápsula, un material pulverizado seco, un material congelado seco, un polvo, una partícula, un gel, cristales o material liofilizado. El reactivo puede estar encapsulado para impedir interacciones no deseadas entre el reactivo y otros elementos en el recipiente, tal como un separador de geles. Materiales encapsulados que se disuelven tras la recogida de la muestra son bien conocidos en la técnica. Además, el agente de estabilización puede estar mezclado con otros excipientes para mejorar su dispersión/solubilidad en el fluido biológico y/o para mejorar su estabilidad durante la fabricación y posterior manipulación/transporte del producto acabado. Por ejemplo, algunos de tales materiales incluyen el polivinilpirolidona (PVP), celulosas microcristalinas tales como AVICEL y similares. En la realización reflejada en la Figura 1, es útil tener el reactivo en forma sólida, tal como una tableta, con la tableta colocada adyacente al extremo inferior 18 del recipiente 10.

Es posible para el dispositivo de recogida ser precargado con el agente de estabilización preferiblemente por el fabricante, y empaquetado en una forma preparada para ser usada. Típicamente, el dispositivo de recogida del empaquetado es estéril y está empaquetado también en materiales de empaquetado estériles. El reactivo es preferiblemente precargado dentro del recipiente y situado remotamente del punto de entrada de la sangre completa u otra muestra biológica, y el miembro de separación está interpuesto entre ambos de modo que impide el contacto con la totalidad o la sangre no separada. Por ejemplo, en esta primera realización, como se ve en la Figura 2, el agente 4 de estabilización está posicionado debajo del miembro 12 de separación y opuesto de la entrada de la totalidad de la sangre 30 u otra muestra biológica.

Proporcionar un miembro de separación en los tubos de plasma o suero y evitar que el agente de estabilización haga contacto con la totalidad de la sangre es particularmente ventajoso. Concretamente, cuando la totalidad de la sangre contacta un agente de estabilización, muchos agentes tienden a originar la destrucción de células. Tal destrucción libera todos los componentes celulares normalmente mantenidos dentro de la célula y por consiguiente tienen un efecto adverso en la obtención de la cantidad o tipo deseado de ácidos nucleicos (DNA, RNA, vRNA, etc.) El miembro 12 de separación permite ventajosamente que el agente de estabilización contacte selectivamente o interaccione con solamente el plasma o suero componentes de la muestra de sangre, mientras impide que el agente de estabilización contacte o interaccione con el componente celular de la muestra de sangre. Una vez que el agente de estabilización y el plasma están mezclados, los ácidos nucleicos en el

plasma o suero están estabilizados y no hay necesidad de almacenar o transportar la muestra en condiciones refrigeradas.

El agente de estabilización puede ser cargado en el dispositivo de recogida de esta realización mediante un cierto número de métodos. Un método a modo de ejemplo puede ser acuñar una tableta de agente estabilizador dentro del dispositivo de modo que esta no se mueva sometida a la fuerza centrífuga. Otro método puede implicar el revestimiento del agente de estabilización sobre un portador, que a su vez está acuñado en el dispositivo. Métodos adicionales para proporcionar el dispositivo de recogida dentro del agente de estabilización son también posibles. La cantidad y el emplazamiento del agente de estabilización son determinados mediante diversas variables, que incluyen el modo de aplicación, el agente de estabilización específico usado, el volumen interno y la presión interna del dispositivo de recogida, y el volumen de la muestra biológica introducida en el recipiente.

Haciendo referencia de nuevo a la Figura 1, es posible comprimir un dispositivo de separación mecánico para separar el miembro 12. El dispositivo separador mecánico aísla convenientemente el plasma/suero de las células/coágulos de la muestra de sangre en el recipiente 10 funcionando como un dispositivo de separación flotante. Separadores mecánicos útiles se hallan, por ejemplo, en las Patentes Núms. 6.516.953; 6.406.671; 6.409.528; y 6.497.325. Durante la recogida, el separador mecánico proporciona una obturación física entre dos secciones dentro del depósito, impidiendo de ese modo que la totalidad de la sangre interaccione con el agente de estabilización. Durante la centrifugación, las fuerzas centrífugas originan el alargamiento del miembro de separación y de ese modo reducen el diámetro exterior de la porción de obturación del separador y esto permite el movimiento del separador a un lugar (basado en la densidad) entre el plasma o suero y los otros componentes, y la circulación asociada de componentes de la sangre alrededor del exterior de del separador. Tras el cese de la centrifugación, el separador vuelve a obturar de nuevo contra las paredes de tubo interiores, separando de ese modo los componentes de la sangre.

Haciendo referencia a la Figura 4,(no está de acuerdo con la invención) se muestra una realización alternativa en la que el miembro de separación comprende un gel 34. El gel tiene convenientemente una formulación de gel polímero tixotrópico. El gel puede ser un homopolímero o un copolímero y puede incluir geles basados en la silicona tales como, por ejemplo, polisiloxanos, o geles basados en hidrocarburos orgánicos tales como, por ejemplo, poliacrílicos, poliésteres, poliolefinas,

polibutadienos cis oxidados, polibutenos, mezclas de aceite de soja epoxidizado e hidrocarburos clorados, copolímeros de diácidos y propandiones, ciclopentadienos hidrogenados y copolímeros de alfaolefinas con dialquilmaleatos. El gel aísla convenientemente el plasma/suero de las células/coágulos de la muestra de sangre en el tubo sirviendo como un medio de separación de densidades como se conoce en la técnica. Un ejemplo de tubo de preparación de plasma de terminación única que utiliza el gel se describe en la Patente U.S. Nº 5.906.744 de Carroll y otros. En este caso de un material de separación de geles, puede ser conveniente proporcionar también una separación física o química entre el agente de estabilización y el gel. Por ejemplo, si porciones del agente están incorporadas dentro o reaccionan con el gel, la efectividad del agente de estabilización puede ser reducida. Como se muestra en la Figura 4, una barrera de partición 36 que es soluble por el plasma puede ser usada para separar el agente 14 de estabilización del gel 34. Una cápsula como se ha expuesto anteriormente, puede ser usada alternativamente para proporcionar una barrera química entre el estabilizador y el gel. Durante la recogida del separador del gel junto con la partición de la barrera se proporciona una obturación física entre dos secciones dentro del depósito, impidiendo de ese modo que la totalidad de la sangre interactúe con el agente de estabilización. Otros miembros de separación, por ejemplo filtros o elementos de separación manuales, son conocidos en la técnica y pueden ser también adecuados en la invención.

Generalmente, el miembro de separación divide el depósito en primera y segunda secciones, y una de las primera y segunda secciones comprende el reactivo. La otra sección (es decir, la que no comprende el reactivo) puede comprender otro agente, por ejemplo, para la inhibición de grumos o activación de grumos. El agente de activación de grumos puede estar basado en el dióxido de silicio. Alternativamente, el agente de activación de grumos puede ser caolín o trombina. El agente de inhibición de grumos puede incluir hirudines, derivados del hirudín, agentes quelantes, o derivados de los agentes quelantes. Los agentes de inhibición de grumos específicos incluyen citratos, ácido etilendiaminotetracético, heparina, CPAD, CTAD, CPDA-1, CP2D, oxalato potásico, fluoruro sódico, o ACD.

Las Figuras 5 a 15 muestran diversas realizaciones de la invención que implican un tubo que tenga un extremo superior abierto y un extremo inferior cerrado. En tales realizaciones, la sangre es típicamente conducida dentro del mismo extremo desde el cual la muestra de plasma o suero tratada ha de ser recuperada. Esto requiere situar el reactivo en o cerca del extremo abierto, y usar un mecanismo de

liberación de reactivo (ventajosamente un mecanismo de liberación de reactivo pasivo) para poner el reactivo en contacto con la porción deseada de la muestra de sangre. El mecanismo de liberación de reactivo mantiene por tanto el reactivo evitando que entre en contacto con la muestra de sangre completa durante la recogida y separación de la sangre, pero permite que el reactivo se mezcle con los componentes deseados de la muestra separada (por ejemplo posteriormente centrifugada). Un mecanismo de liberación de reactivo pasivo será activado mediante el procedimiento de separación como opuesto a un mecanismo de liberación de reactivo activado manualmente, que requiera una operación manual extra (tal como retorcer un cierre o botón de presión) con objeto de poner el reactivo en contacto dentro con la muestra de plasma o suero.

Las Figuras 5A, B, C y D muestran un tubo 100 que tiene un extremo superior abierto y un extremo inferior cerrado que contiene un miembro 101 de separación del gel. Las Figuras 5A y 5B muestran el reactivo 108 está contenido dentro de una taza 104, que obtura contra el cierre 102 de tubo. Un resorte 105 precomprimido está situado entre la taza 104 y el tubo 106 de llenado y está mantenido en estado por la presencia del cierre 102. La taza se obtura usando una brida 109 sobre el tubo 106 de llenado. La muestra de sangre completa se introduce dentro del tubo 100 a través del cierre 102 y a través del tubo 106 de llenado. La Figura 5C muestra que durante la centrifugación el montaje 111 de reactivo completo se lanza desde el cierre en la dirección Y y flota sobre la superficie del plasma/sangre 107. No obstante, la taza 104 de reactivo permanece obturada usando una flotabilidad diferencial o mediante la selección de un resorte que permanece parcialmente enrollado durante la centrifugación. La Figura 5D muestra que después de terminar la centrifugación, el resorte 105 eleva la taza 104 de reactivo en la dirección X, permitiendo de ese modo que el reactivo 108 entre y se mezcle con el plasma separado 112 (se ha de tener en cuenta que 112 puede representar también el plasma separado y el reactivo mezclados juntos como se ve claramente en las Figuras 5D, 6D, 8F).

Las Figuras 6A a E muestran un tubo 100 que tiene un extremo superior abierto y un extremo inferior cerrado que contiene un miembro 101 de separación del gel. Las Figuras 6A y 6B muestran el reactivo 108 contenido dentro de una taza telescópica 120, suspendida desde el lado inferior del cierre 121 de tubo antes de la centrifugación. La Figura 6C muestra que la sección superior o cubierta 122 de deslizamiento de la taza de reactivo es conducida hacia abajo en la dirección Z durante la centrifugación, superando la fuerza ejercida por el resorte 123 de compresión. Las Figuras 6D y 6E muestran que cuando la centrifugación es completa,

el rozamiento entre las dos secciones 120 y 122 de taza permite que el resorte 123 eleve ambas secciones de la taza 120 y 122 en la dirección A, abriendo de ese modo una trayectoria para que el reactivo 108 escape y se mezcle con el plasma separado 112.

5 Las Figuras 7A a F muestran un tubo 100 que tiene un extremo superior abierto y un extremo inferior cerrado que contiene un miembro 101 de separación de gel. Las Figuras 7A y B muestran el reactivo 141 contenido dentro de una taza 140 aplicada con el cierre 142 de tubo y obturada contra el tubo 143 de llenado. Un tubo 144 de acceso está situado dentro del tubo lleno 143 y está cargado por el resorte 145 en una  
10 posición nominal en la que ventanas complementarias en el llenado 147 y tubos 148 de acceso están alineados. La Figura 7C muestra que durante la centrifugación, el tubo 144 de acceso es forzado hacia abajo en la dirección X contra el resorte 145 de compresión, ocluyendo de ese modo las ventanas. La Figura 7D muestra entonces que en este punto durante la centrifugación la taza 140 de reactivo es lanzada en la  
15 dirección de Y desde el cierre 142 del tubo y se posiciona ella misma en la ventana 147 en el tubo lleno. Las Figuras 7E y 7F muestran que después de la centrifugación el tubo 144 de acceso es devuelto a su estado nominal por el resorte 145 de compresión, realineando las ventanas 147 y 148 y permitiendo que el reactivo 141 salga dentro del plasma separado 112.

20 Las Figuras 8A a F muestran un tubo 100 que tiene un extremo superior abierto y un extremo inferior cerrado que contienen un miembro 101 de separación de gel. Las Figuras 8A y 8B muestran el reactivo 151 contenido dentro de una bola hueca 152. Dentro de la bola hueca 152 hay un peso 153 de balasto, que está cargado hacia el cierre del tubo por un resorte ligero 154. La Figura 8C muestra que durante la  
25 centrifugación la bola hueca 152 se libera del cierre 155, como un resultado del peso 153 de balasto que es arrastrado hacia al fondo de la bola 152 en dirección X y flota sobre la superficie del plasma/sangre 156 como un resultado de la flotabilidad de la bola hueca 152. Siendo el centro de gravedad desplazado hacia el fondo de la bola hueca 152 por el peso 153 de balasto que se mueve haciendo que la bola 152 flote de  
30 modo estable con el orificio 157 de acceso de reactivo encima de la superficie 156 de fluido. Después de la centrifugación, la Figura 8D muestra que el peso 153 de balasto se elevará de nuevo en la dirección Y como un resultado del resorte 154 en su lugar de descanso original, por encima del centro de flotabilidad. Esto originará que la bola hueca 152 se haga inestable y rueda en la dirección Z como se muestra en las Figuras  
35 8E y F, liberando reactivo 151 dentro del plasma separado 112.

Las FIGS 9A a D muestran un tubo 100 que tiene un extremo superior abierto y un extremo inferior cerrado y que contiene un miembro 101 de separación del gel. Las FIGS 9A y B muestran el reactivo 161 alojado bajo un capuchón 162 con dedos 163 elásticos integrales 163 antes de la centrifugación. El alojamiento de reactivo está montado sobre una placa 164 de soporte que a su vez es soportada por nervios internos 165 dentro del medio fondo del tubo. Los dedos elásticos 163 son mantenidos en una posición de bloqueo por el anillo 166 de bloqueo, La Figura 9C muestra que durante la centrifugación el anillo 166 de bloqueo se mueve en la dirección X, deslizándose fuera de los dedos elásticos 163, permitiéndoles abrir, libremente el capuchón 161 de reactivo. No obstante, el reactivo 161 permanece aislado pues las fuerzas gravitatorias actúan todavía sobre el capuchón 161 impidiendo su liberación mientras está bajo la centrifugación. La FIG 9D muestra que después de la centrifugación la reducción de las fuerzas gravitatorias permite que el resorte interno 167 expulse el capuchón 162 del reactivo en la dirección Y, permitiendo que el reactivo 161 se mezcla con el plasma separado 112.

Las FIGS 10A a D muestran un tubo 100 que tiene un extremo superior abierto y un extremo inferior cerrado que contiene un miembro 101 de separación del gel. Las Figuras 10A y B muestran la realización antes de la centrifugación, estando el reactivo 171 contenido dentro de una cápsula 172 de dos piezas. La cápsula 172 está compuesta de la tapa 173 y el alojamiento inferior 174, la tapa 173 tiene dos dientes 175 que aplican un perfil 176 de leva sobre el alojamiento inferior 174. La Figura 10C muestra que durante la centrifugación la cápsula 172 se hunde en la dirección X a través de la muestra hasta que contacta los nervios 177 de soporte sobre la superficie inferior del tubo, en cuyo momento el alojamiento inferior 174 deja de moverse. No obstante, la tapa 173 continúa avanzando, siguiendo el perfil 176 de leva helicoidal retorciéndose en la dirección Z en su progreso. La Figura 10D muestra que después de la centrifugación, los dientes 175 sobre la tapa 173 están ahora situados en trayectorias 178 de salida en el alojamiento inferior 174. Un resorte 179 expulsa entonces la tapa 173 y el reactivo 171 dentro del plasma separado 112.

Las Figuras 11A a F muestran un tubo 100 que tiene un extremo superior abierto y un extremo inferior cerrado que contienen un miembro 101 de separación del gel. Las Figuras 11A, B y C muestran la realización antes de la centrifugación, el reactivo 181 contenido dentro de un montaje 182 de cámara obturada que consta de una taza 184, una almohadilla 185 de obturación y una cubierta 186 que se forma encajando por salto elástico dos tazas de plástico juntas. Dos dedos 183 se extienden

desde las características 189 de cierre elástico fuera del lado inferior de la cámara. Los nervios 188 integrales sobre la superficie interior del tubo soportan un anillo 187 de levas estático. Bajo la centrifugación, las Figuras 11D y E muestran como el montaje 182 de cámara obturado mueve hacia abajo el tubo, hasta que el montaje 182 es forzado dentro del anillo 187 de levas estático, que entonces desvía los dos dedos 183, liberando de ese modo los cierres elásticos 189 sobre el montaje 182 de cámara. Cuando la centrifugación es completa, la Figura 11F muestra que un pequeño resorte 190 dentro del montaje de cámara expulsa la tableta 181 de reactivo, la cubierta 186 de la cámara y la almohadilla 185 de obturación dentro del plasma separado 112.

10 Las Figuras 12A a E muestran un tubo 100 que tiene un extremo superior abierto y un extremo inferior cerrado que contiene un miembro 101 separador del gel. Las Figuras 12A y B muestran la realización antes de la centrifugación, el reactivo 201 contenido dentro de una montaje 202 de cámara obturada, que está compuesto de una taza 203 de reactivo, una obturación 204, un portador 205 y una arandela 15 elastómera 206. La taza 203 de reactivo está cargada por el resorte 207 para ser elevada libre del portador 205, pero es retenida por una forma de alambre o resortes 210 de hoja. Sometida a centrifugación, la Figura 12C muestra como la taza 203 de reactivo es forzada hacia abajo en la dirección R contra la arandela elastómera 206, liberando de ese modo los resortes 210 de hoja y permitiéndoles contraerse a sus 20 posiciones nominales. Cuando la centrifugación ha terminado, las Figuras 12D y E muestran que el resorte 207 dentro del montaje 202 de cámara eleva la taza 203 de reactivo, permitiendo que el reactivo 201 pase fuera a través del centro de la arandela elastómera 206 y dentro del plasma separado 112.

Las Figuras 13A a E muestran un tubo 100 que tiene un extremo superior 25 abierto y un extremo inferior cerrado que contiene un miembro 101 de separación del gel. Las Figuras 13A y B muestran la realización antes de la centrifugación, el reactivo 221 en forma nodulizada alojado dentro de un montaje 222 de cámara anular, ligado por dos cilindros de plástico, el cilindro exterior 223 y el tubo 224 que lo atraviesa, con una arandela 225 elastómera adherida a ambos y que encierra la parte superior de la 30 cámara y una arandela 227 de "belville" (en forma de resorte) adherida al fondo del cilindro exterior 223 y adherida al tubo pasante 224. La Figura 13C muestra como el montaje 222 de cámara anular está soportado a lo largo de su circunferencia de cilindro exterior por los nervios 226 sobre la superficie interior del tubo. Durante la centrifugación, la masa del tubo 224 pasante fuerza la arandela 227 de "belville" a 35 invertir permanentemente en la dirección P. Esto origina que la arandela elastómera

225 se estire. Las Figuras 13D y E muestran que la arandela elastómera 225 proporciona entonces una fuerza elástica Q de restauración en el tubo pasante 224 que la atraviesa cuando la centrifugación es completa abriendo una trayectoria para el reactivo 221 para que entre el plasma.

5 Las Figuras 14A a E muestran un tubo 100 que tiene un extremo superior abierto y un extremo inferior cerrado que contiene un miembro 101 de separación del gel. Las Figuras 14A y B muestran la realización antes de la centrifugación, el reactivo 231 está alojado dentro de una taza invertida 232, que está obturada en el extremo abierto inferior por una placa 233 que la cubre y la obturación 234, y fijada a una placa 10 237 de soporte en la parte superior por medio de una articulación 238. Hay un peso 235 de balasto fijado a un lado de la taza 232 y un resorte 236 de hoja plástica moldeado integralmente está situado sobre el lado opuesto. La Figura 14C muestra como durante la configuración, el peso 235 de balasto excéntrico hace que la taza 232 gire alrededor de la articulación viva 238 hasta que contacta con la pared interior del tubo 100 comprimiendo el resorte 236 de hoja. La placa 233 de la cubierta es lanzada por las fuerzas gravitatorias incrementadas de centrifugación y la tableta 231 de reactivo se desliza hacia abajo. La Figura 14D muestra como la tableta 231 de reactivo tiene impedida su salida completa de la taza debido al contacto con la pared de tubo. La Figura 14E muestra que cuando la centrifugación ha terminado el resorte de hoja 15 devuelve la taza a su posición nominal, permitiendo que la tableta 231 de reactivo entre en el plasma 112 separado.

Las Figuras 15A a E muestran un tubo 100 que tiene un extremo superior abierto y un extremo inferior cerrado que contiene un miembro 101 de separación del gel. Las Figuras 15A y B muestran la realización antes de la centrifugación, la tableta 25 241 de reactivo está contenida dentro del montaje 242 de cámara, que está compuesto de de una taza invertida 246, una cubierta 243 y una almohadilla 244 de obturación, y fijada a una placa 245 de soporte en el extremo superior y es mantenida en su lugar por una forma de resorte. La cubierta 243 retiene a los brazos elásticos 247 y obtura 244 a la placa 245 de soporte. La Figura 15C muestra como bajo la 30 centrifugación, los brazos elásticos 247 se deforman en la dirección de P, por lo que la cubierta 243 se desprende de la taza invertida 246 y migra a la capa 101 del gel, no obstante la tableta 241 tiene completamente impedida la salida de la taza debido al contacto con los brazos elásticos 247 que permanecen en su posición desviada como un resultado de las fuerzas gravitatorias incrementadas. Las Figuras 15D y 15E 35 muestran que cuando la centrifugación ha terminado los brazos elásticos 247 se abren

en la dirección Y, permitiendo que la tableta 241 de reactivo entre en el plasma separado 112.

Las Figuras 16A a D muestran un tubo 100 que tiene un extremo superior abierto y un extremo inferior cerrado que contiene un miembro 101 de separación del gel. Las Figuras 16A y B muestran la realización antes de la centrifugación, la tableta 251 de reactivo está alojada dentro de un montaje 252 de tubo elastómero, que está compuesto de un tubo elastómero 253, suspendido de una placa 254 de soporte perforada, hay también un peso 255 de balasto así como una cubierta protectora 256 que está fijada al fondo del tubo elastómero 253. La Figura 16C muestra como bajo la centrifugación, el peso 255 de balasto origina que el tubo elastómero 253 se estire en la dirección de P, reduciendo de ese modo su diámetro y apresando radialmente la tableta 251 de reactivo. Esto origina que la cubierta protectora 256 se desprenda del tubo elastómero 253 y migre a la capa 101 de gel, no obstante la tableta 251 de reactivo tiene completamente impedida la salida del tubo elastómero 253 debido a las fuerzas que radialmente la sujetan, que existen como un resultado de las fuerzas gravitatorias incrementadas. La Figura 16D muestra que cuando la centrifugación es completa el tubo elastómero 253 vuelve a su estado inicial reduciendo de ese modo las fuerzas de sujeción radiales y liberando la tableta 251 de reactivo dentro del plasma separado 112.

Las Figuras 17A a D muestran un tubo 100 que tiene un extremo superior abierto y un extremo inferior cerrado que contiene un miembro 101 de separación del gel. Las Figuras 17A y B muestran la realización antes de la centrifugación, la tableta 261 de reactivo está contenida dentro de una taza invertida que está obturada en su cara inferior por una placa 263 con un anillo 264 de obturación alrededor de la periferia. La placa 263 es mantenida en su lugar mediante detenciones 265 sobre la taza invertida 262. La Figura 17C muestra como durante la centrifugación, la taza invertida 262 se hace descender a lo largo del tubo 100 hasta que contacta con las nervaduras 267 de soporte dentro del tubo 100. Las fuerzas gravitatorias incrementadas hacen que la placa 263 continúe desplazándose a lo largo del tubo, liberando este de las detenciones 265 pero impidiendo la expulsión de de la taza invertida 262. La Figura 14D muestra que cuando la centrifugación es completa las fuerzas gravitatorias permiten que la taza invertida 2262 y la tableta 261 de reactivo sean expulsadas de la placa y dentro del plasma separado 112 por un pequeño resorte 268 de compresión.

Las Figuras 18A y B muestran un tubo 100 que tiene un extremo superior abierto y un extremo inferior cerrado que contiene un miembro de separación del gel. La Figura 18A muestra la realización antes de la centrifugación, la tableta 271 de reactivo, está contenida dentro de una taza 272 de reactivo y está adherida al diámetro interior del tubo 100 adyacente al extremo abierto del tubo y/o a la cara inferior del cierre 273 de tubo. La Figura 18B muestra como durante la centrifugación, la taza 272 de reactivo migra hacia abajo en el tubo 100 en la dirección de P hasta el fondo del tubo 100 y se sitúa debajo de la capa 101 del gel mientras que la tableta 271 de reactivo permanece adherida al diámetro interior del tubo 100 adyacente al extremo abierto del tubo y/o, a la cara inferior del cierre 273 de tubo. El reactivo 271 expuesto es mezclado entonces con el plasma separado 112 mediante una simple inversión del tubo.

Las Figuras 19A y B muestran un tubo 100 que tiene un extremo superior abierto y un extremo inferior cerrado que contiene un miembro de separación del gel. La Figura 19A muestra la realización antes de la centrifugación, la tableta 281 de reactivo y una cabeza 282 de flecha de plástico están contenidas dentro de una cápsula 283, que está en un lugar fijado dentro del tubo 100. Un tabique 285 para el acceso a la muestra de centrifugación posterior está situado en la parte superior mientras una barrera 284 de lámina obtura la base de la cápsula 283. La Figura 19b muestra como durante la centrifugación, cabeza 282 de flecha de plástico perfora la barrera 284 de lámina que migra hacia abajo hasta el fondo del tubo 100 y llega a situarse debajo de la capa 101 de gel, la tableta 281 de reactivo cae entonces parcialmente fuera de la cápsula 283 y es retenida encima del nivel 287 de fluido de plasma por tres dedos 286 de retención que son enterizos con la cápsula 283 y sobresalen debajo de la barrera 284 de lámina. La tableta 281 de reactivo expuesta es mezclada entonces con el plasma separado 12 mediante una simple inversión del tubo 100.

Las Figuras 20A a D muestran un tubo 100 que tiene un extremo superior abierto y un extremo inferior cerrado que contiene un miembro 101 de separación del gel. La Figura 20A muestra la realización antes de la centrifugación, el reactivo 291 está contenido dentro de una taza 292 de reactivo, que casa con y está obturada por el lado inferior del cerramiento 293 del tubo. La Figura 20B muestra como durante la centrifugación, la taza 292 de reactivo es lanzada desde el recinto 293 del tubo y flota sobre la superficie del plasma 112. La Figura 20C muestra que cuando la centrifugación es completa, una inversión del tubo 100 origina que la taza 292 de

reactivo flote hacia la capa 101 de gel, vaciando el reactivo 291 dentro del plasma separado 112. La Figura 20D muestra una realización alternativa del diseño de la taza 295 de reactivo, antes de la centrifugación.

5 Las Figuras 21A y B muestran un tubo 100 que tiene un extremo superior abierto y un extremo inferior cerrado que contiene un miembro 101 de separación del gel. La Figura 21A muestra la realización antes de la centrifugación, el reactivo 301 está contenido dentro de una taza 302 de reactivo, que está obturada por el lado inferior del recinto 303 de tubo. La Figura 21B muestra como durante la centrifugación, la taza 302 de reactivo se desprende del recinto 303 de tubo y se desliza hacia abajo por las guías 304 de deslizamiento en la pared interior del tubo en la dirección de P. Las guías 304 son ligeramente cónicas para crear un ajuste de interferencia con la taza 302 de reactivo, que mantiene la taza 302 de reactivo en la posición 306 a la que se ha desplazado. La tableta 301 de reactivo expuesta es mezclada entonces con el plasma separador 112 mediante una simple inversión del tubo 100.

15 Las Figuras 22A a C muestran un tubo que tiene un extremo superior abierto y un extremo inferior cerrado que contiene un miembro 101 de separación del gel. Las Figuras 22A y B muestran la realización antes de la centrifugación, el reactivo 311 está contenido detrás de una delgada obturación 312 de las que se desgarran, que está fijada a la pared interior del tubo 100 y a la tapa 313. La Figura 22C muestra que cuando la centrifugación es completa, la tapa 313 es girada en la dirección Z, desgarrando la obturación 312 y permitiendo que el reactivo 311 se mezcle con el plasma separado 112.

Como se refleja en las realizaciones anteriores, los mecanismos de liberación de reactivo generalmente funciona pero (no está limitado a);

25 (a) Un elemento de activación (tal como un resorte o "belleville washer" (plato lavador con un orificio en el centro)), que mantiene el mecanismo de liberación de reactivo cerrado; el procedimiento de separación (por ejemplo, centrifugación) supera la polarización y permite el contacto con el reactivo después de la separación (pasiva);

(b) Una bolsa/compartimento rompible o perforable que pueden ser abiertos manualmente después de la separación (manual).

30 (c) Un recipiente fijado al cierre del tubo, donde esta fijación para el cierre mantiene el mecanismo de liberación de reactivo cerrado; el procedimiento de separación (por ejemplo centrifugación) supera la fuerza de fijación liberando el recipiente y permitiendo el contacto con el reactivo después de la separación (pasivo);

35 o

(d) Un recipiente fijado a una cubierta, donde la cubierta impide el contacto con el reactivo; el procedimiento de separación (por ejemplo, centrifugación) supera la fuerza de fijación, liberando la cubierta y permitiendo el contacto con el reactivo después de la separación.

5 Hay que tener en cuenta que alguna combinación de pasivo y manual es posible, por ejemplo, donde el procedimiento de separación libera un mecanismo de bloqueo, pero se requiere una operación manual para abrir un recipiente o un pasaje.

Como se refleja en las realizaciones anteriores, el mecanismo de liberación de reactivo está generalmente situado (pero no está limitado a);

10 (a) Fijado directamente al cierre de tubo.

(b) Adyacente al cierre de tubo, por ejemplo, descansando sobre un miembro estructural situado cerca del cierre.

(c) En una posición en el tubo adyacente a pero por encima de la posición final del miembro de separación que descansa sobre un miembro estructural tal como una arista integral con la pared interior del tubo.

15 El dispositivo de la presente invención puede comprender una diversidad de revestimientos de tubo o la adición de otros compuestos al agente de estabilización. En una realización alternativa, una formulación de anticoagulante seca pulverizada puede ser revestida sobre el interior del recipiente para que interaccione con la muestra de sangre completa. Después de recogida la sangre en el dispositivo de la presente invención una reacción en cascada puede producirse que origine que la sangre se coagule. Los anticoagulantes son materiales que se usan para impedir la coagulación de la sangre bloqueando el mecanismo de cascada que origina la coagulación. Para recoger una muestra de plasma del resto de la sangre, se añade típicamente un anticoagulante inmediatamente para preservar la integridad de la muestra. Hay tubos comercialmente disponibles para la recogida de plasma que contienen numerosos tipos de anticoagulantes, tales como citrato sódico, heparina, EDTA de potasio y similares. La selección del tipo de anticoagulante usado puede ser efectuada para evitar la interferencia con bDNA, PCR, u otras técnicas de amplificación usadas en ensayos de ácido nucleico. Comercialmente los tubos de recogida de sangre disponibles adecuados para obtener plasma/suero incluyen los siguientes, todos ellos vendidos por Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, con todos los registros y marcas comerciales pertenecientes a Becton, Dickinson and Company; tubos hematológicos VACUTAINER®, núms. de catálogo 20 25 30 35 367650-1, 367661, 6405, 6385, 6564, 367653, 367665, 367658, 367669, 6450-8,

6535-37 y 367662; tubos VACUTAINER® K<sub>2</sub>EDTA, números de catálogo 367841-2, 367856 y 367861; tubos VACUTAINER® PST, núms. de catálogo 367793-4, 6698, 6595, y 6672; tubos VACUTAINER® CPT, núms. de catálogo 362753 y 362760-1; tubos VACUTAINER® SST, núms de catálogo 367782-89, 6509-17 y 6590-92; y tubos VACUTAINER® ACD, núms. de catálogo 367756, 364012 y 4816.

El dispositivo de la presente invención puede ser usado para recoger y preparar un espécimen para el ensayo de ácido nucleico. En primer lugar, un espécimen tal como una muestra de sangre completa o una fracción de células pretratadas de sangre de células pretratadas es recogida dentro del tubo preparado, mientras la muestra de sangre completa se mantiene separada del agente de estabilización situado dentro del tubo. Seguidamente, el tubo es centrifugado para inducir la separación de plasma de células sanguíneas rojas y blancas y plaquetas de modo que el miembro de separación migra a un punto intermedio para la densidad de las células sanguíneas rojas y blancas y plaquetas y la fracción de plasma de menor densidad de la muestra de sangre, facilitando de ese modo el aislamiento y la posterior retirada del plasma. El plasma en el tubo se mueve en contacto y es mezclado con el agente de estabilización del ácido nucleico, por ejemplo mediante la inversión manual del tubo.

La presente invención puede ser usada por compañías farmacéuticas, compañías biotecnológicas, organizaciones de investigación contratadas, investigadores universitarios, hospitales de investigación y cualquier institución o individuo que estén interesados en el estudio de los ácidos nucleicos. La presente invención deberá permitir a los investigadores proteger de modo fácil y conveniente y procesar muestras de plasma para análisis aguas abajo sin necesidad de refrigeración para el almacenamiento o transporte. Además es posible usar la invención con cualquier agente que uno desea para estar en contacto solamente con los componentes seleccionados de la sangre.

Adicionalmente, el montaje de la presente invención no requiere operaciones o tratamientos adicionales por parte del médico; y la muestra de sangre o fluido puede ser extraída de manera estándar, usando un equipo de muestras estándar.

Se ha de tener en cuenta que en cada realización un separador mecánico podría ser usado de modo intercambiable donde se muestre un separador de gel y viceversa. También, siempre que el término plasma sea mencionado, cualquier componente separado de la sangre tal como suero podría ser aplicado y viceversa.

**REIVINDICACIONES**

1. Un dispositivo para recoger una muestra biológica, que comprende:  
un recipiente (10) que tiene un primer extremo abierto y un extremo inferior  
5 cerrado;  
un miembro (12) de separación dispuesto en el recipiente (10), siendo capaz el  
miembro (12) de separación de separar la muestra tras la centrifugación en  
componentes discretos;  
al menos un mecanismo de liberación de reactivo posicionado encima del  
10 miembro (12) de separación;  
y  
al menos un reactivo (108) situado dentro del mecanismo de liberación de  
reactivo;  
en donde dicho mecanismo de liberación de reactivo impide el contacto entre  
15 dicho reactivo (108) y dicha muestra biológica hasta después de la separación de  
dicha muestra biológica en componentes discretos.
2. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el miembro (12) de separación  
está situado en el extremo inferior cerrado.
- 20 3. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el miembro (12) de separación  
está situado intermedio entre los extremos superior e inferior.
4. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el mecanismo de liberación de  
25 reactivo está situado en el primer extremo abierto.
5. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el recipiente es un tubo (100)  
que tiene un cierre (102) en el primer extremo abierto.
- 30 6. El dispositivo de la reivindicación 5, en el que el mecanismo de liberación de  
reactivo está asegurado al cierre (102).
7. El dispositivo de la reivindicación 5, en el que el mecanismo de liberación de  
reactivo está soportado por un miembro estructural integral sobre las paredes  
35 interiores del tubo (100).

8. El dispositivo de la reivindicación 7, en el que el miembro estructural comprende nervios (188) integrales.

5           9. El dispositivo de la reivindicación 5, en el que el tubo (100) es evacuado a una presión inferior que la presión atmosférica.

10           10. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el reactivo (108) es un agente de estabilización del ácido nucleico.

10

11. El dispositivo de la reivindicación 10, en el que el agente de estabilización del ácido nucleico está posicionado para contactar selectivamente un componente de plasma o suero separado de la totalidad de la sangre.

15

12. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el miembro (12) de separación es un elemento de separación mecánico.

13. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el miembro (12) de separación es un gel (101).

20

14. El dispositivo de la reivindicación 13, en el que el miembro (101) de separación de gel está físicamente separado del reactivo (108).

25

15. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el miembro (12) de separación tiene una densidad intermedia de plasma y componentes celulares remanentes, o intermedia de glóbulos rojos de sangre y suero.

16. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el miembro (12) de separación es un filtro.

30

17. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el reactivo (108) está en una forma seleccionada del grupo compuesto de una solución, suspensión u otro líquido, una pastilla, una tableta, una cápsula, un material seco de pulverización, un material seco congelado, un polvo, una partícula, un gel, cristales o material liofilizado.

35

18. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el reactivo (108) es un estabilizador de proteínas.

5 19. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que la activación del mecanismo de liberación del reactivo permite que el reactivo (108) contacte el componente discreto deseado de la muestra biológica separada mientras permanece libre de contactos con componentes no deseados.

10 20. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el mecanismo de liberación de reactivo comprende un sistema de activación pasivo.

15 21. El dispositivo de la reivindicación 20, en el que el mecanismo de liberación de reactivo permite que el reactivo contacte el componente discreto mediante la desaplicación de una cubierta del montaje de mecanismo de liberación de reactivo.

22. El dispositivo de la reivindicación 20, en el que el mecanismo de liberación de reactivo contacta el componente discreto mediante la apertura de una puerta de salida de reactivo en el montaje de mecanismo de liberación.

20 23. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el mecanismo de liberación de reactivo se activa mediante la centrifugación de la muestra biológica.

25 24. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el mecanismo de liberación de reactivo se activa mediante un acto manual después de la separación de la muestra biológica.

25. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el recipiente (10) comprende además un anticoagulante.

30 26. Un método para la recogida y preparación de una muestra, que comprende: proporcionar un tubo (100), en el que el tubo (100) comprende un extremo superior que contiene un cierre (102) y un extremo inferior cerrado, un miembro (12, 101) de separación, dispuesto en el recipiente donde el miembro es capaz de separar la muestra en componentes discretos, y al menos un mecanismo de liberación de  
35 reactivo que comprende un reactivo (108) situado encima del miembro de separación;

recoger una muestra dentro del tubo (100), de modo que la muestra es separada del reactivo (108);

someter el tubo (100) a un procedimiento de centrifugación que induce la separación de la muestra en componentes discretos;

5           activar el mecanismo de liberación de reactivo para permitir el contacto del reactivo (108) con el componente discreto, efectuada la activación ya sea manualmente o mediante la acción del procedimiento que induce la separación; y

            mezclar el componente discreto deseado de la muestra con el reactivo (108) ya sea permitiendo el proceso que induce la separación para inducir el mezclado o  
10           mediante una operación de mezclado distinta.

27. El método de la reivindicación 26, en el que la muestra es totalmente sangre.

15           28. El método de la reivindicación 27, en el que las operaciones de someter el tubo (100) a un procedimiento que induzca la separación de la muestra y la activación del mecanismo de liberación de reactivo comprenden:

            colocar el tubo (100) dentro de una centrífuga con el extremo superior enfrentado hacia arriba; y

20           centrifugar el tubo para inducir la separación de plasma o suero de los componente de la sangre remanente, y

            activar el mecanismo de liberación de reactivo manualmente o permitir que el mecanismo lo active tras la centrifugación.

25           29. El método, de la reivindicación 28, en el que el componente discreto en contacto con el reactivo (108) es plasma.

30           30. El método de la reivindicación 28, en el que el reactivo (108) es un agente de estabilización del ácido nucleico.

31. El método de la reivindicación 26, en el que la operación de mezclado comprende la inversión manual del tubo (100).

35           32. El método de la reivindicación 26, en el que el miembro (12) de separación es un elemento de separación mecánico.

33. El método de la reivindicación 26, en el que el miembro (12) de separación es un gel (101).

5 34. El método de la reivindicación 33, en el que el miembro (101) de separación de gel está separado físicamente del reactivo (108).

35. El método de la reivindicación 26, en el que el miembro (12) de separación es un filtro.

10 36. El método de la reivindicación 26, en el que el reactivo (108) está en una forma seleccionada del grupo compuesto de una solución, suspensión u otro líquido, una pastilla, una tableta, una cápsula, un material seco de pulverización, un material seco congelado, unos polvos, una partícula, un gel, cristales o un material liofilizado.

15 37. El método de la reivindicación 26, en el que el mecanismo de liberación de reactivo comprende un sistema de activación pasivo.

20 38. El método de la reivindicación 37, en el que el mecanismo de liberación de reactivo permite que el reactivo (108) contacte el componente discreto mediante la desaplicación de una cubierta del montaje de mecanismo de liberación de reactivo.

25 39. El método de la reivindicación 37, en el que el mecanismo de liberación de reactivo permite que el reactivo contacte el componente discreto mediante la apertura de una puerta de salida de reactivo en el montaje de mecanismo de liberación.

40. El método de la reivindicación 26, en el que el mecanismo de liberación de reactivo es activado por centrifugación de la muestra biológica.

30 41. El método de la reivindicación 26, en el que el mecanismo de liberación de reactivo se activa mediante una acción manual después del procedimiento de separación de la muestra biológica.

42. El método de la reivindicación 26, en el que el reactivo (108) es un agente de estabilización del ácido nucleico.

43. El método de la reivindicación 26, en el que el reactivo (108) es un estabilizador de proteínas.

5 44. El método de la reivindicación 26, en el que el mecanismo de liberación de reactivo se asegura al cierre (102) antes de la separación.

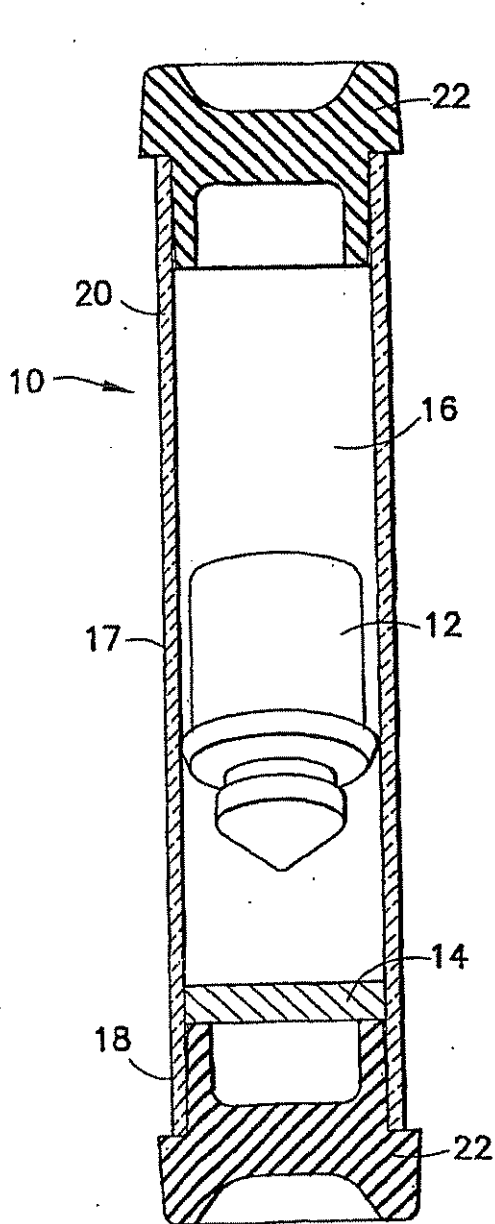


FIG. 1

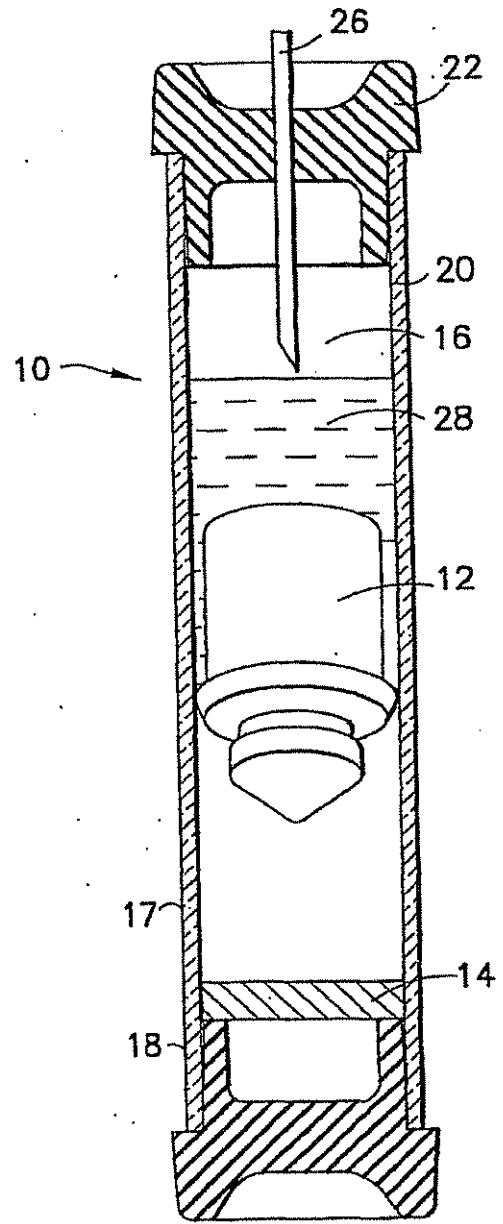


FIG. 2

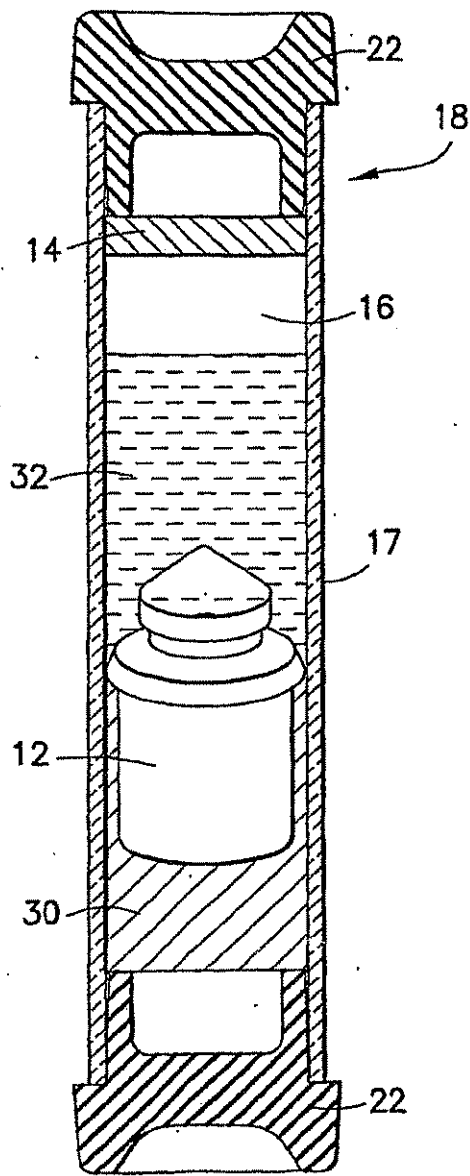


FIG. 3

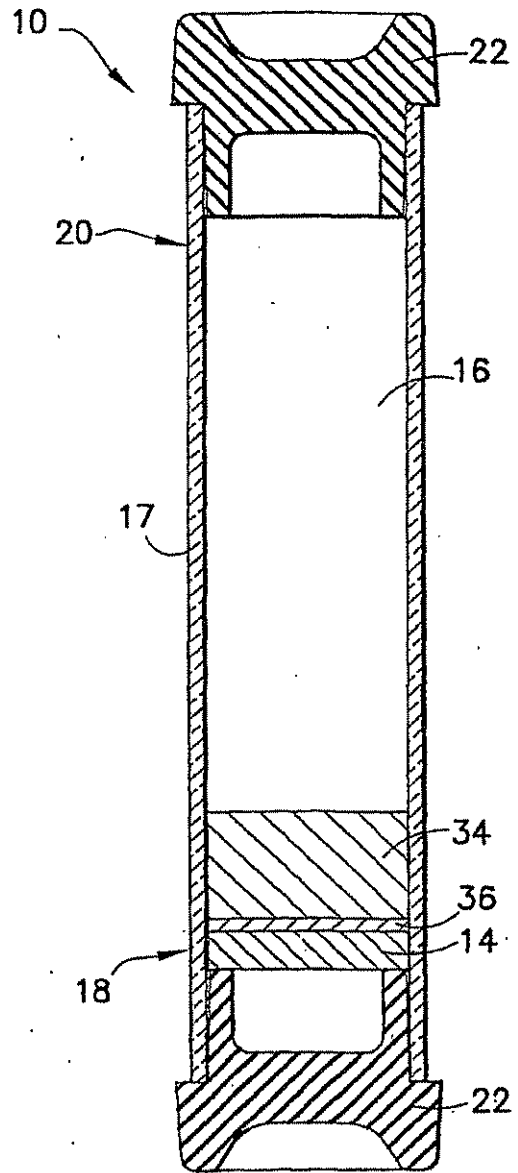


FIG. 4

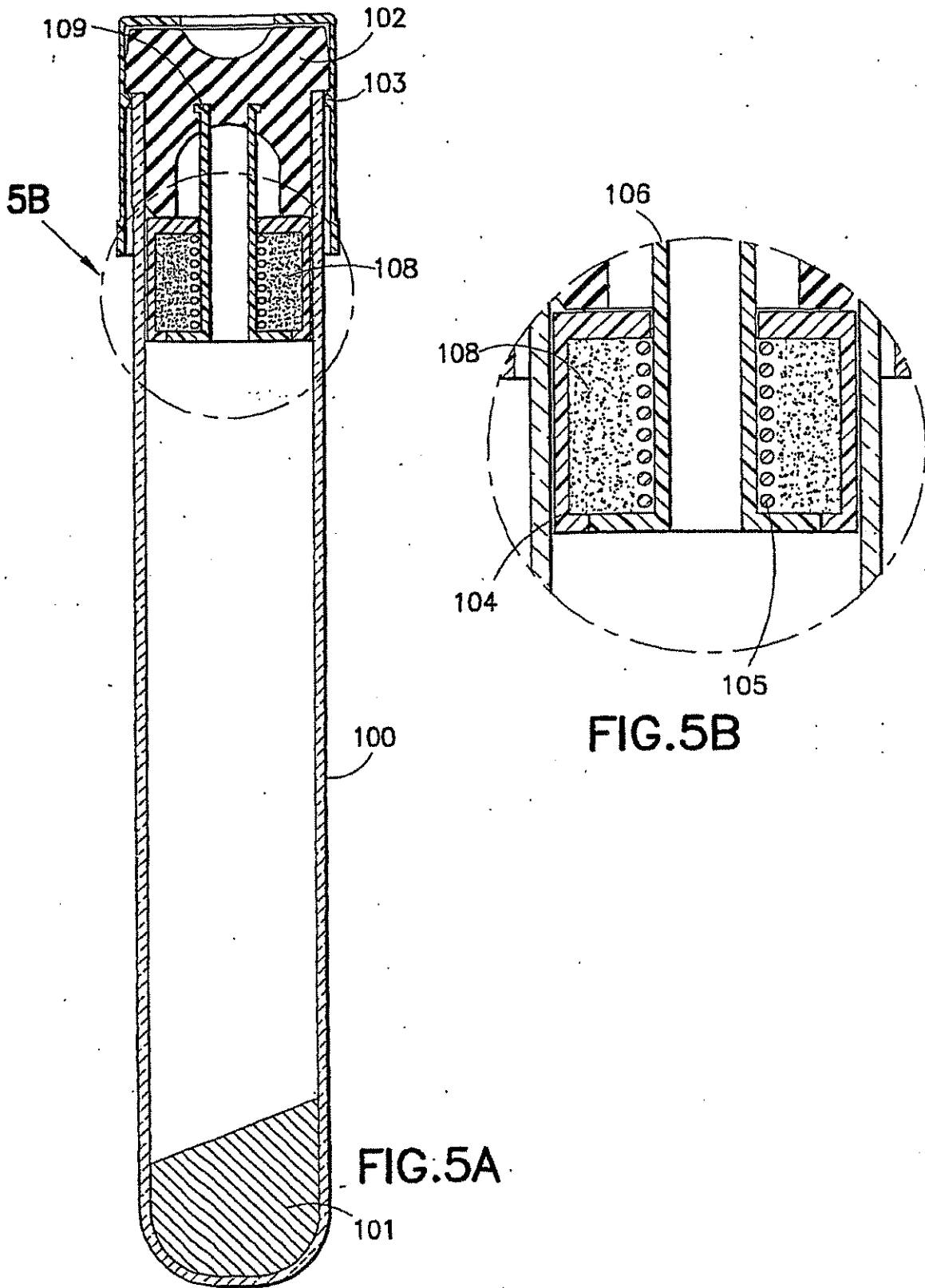


FIG. 5A

FIG. 5B

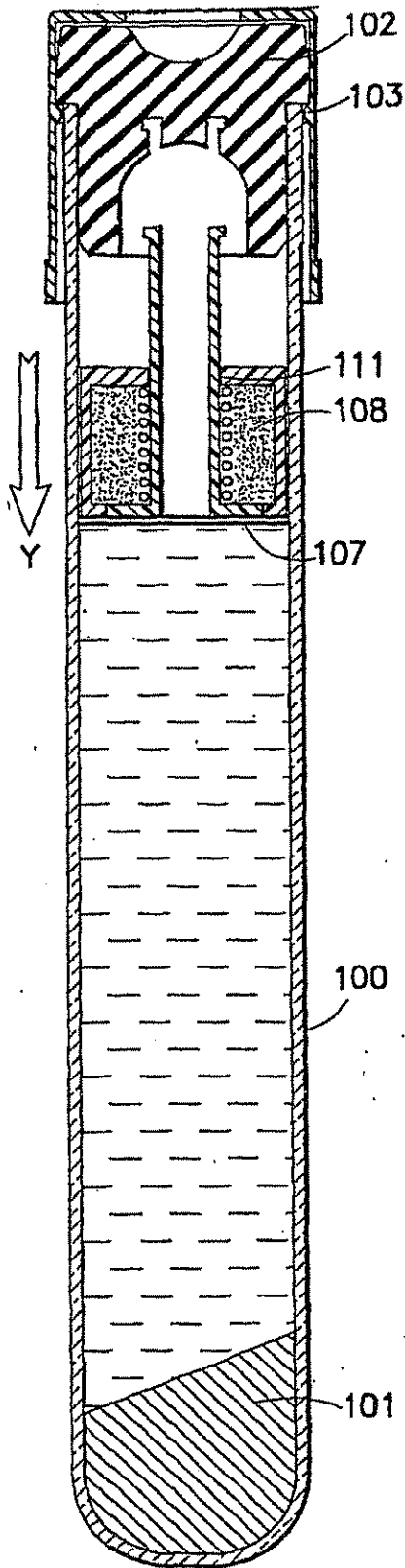


FIG. 5C

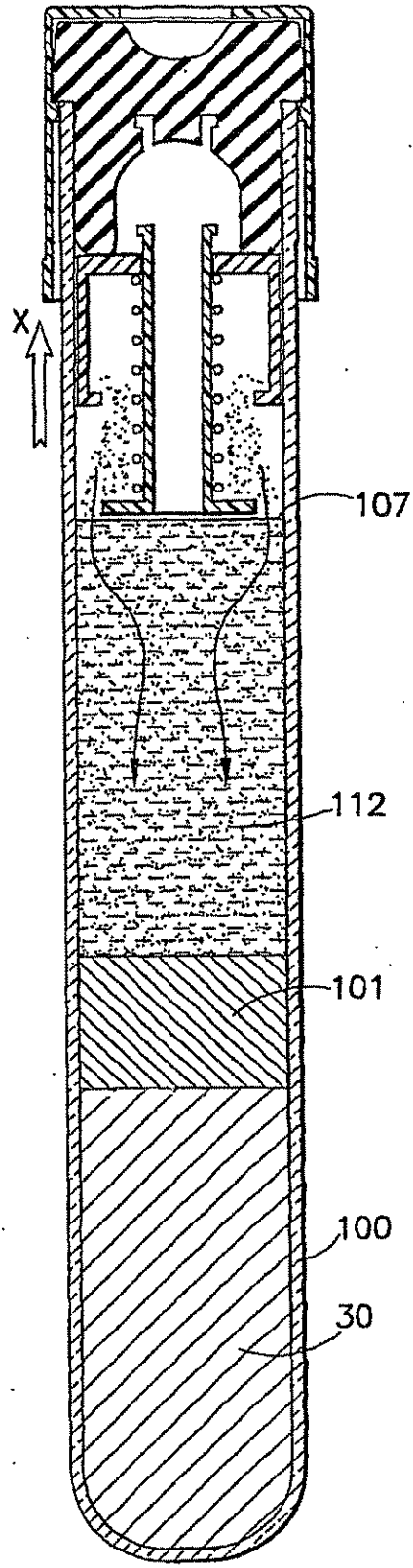


FIG. 5D

30

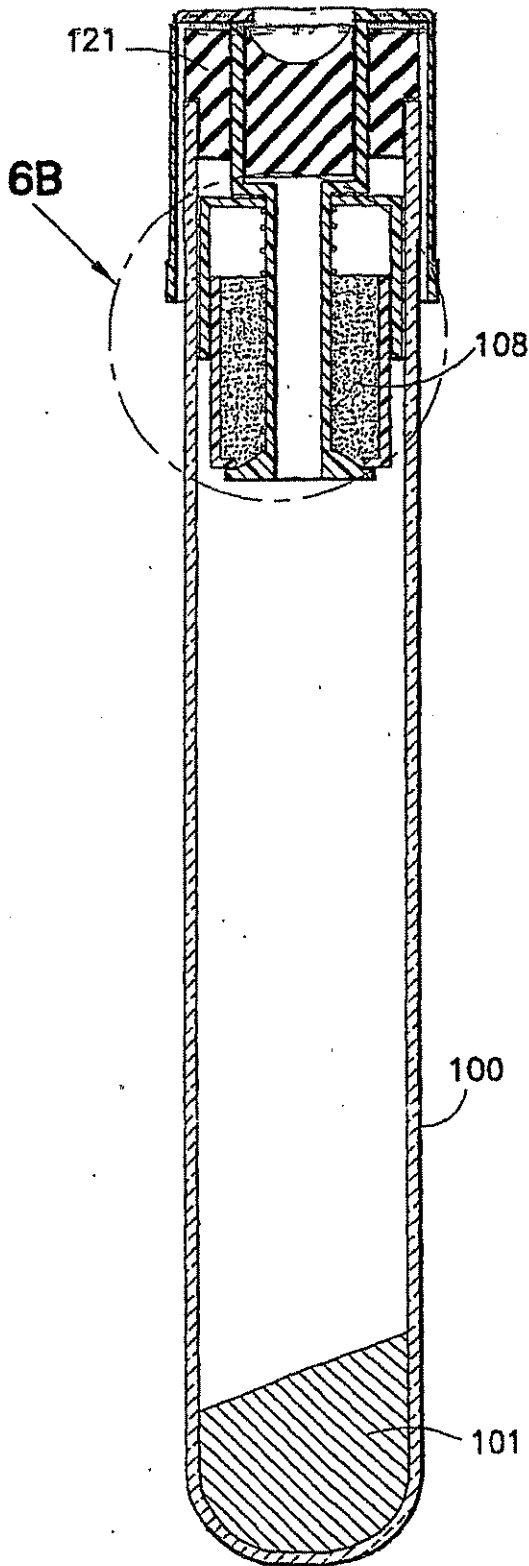


FIG. 6A

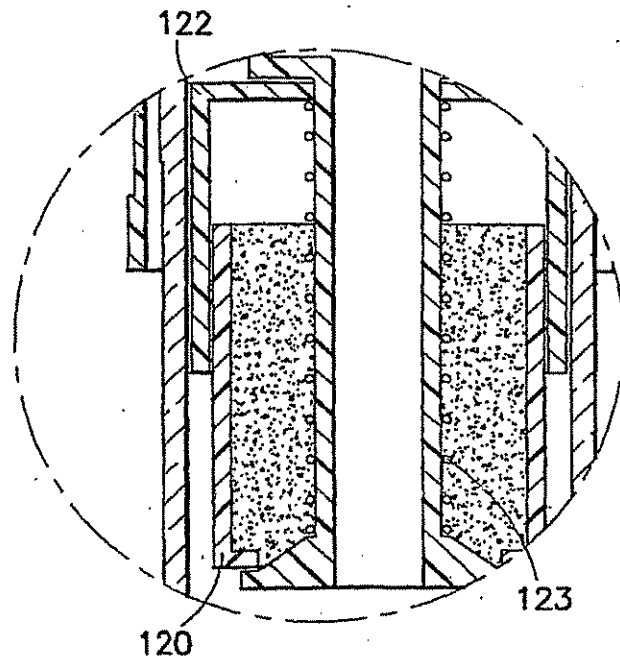


FIG. 6B

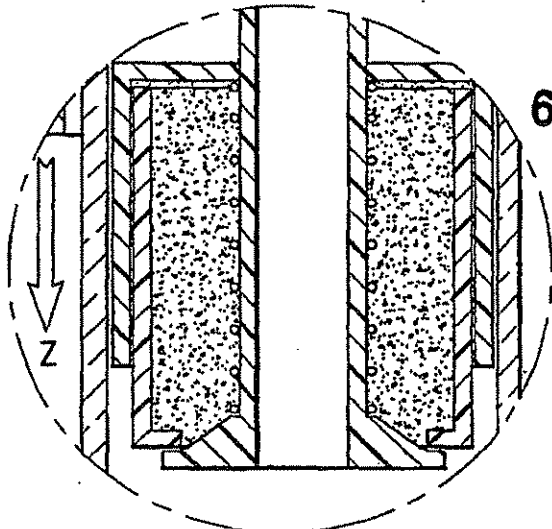


FIG. 6C

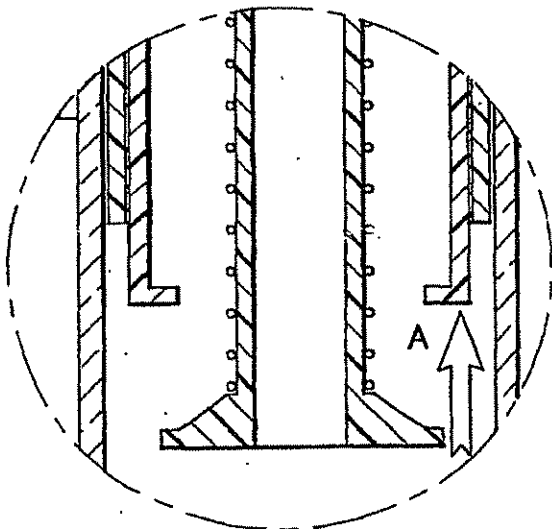


FIG. 6E

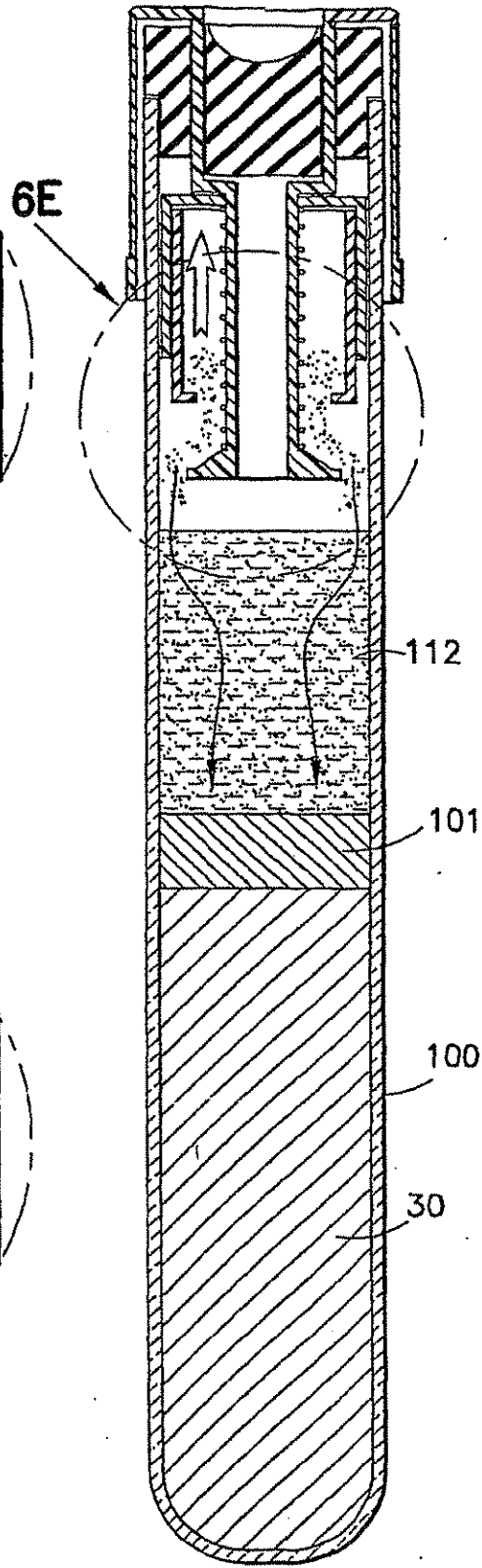


FIG. 6D

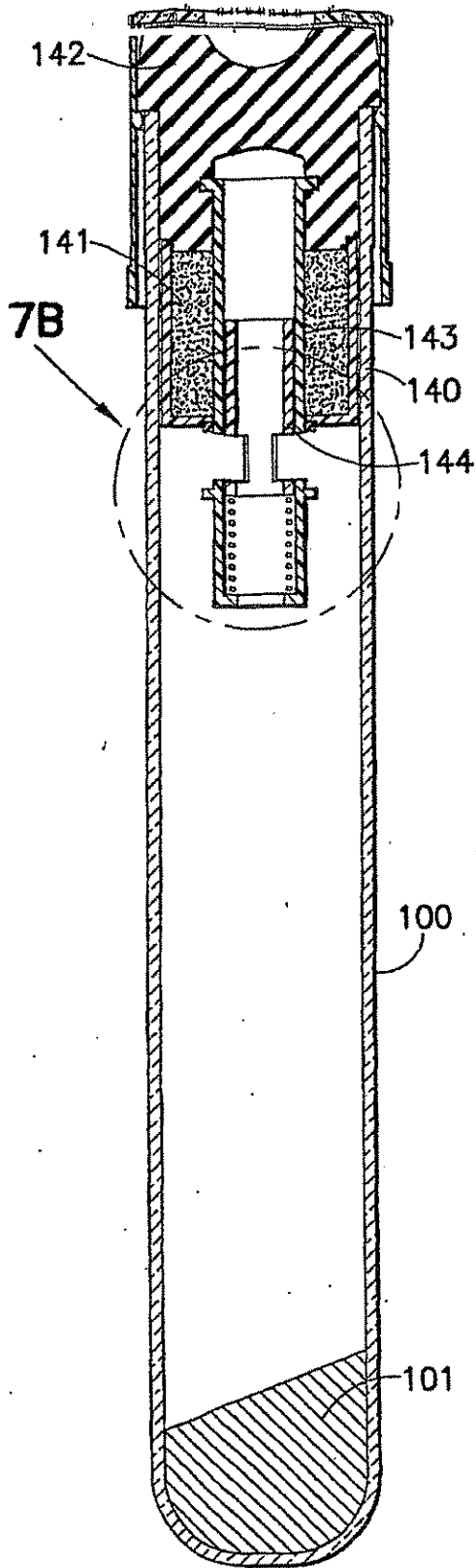


FIG. 7A

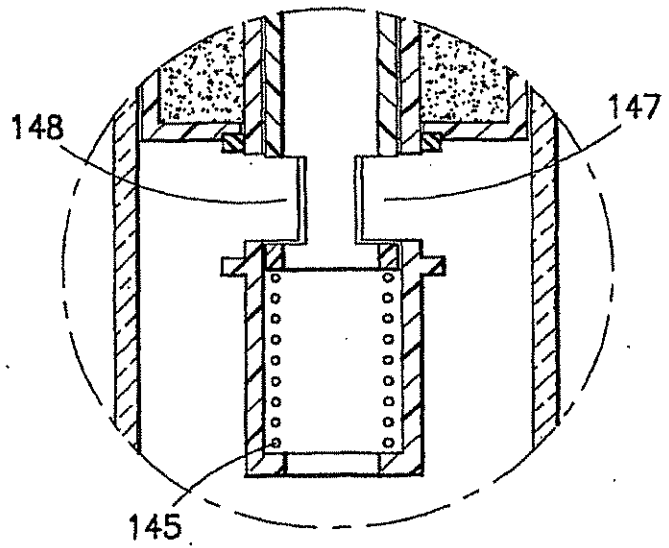


FIG. 7B

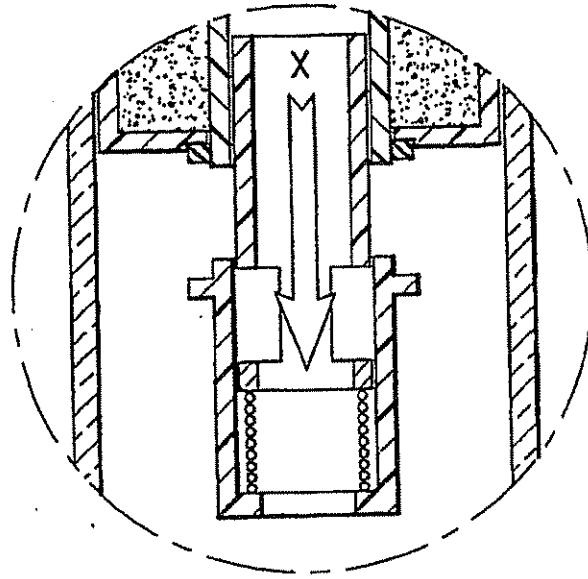


FIG.7C

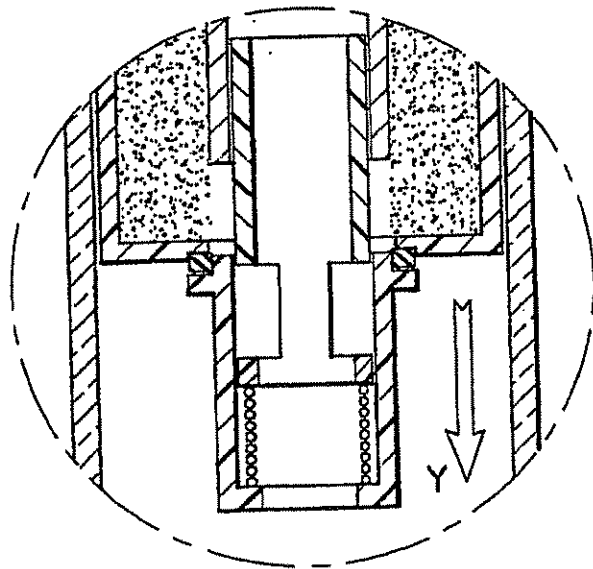
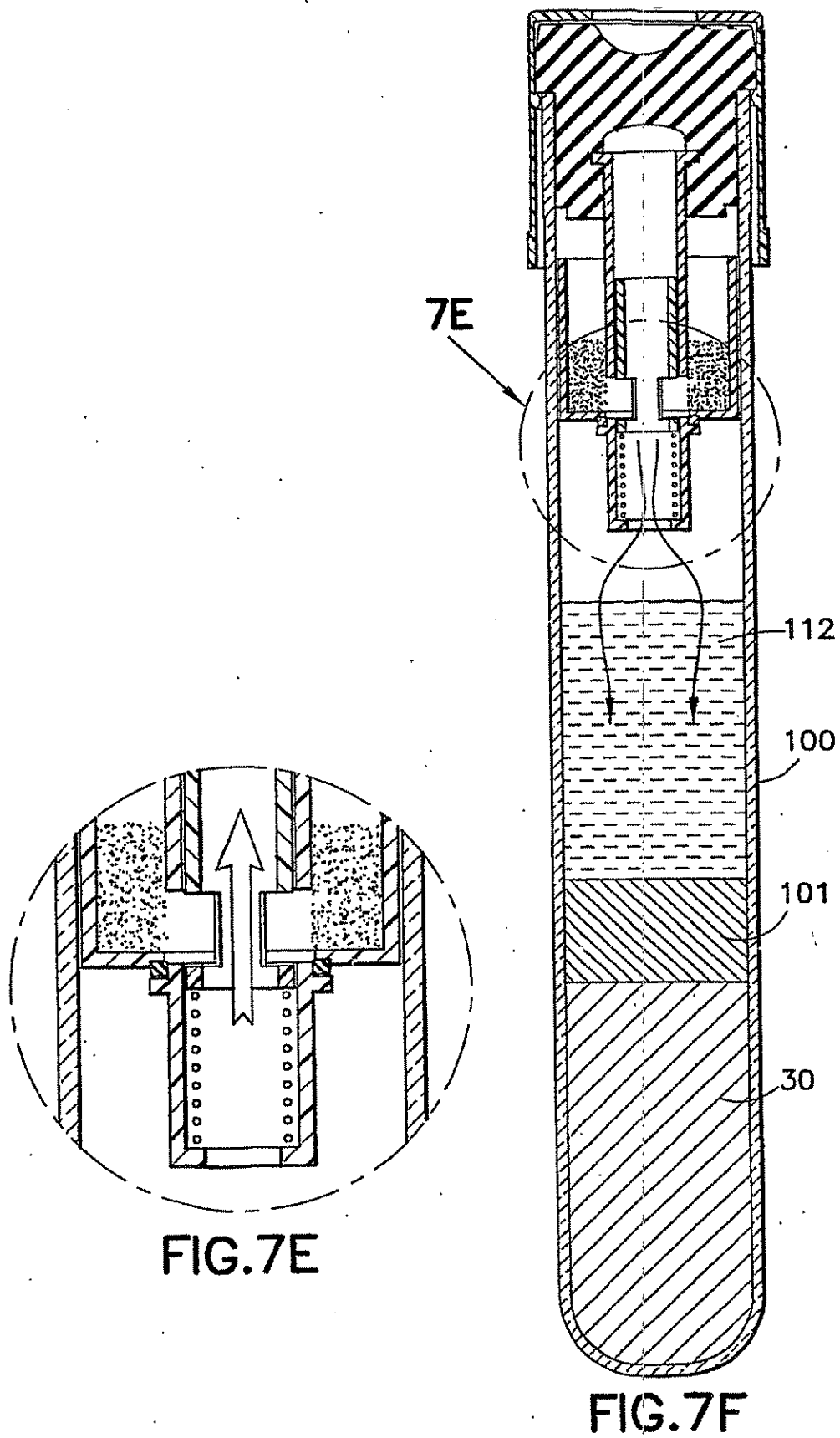


FIG.7D



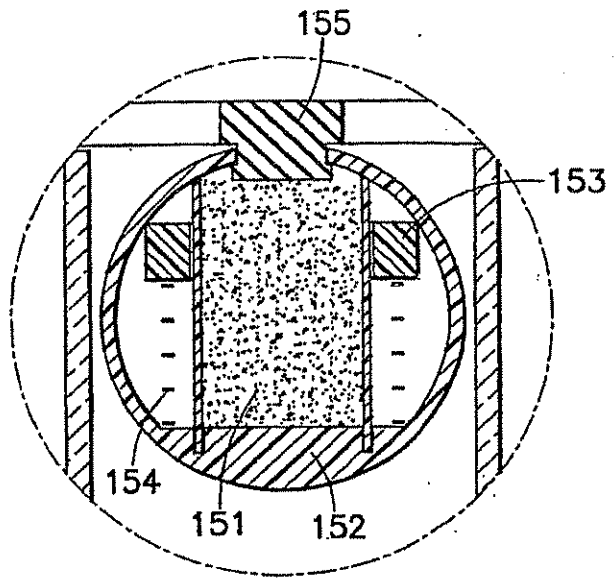
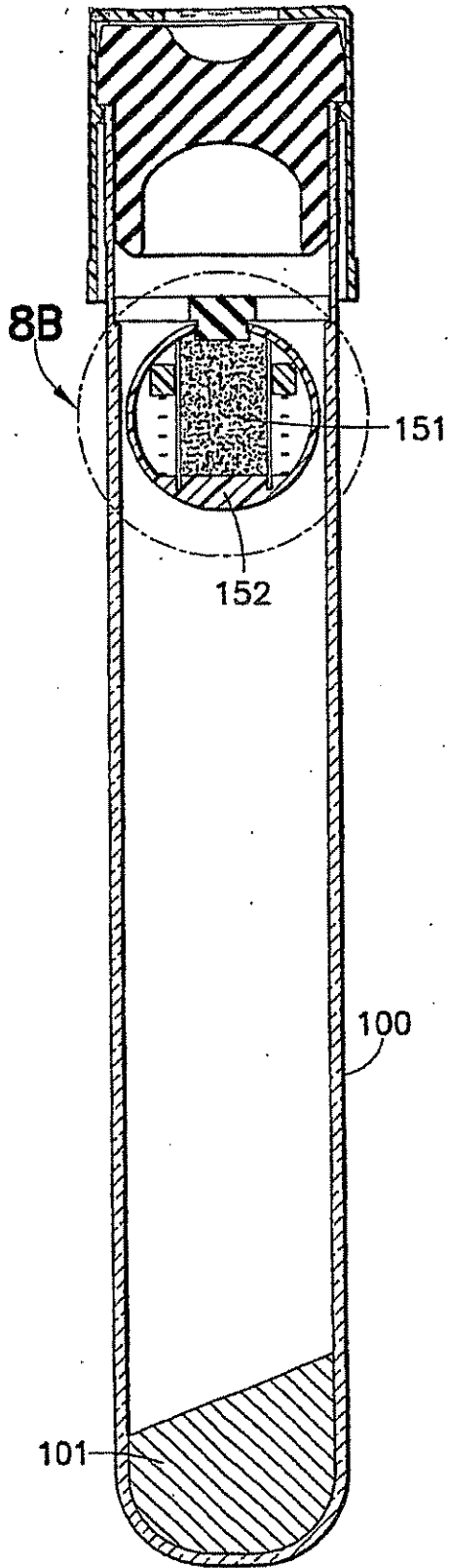


FIG. 8B

FIG. 8A

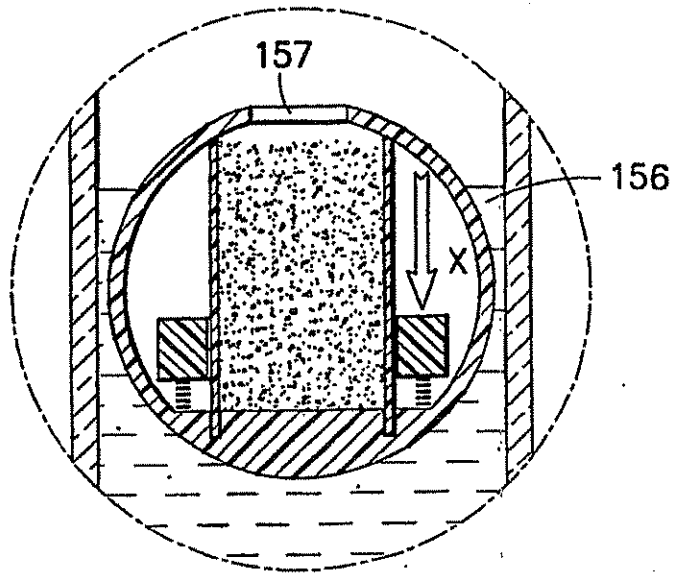


FIG. 8C

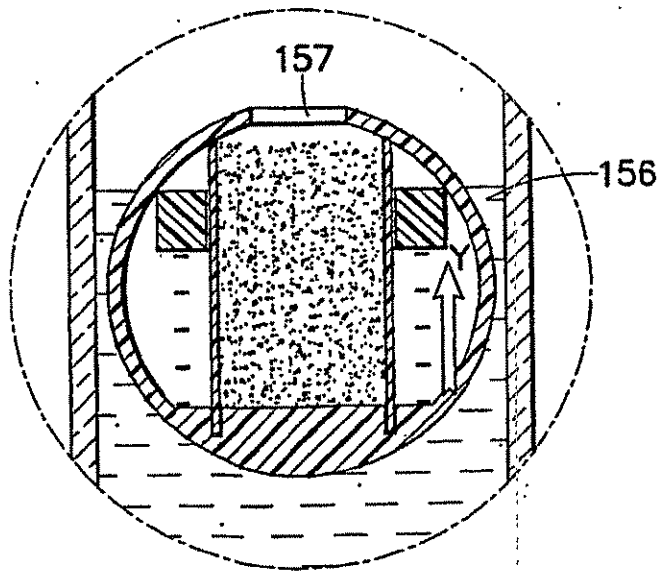


FIG. 8D

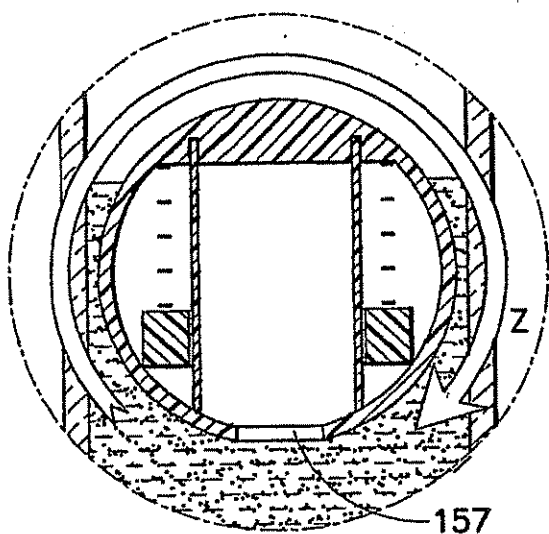


FIG. 8E

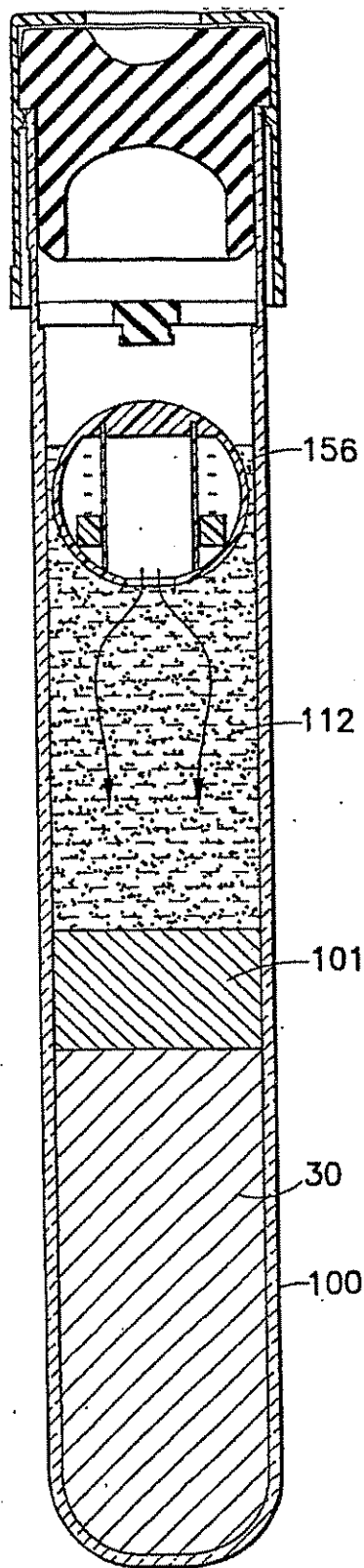


FIG. 8F

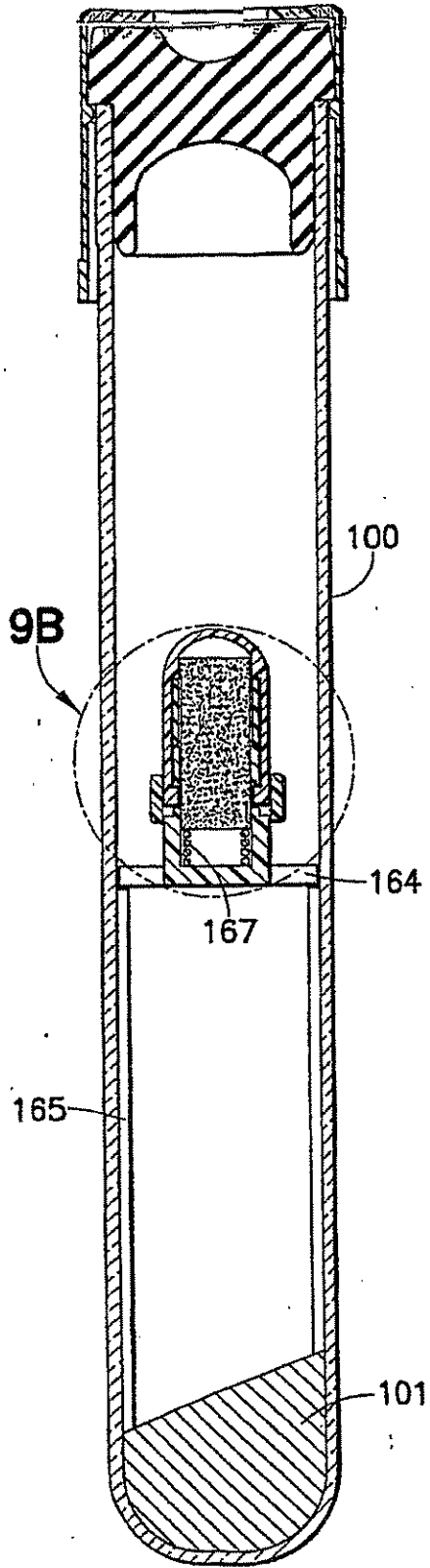


FIG. 9A

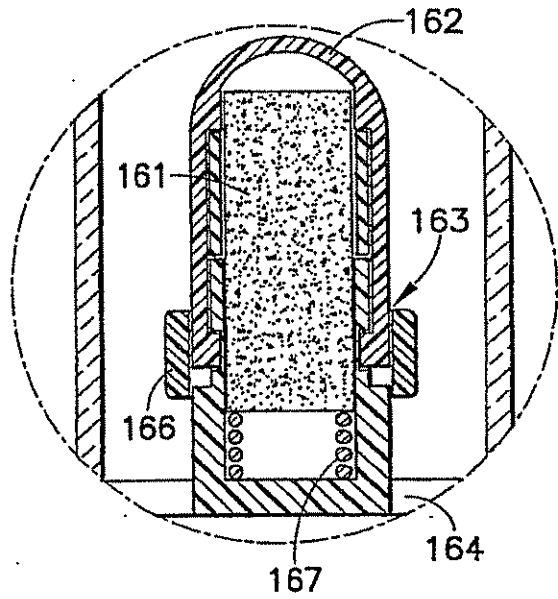
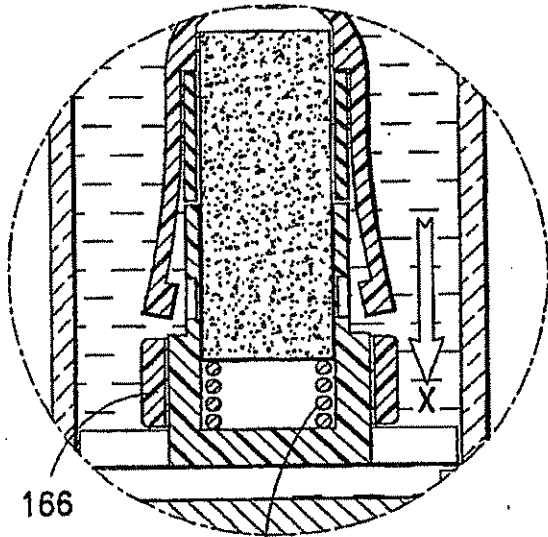
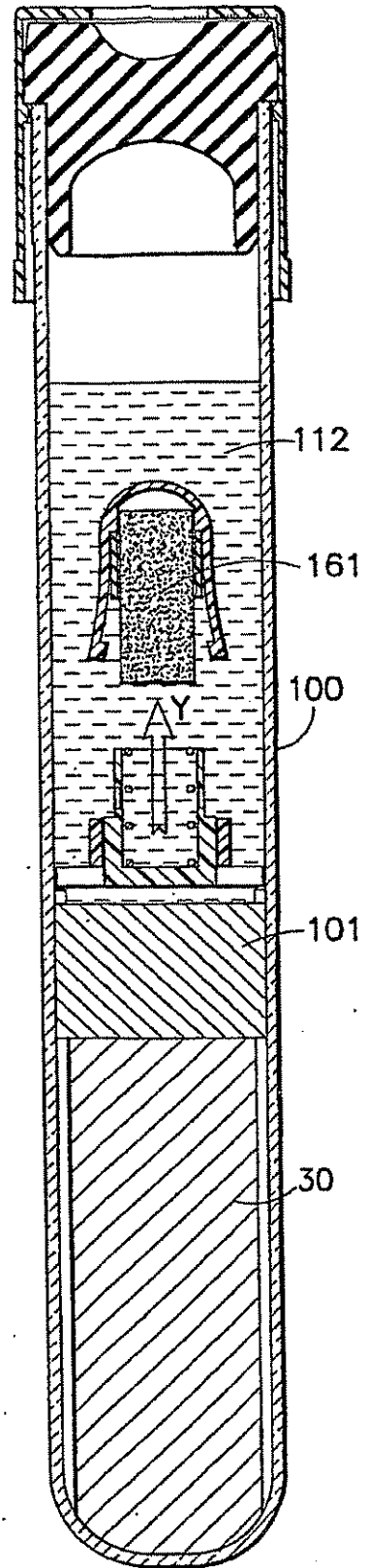


FIG. 9B



166  
167  
**FIG. 9C**



112  
161  
100  
101  
30  
**FIG. 9D**

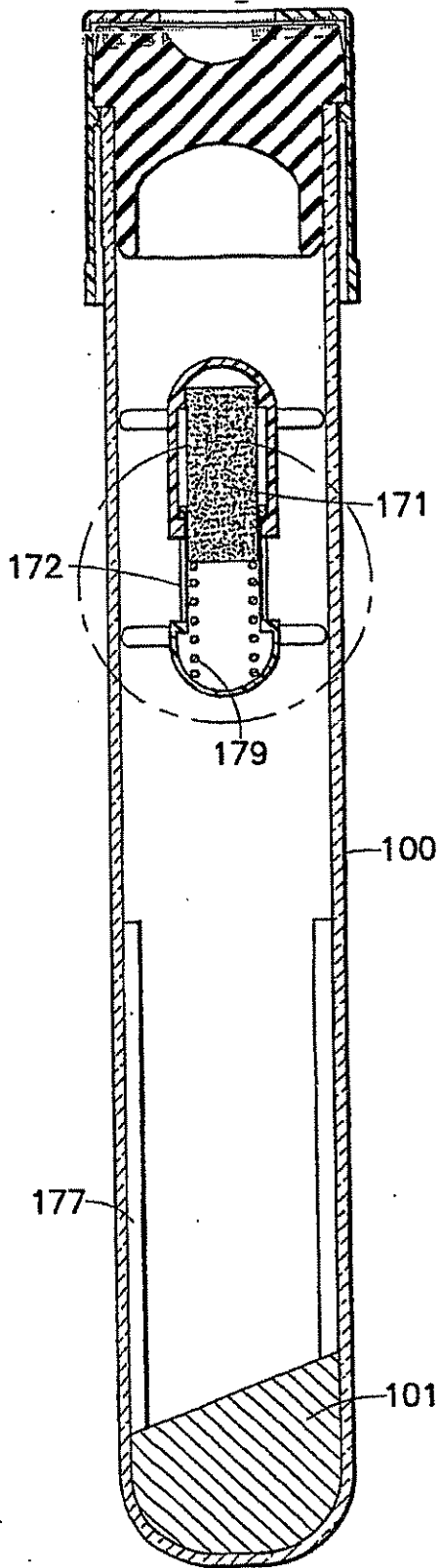


FIG. 10A

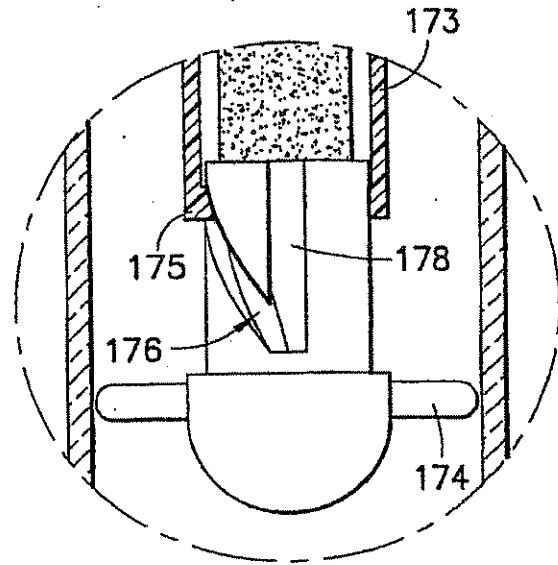


FIG. 10B

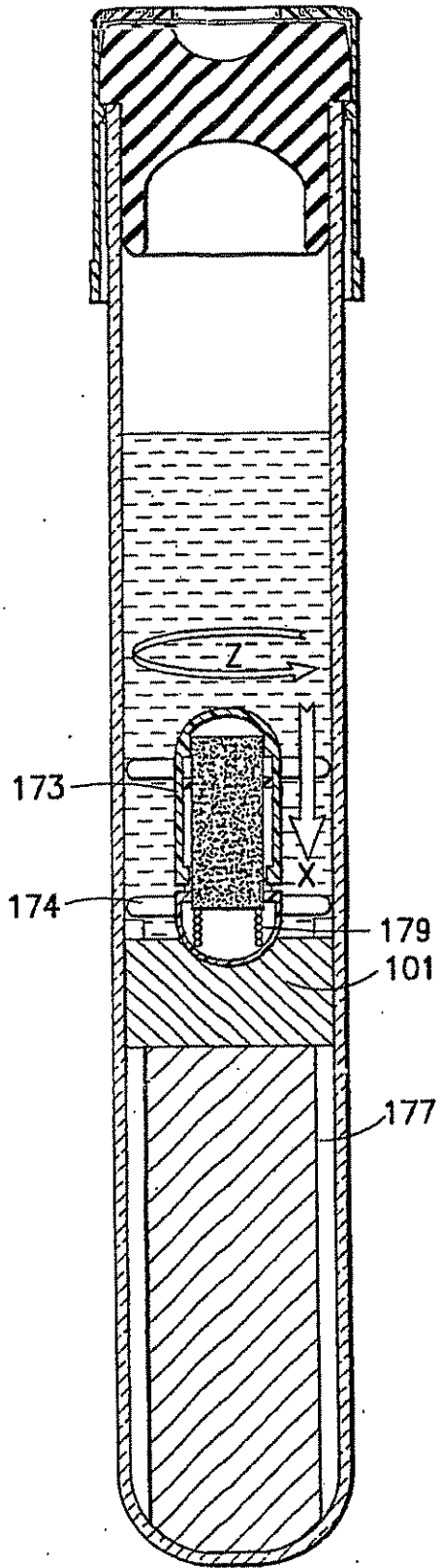


FIG. 10C

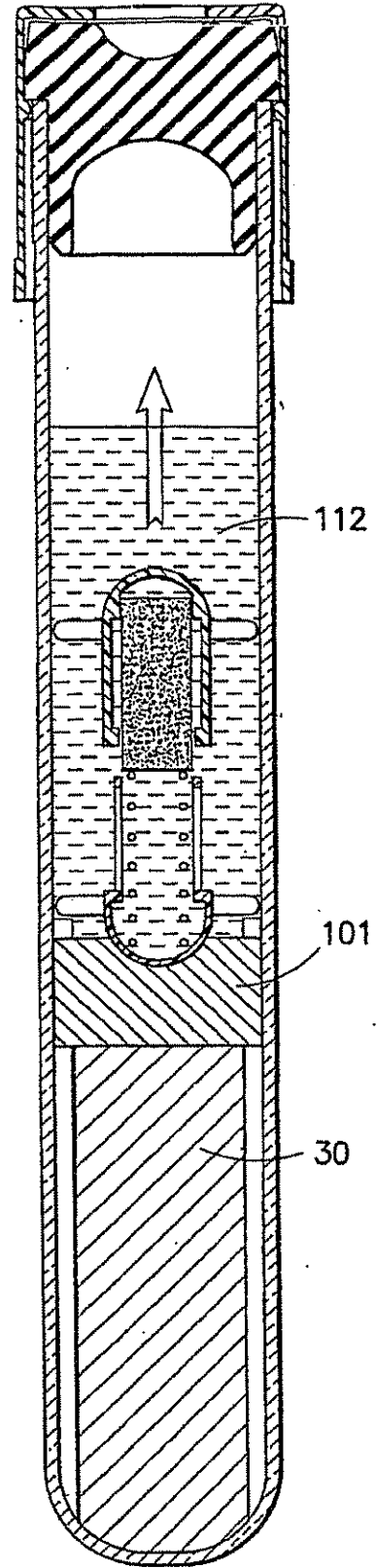


FIG. 10D

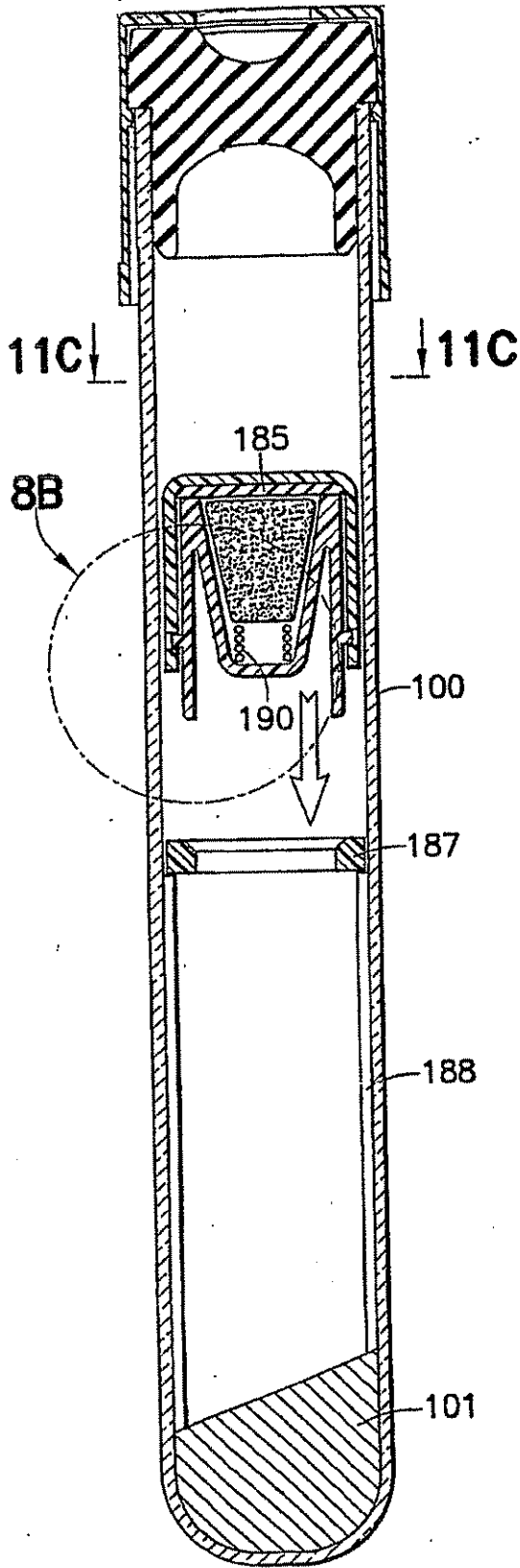


FIG. 11A

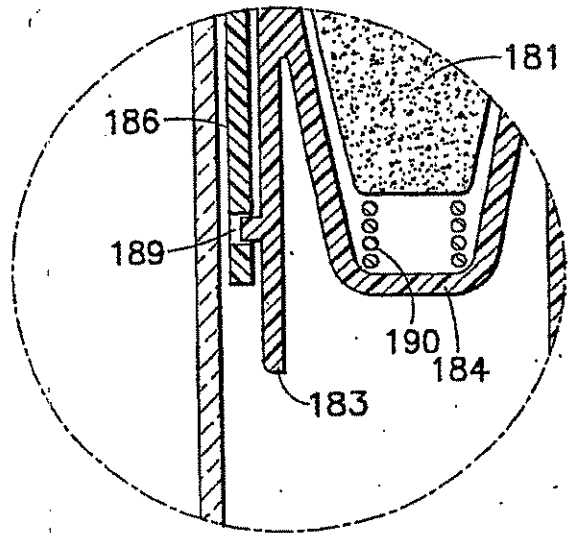


FIG. 11B

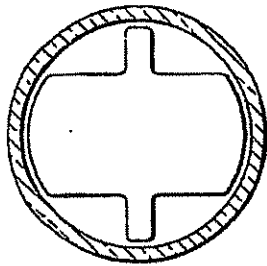


FIG. 11C

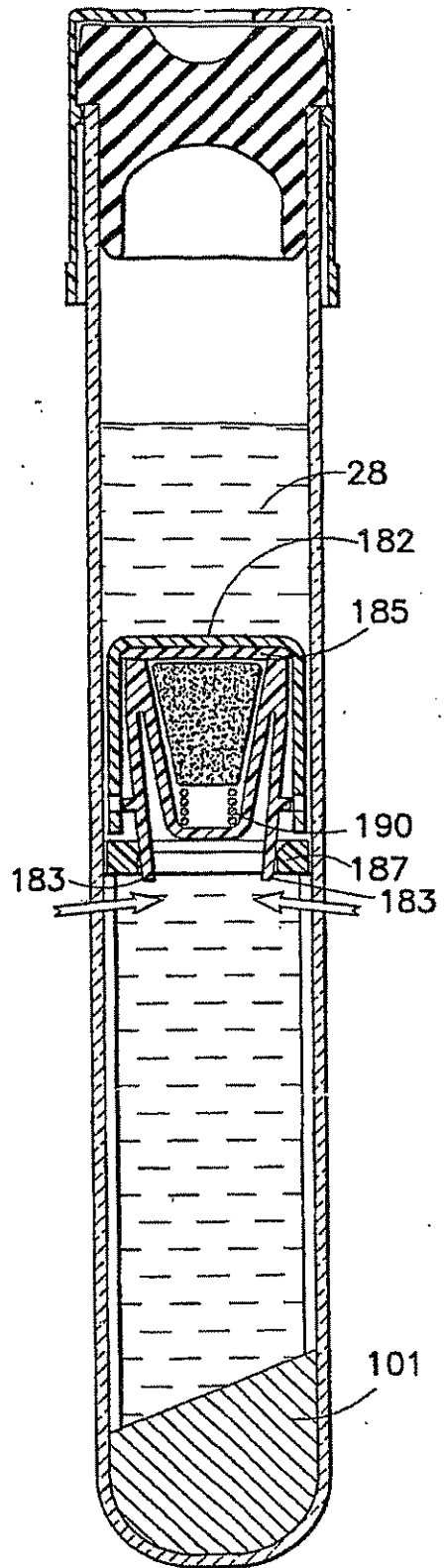
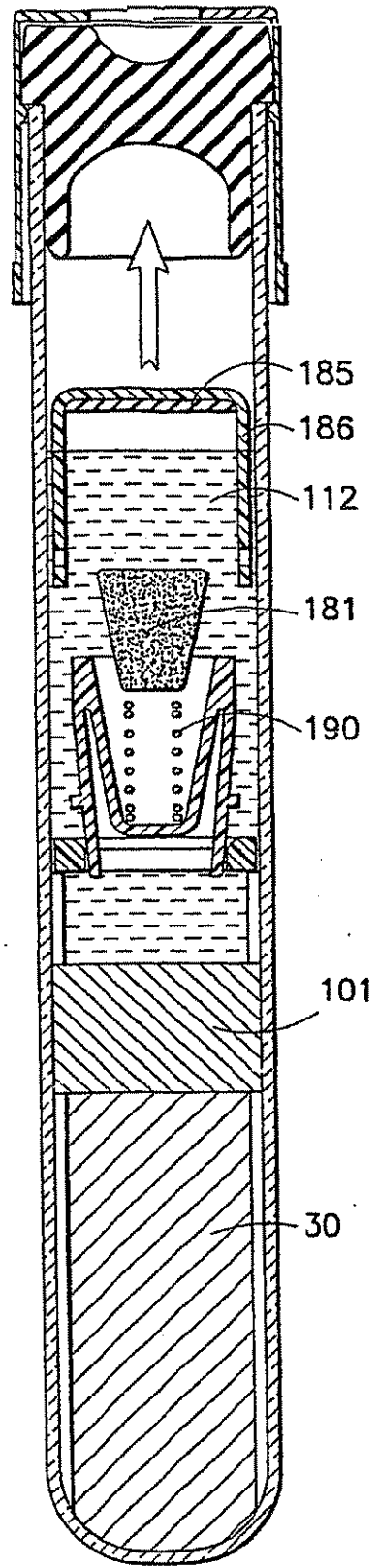
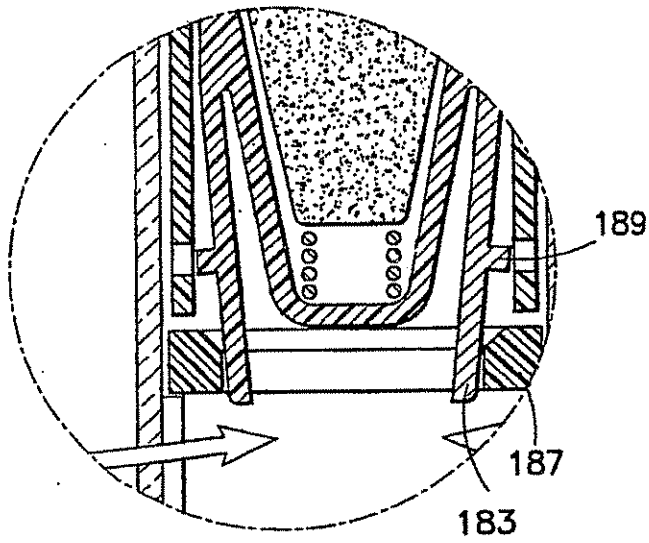
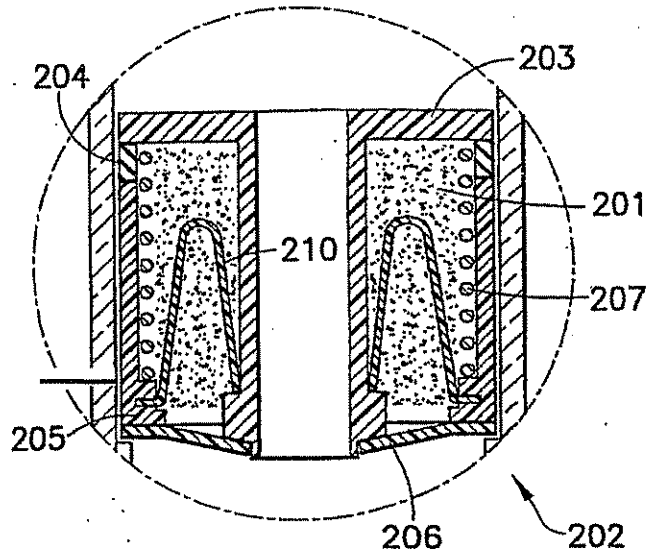
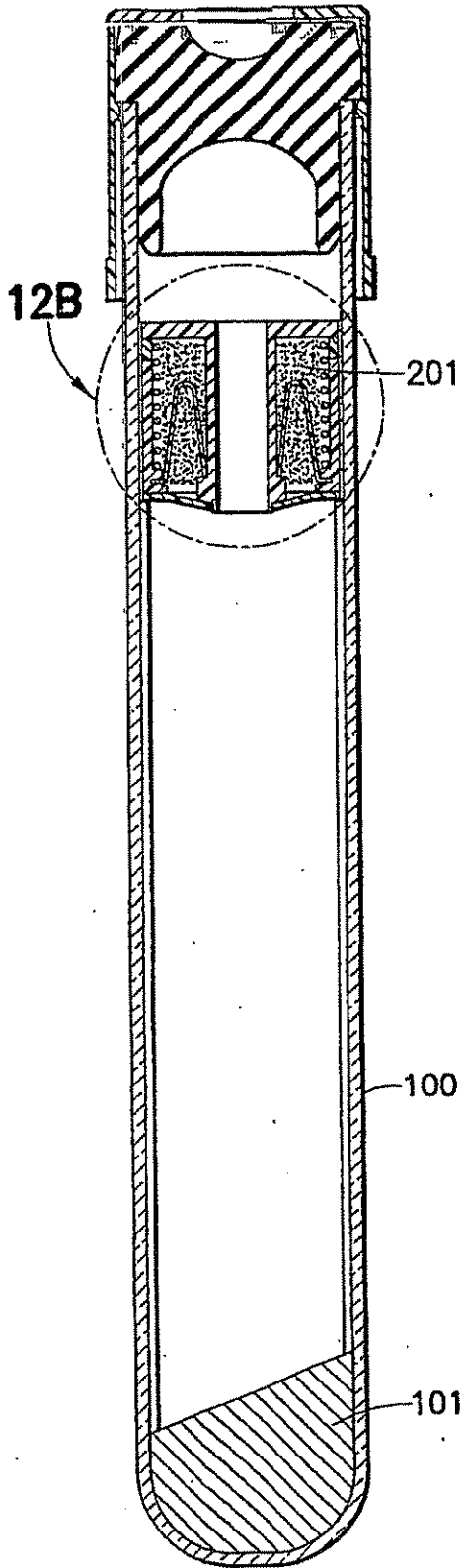


FIG. 11D





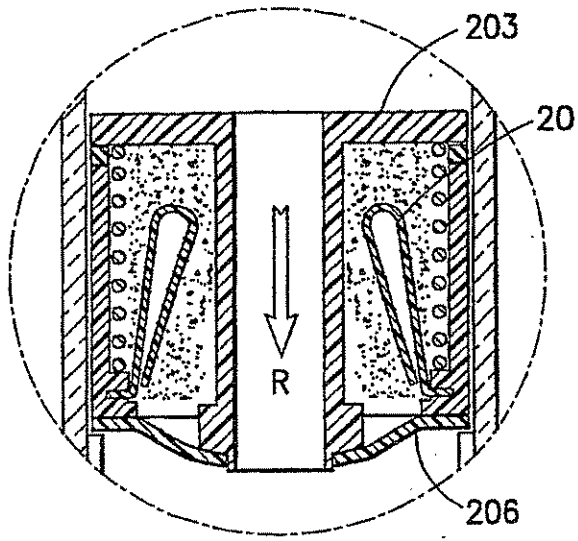


FIG. 12C

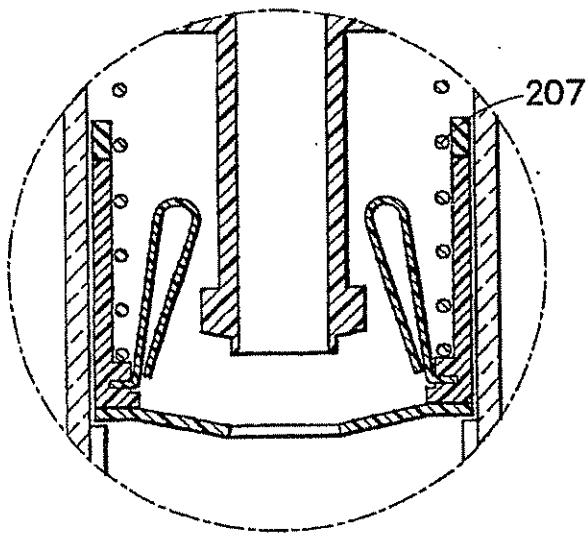


FIG. 12E

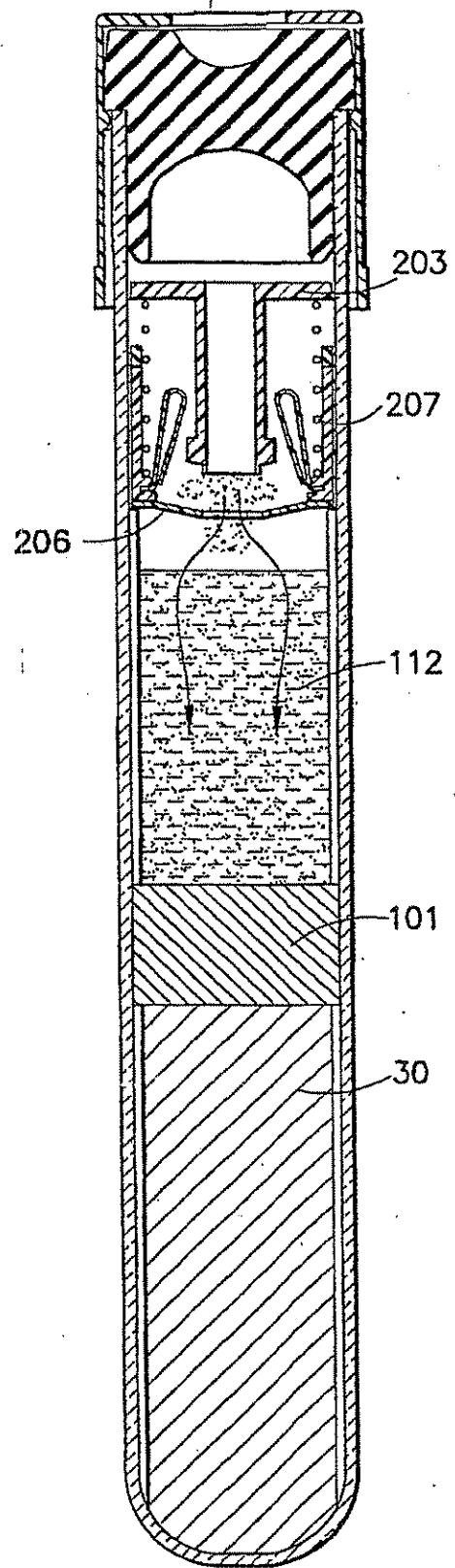


FIG. 12D

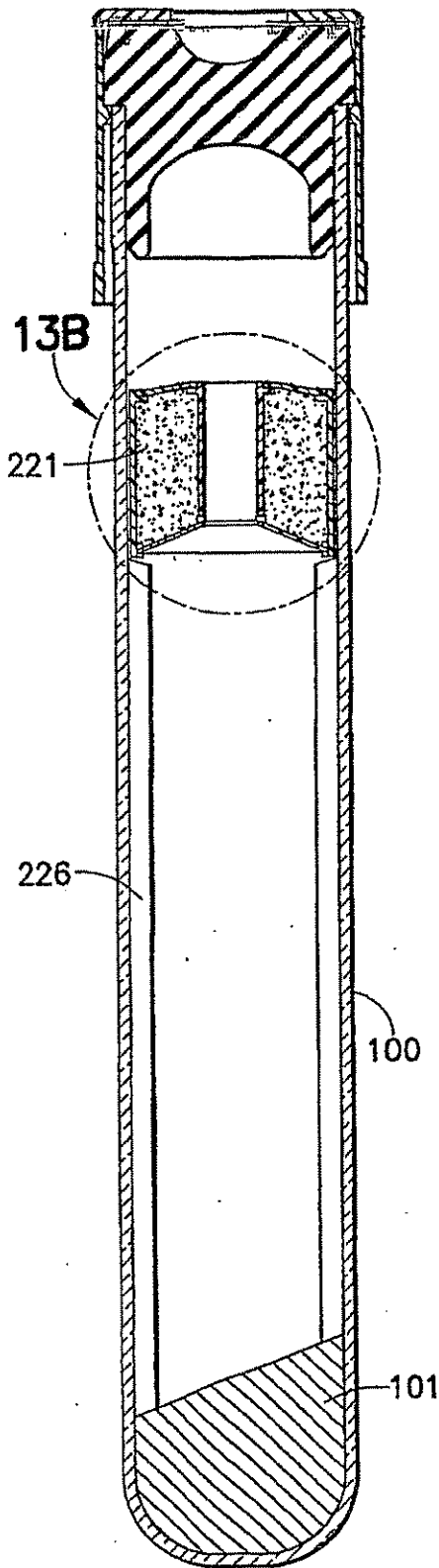


FIG. 13A

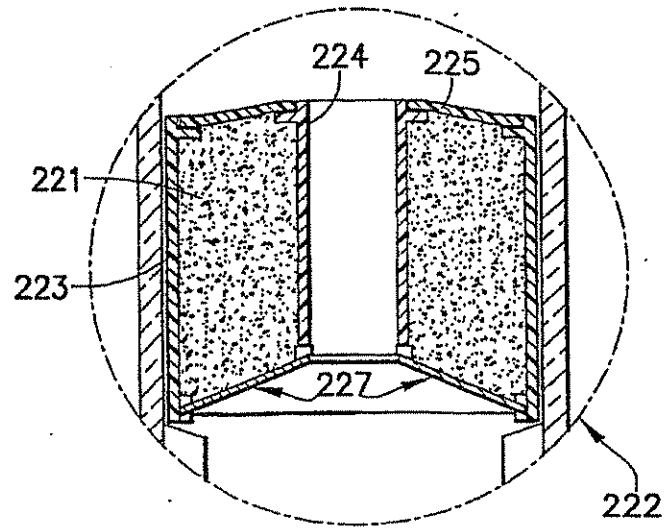


FIG. 13B

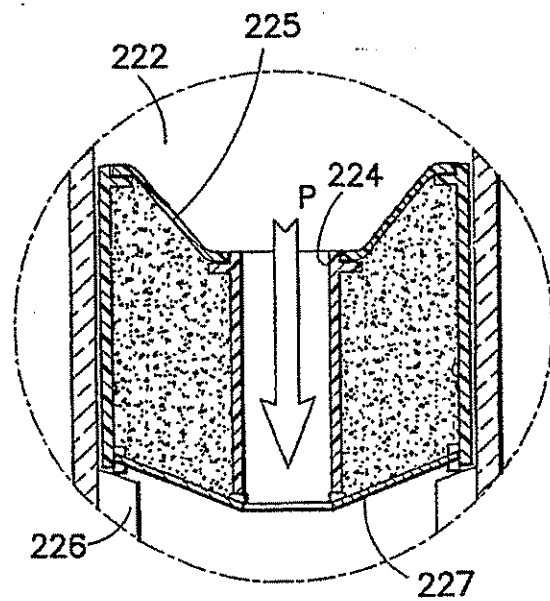


FIG. 13C

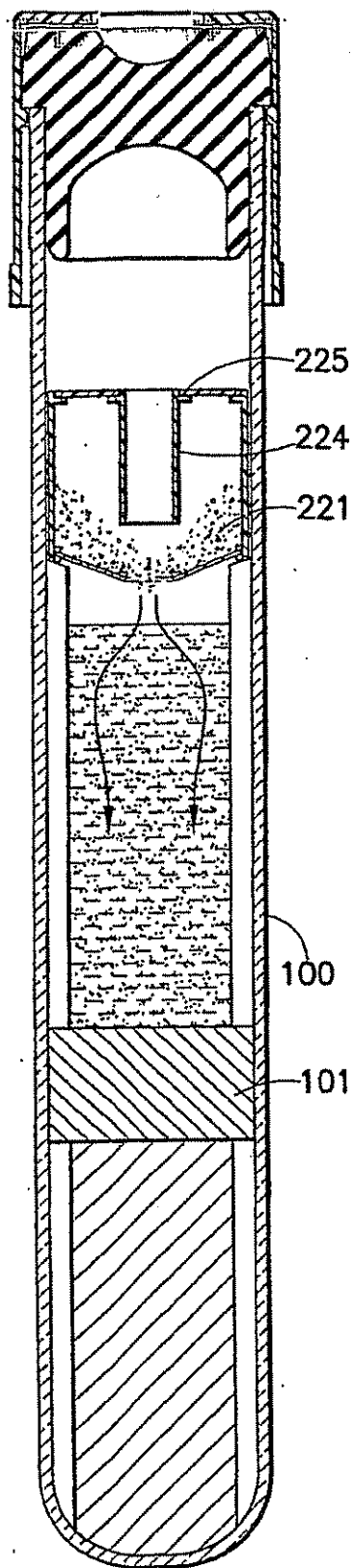


FIG. 13D

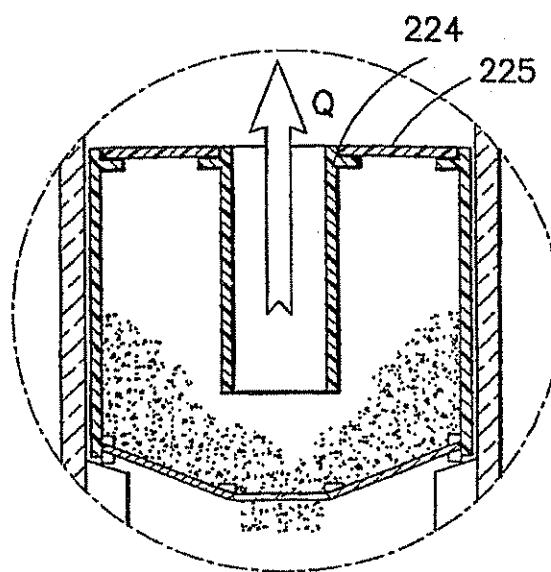


FIG. 13E

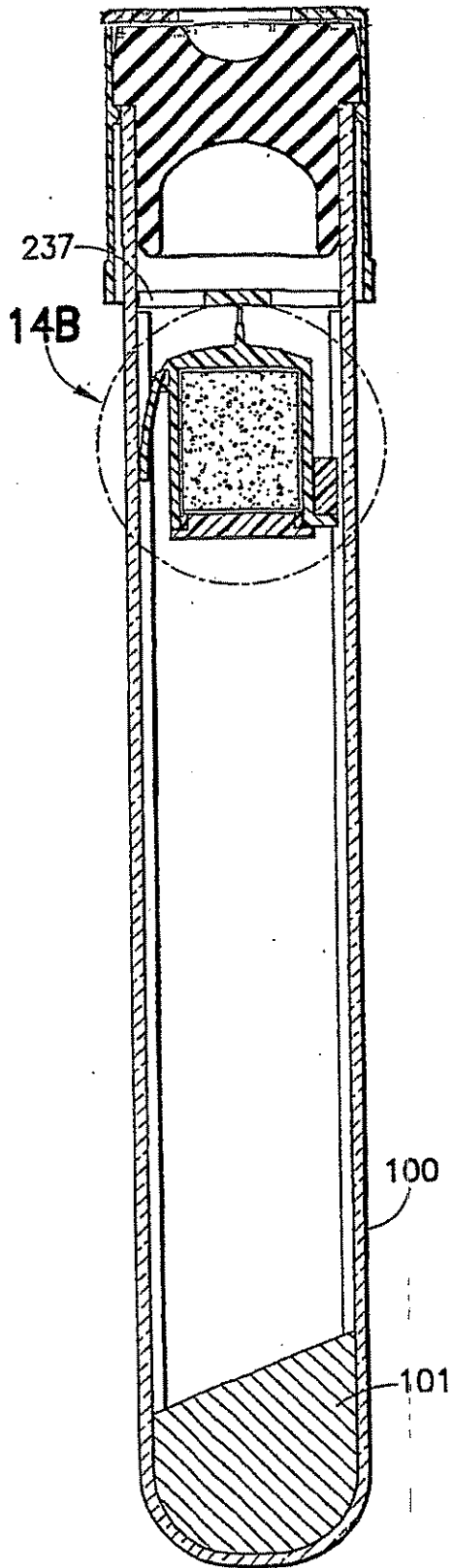


FIG. 14A

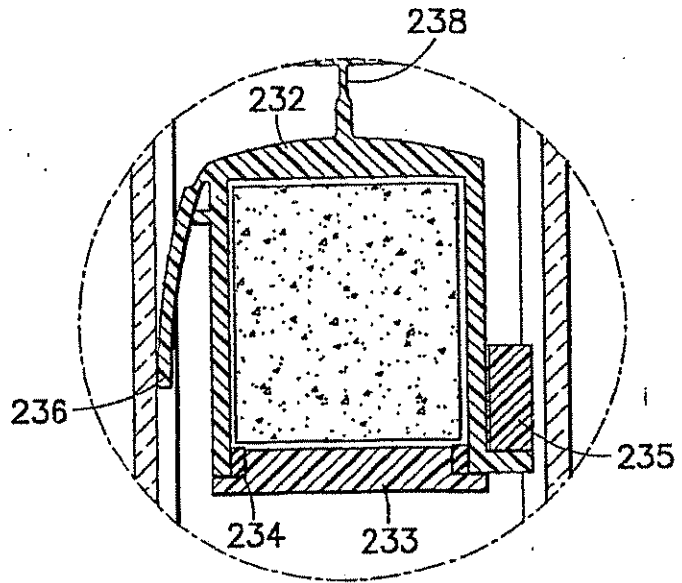


FIG. 14B

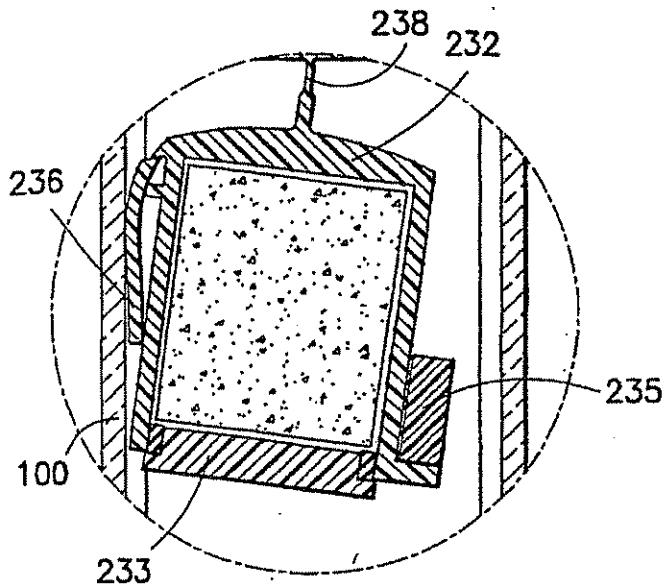


FIG. 14C

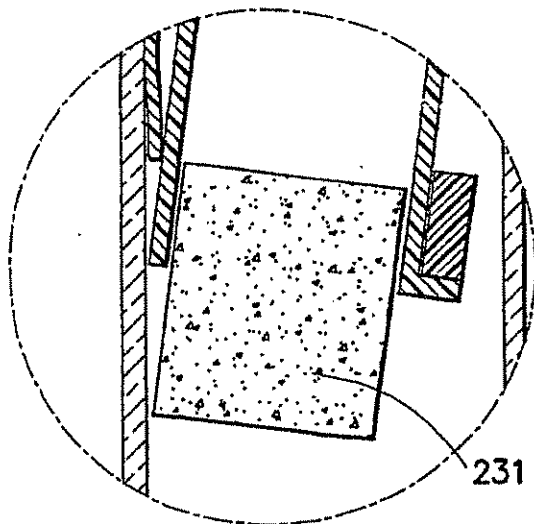


FIG. 14D

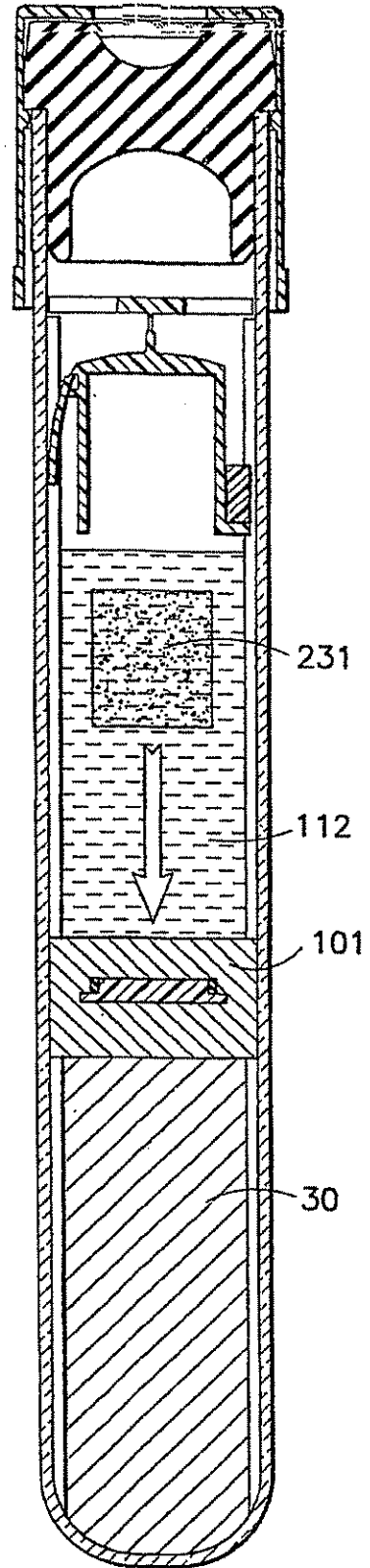


FIG. 14E

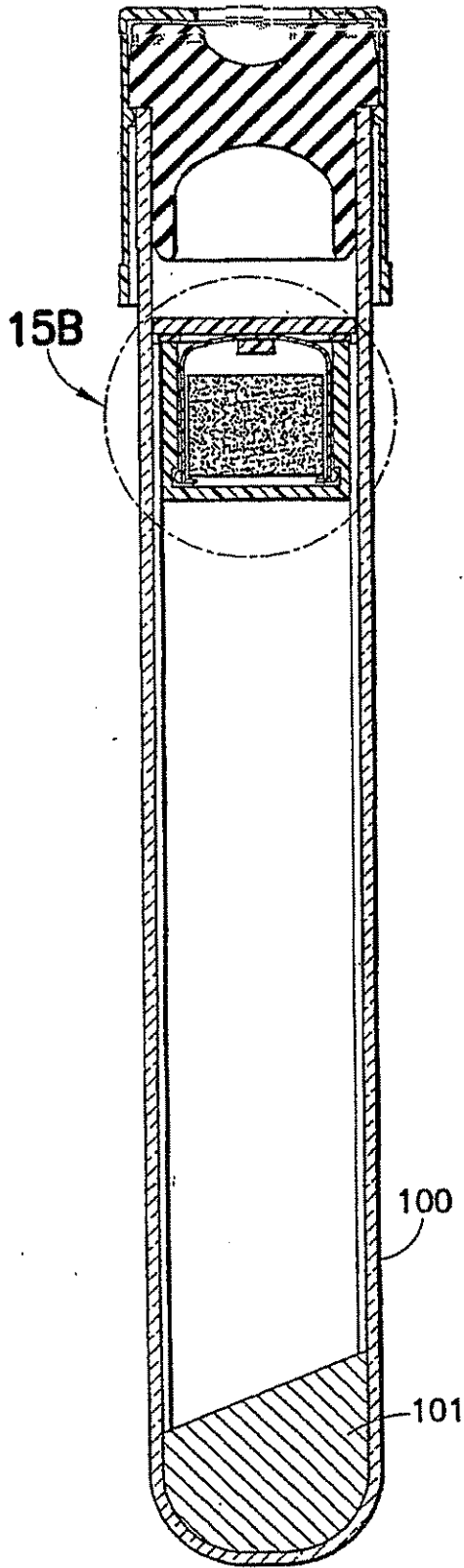


FIG. 15A

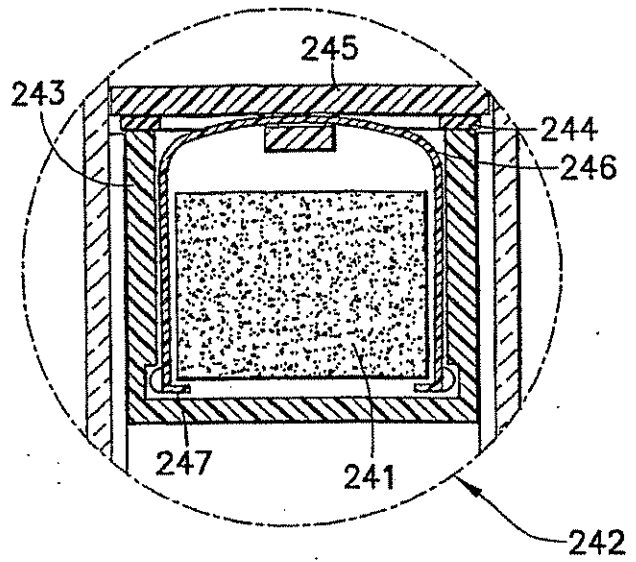


FIG. 15B

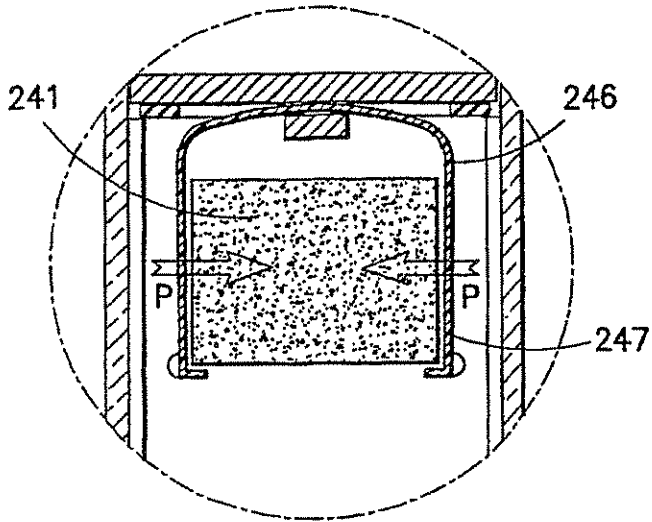


FIG. 15C

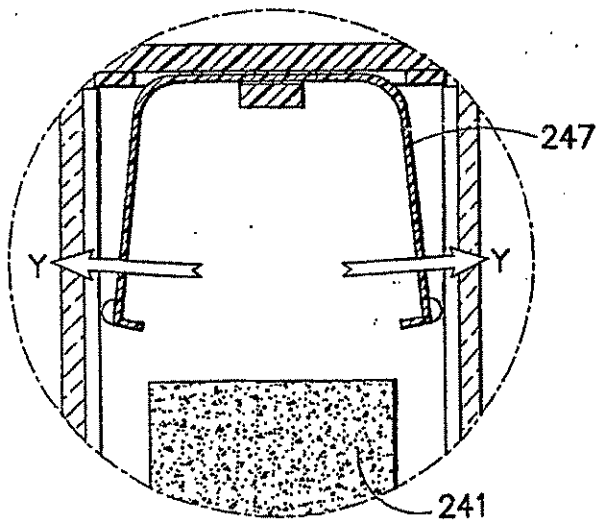


FIG. 15D

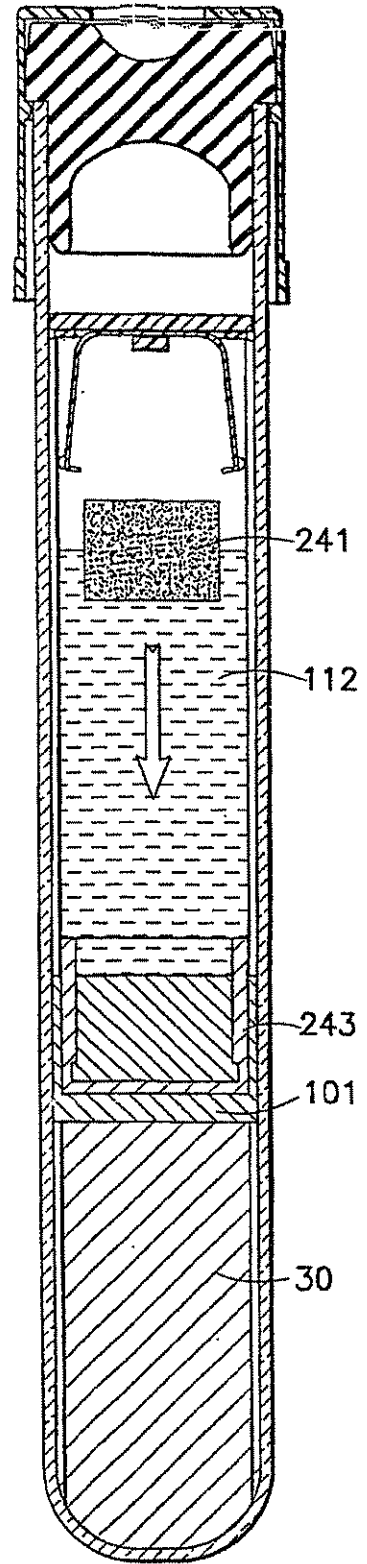


FIG. 15E

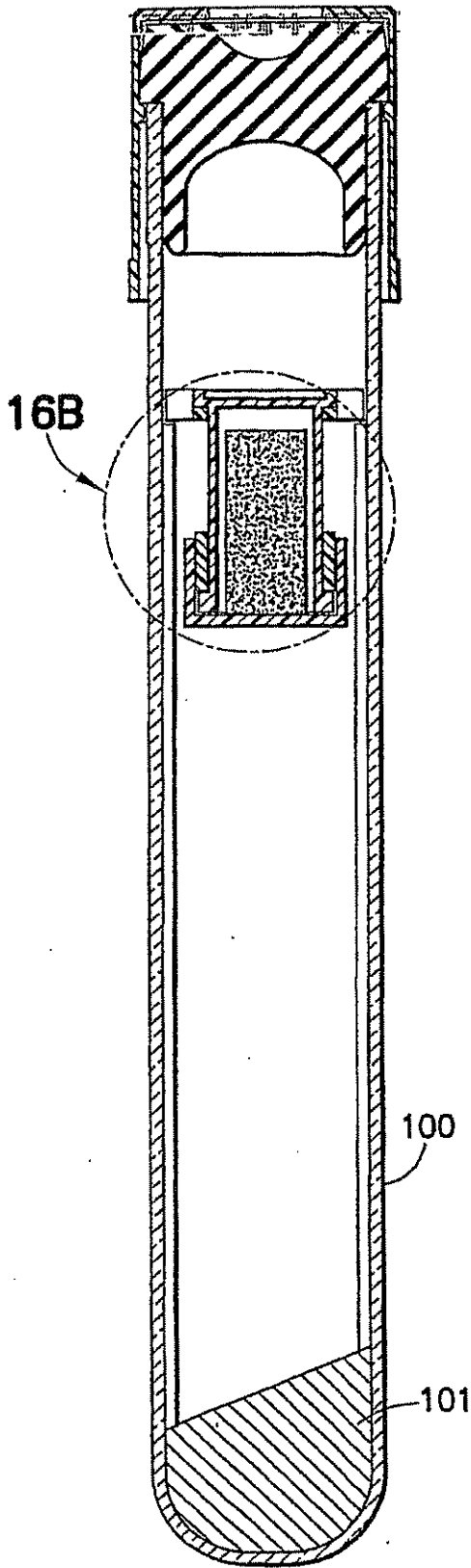


FIG. 16A

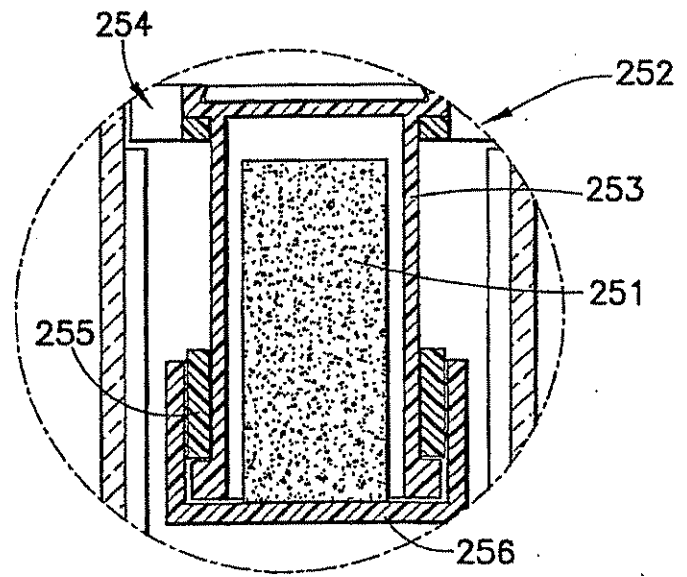


FIG. 16B

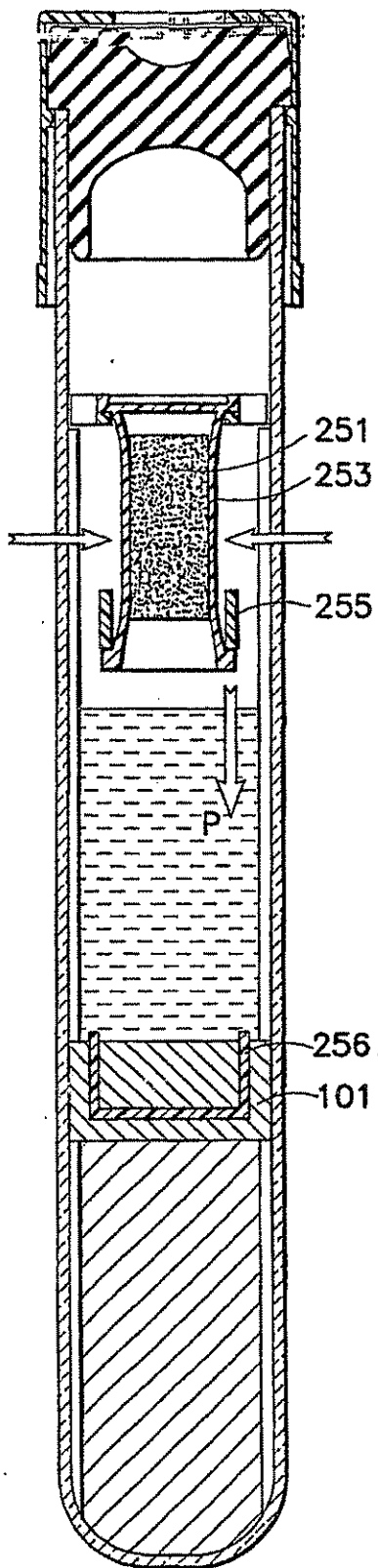


FIG. 16C

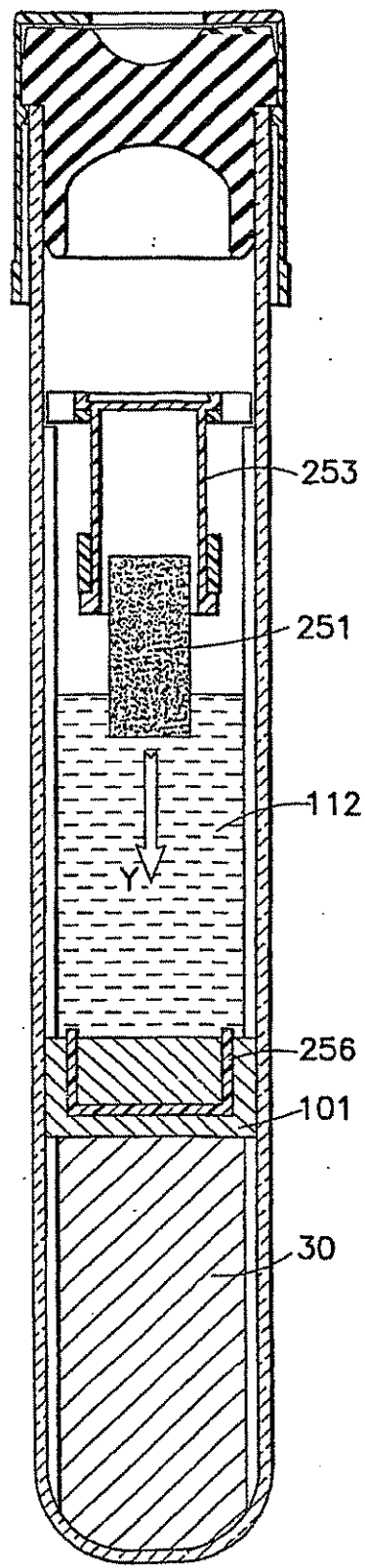


FIG. 16D

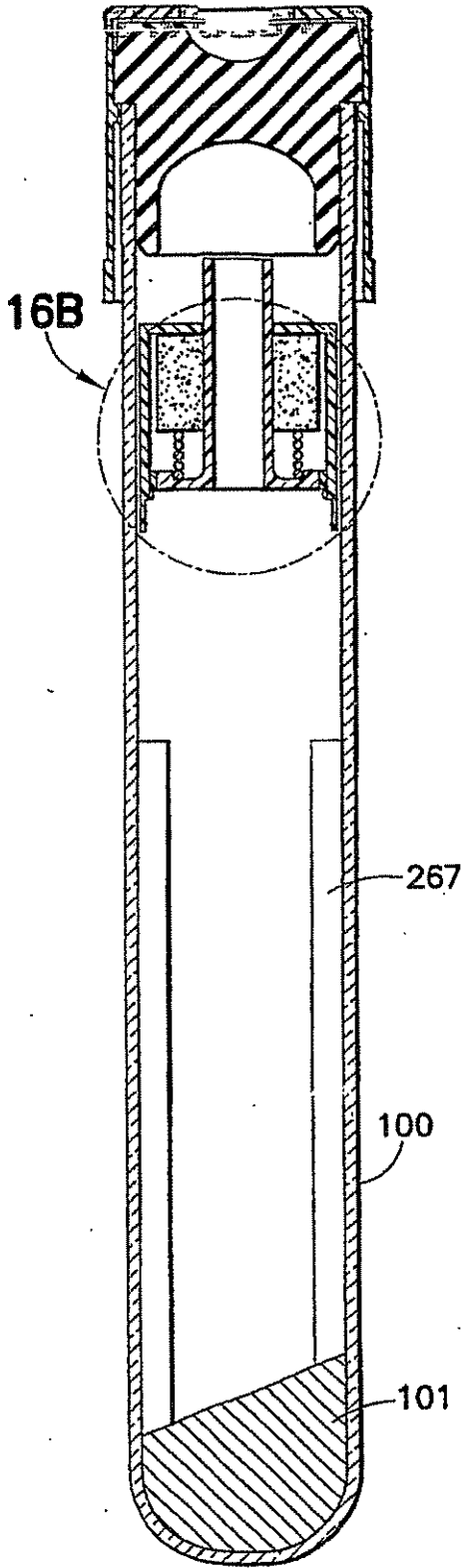


FIG. 17A

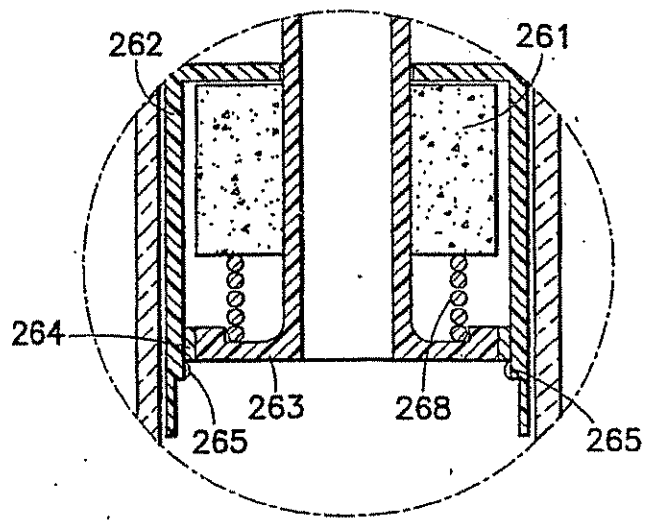


FIG. 17B

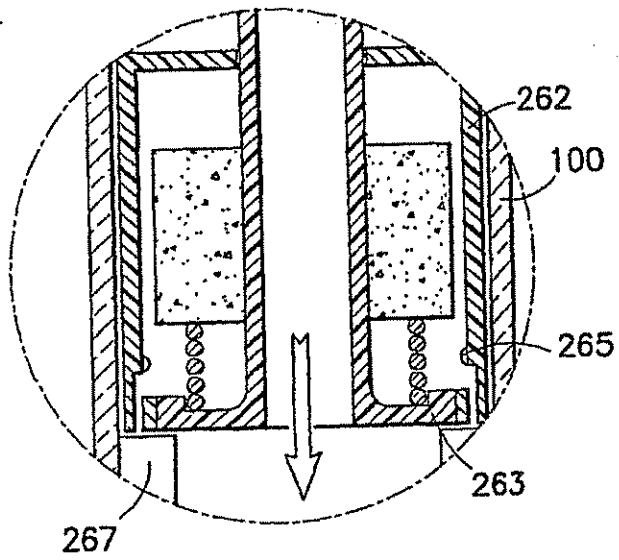


FIG. 17C

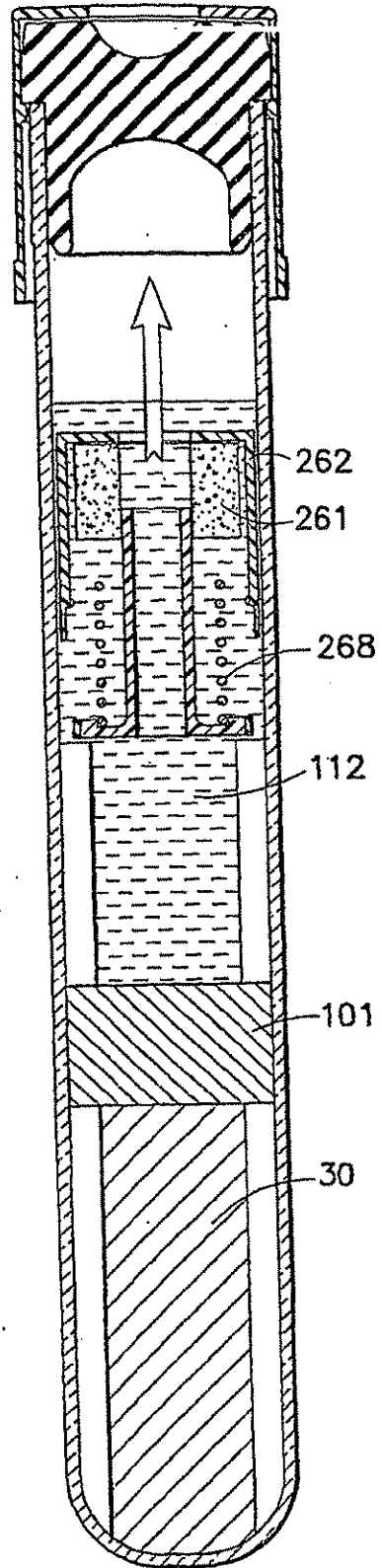


FIG. 17D

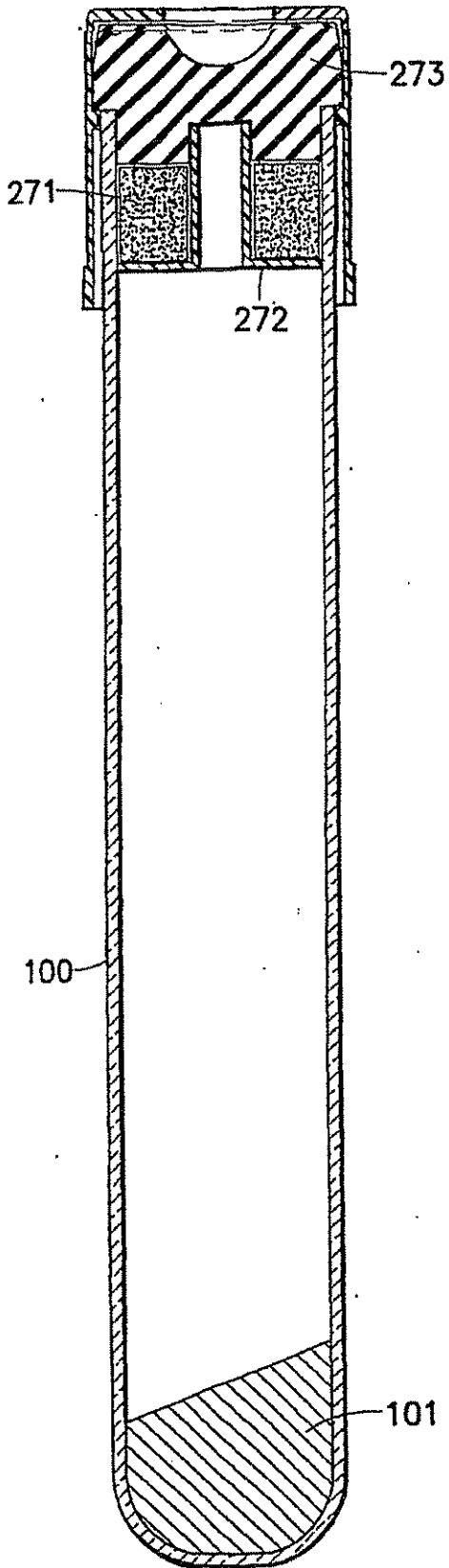


FIG. 18A

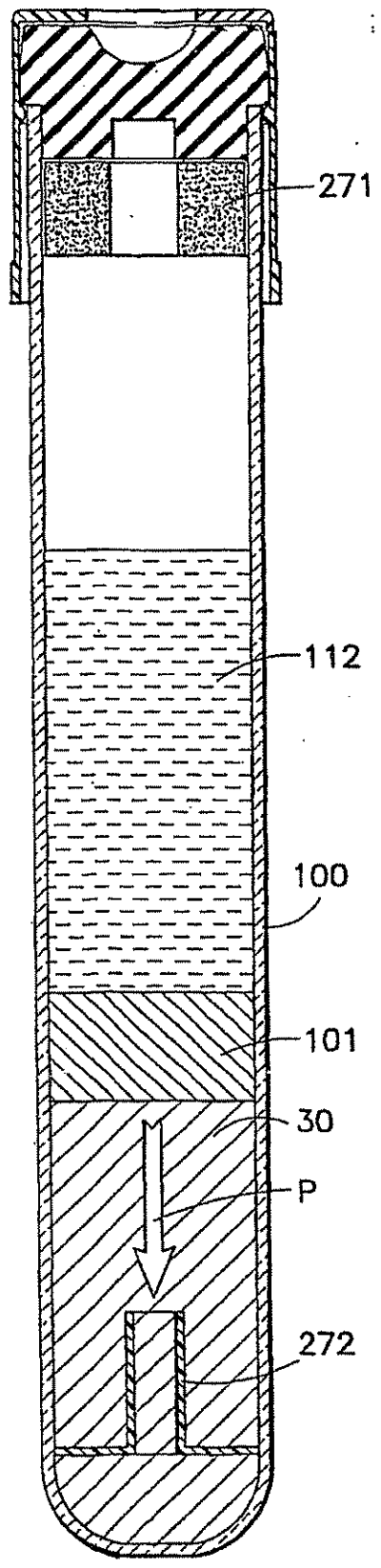


FIG. 18B

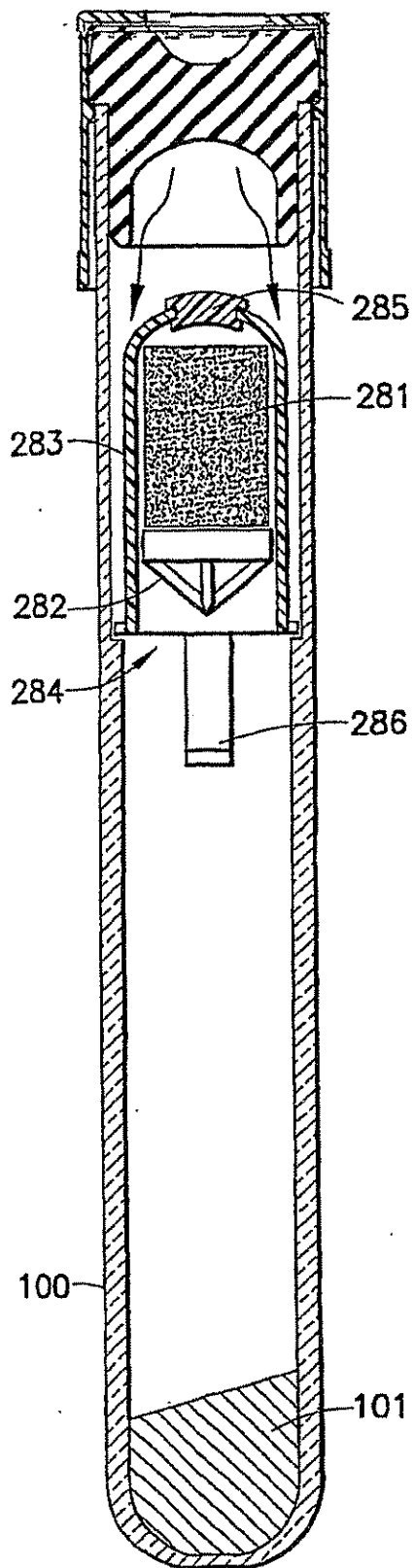


FIG. 19A

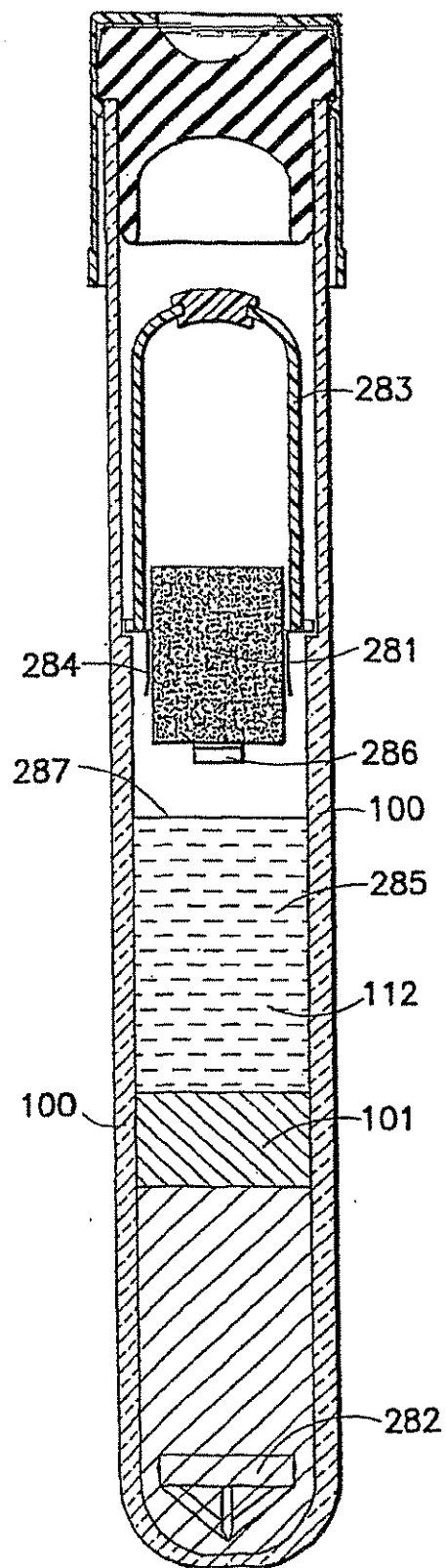


FIG. 19B

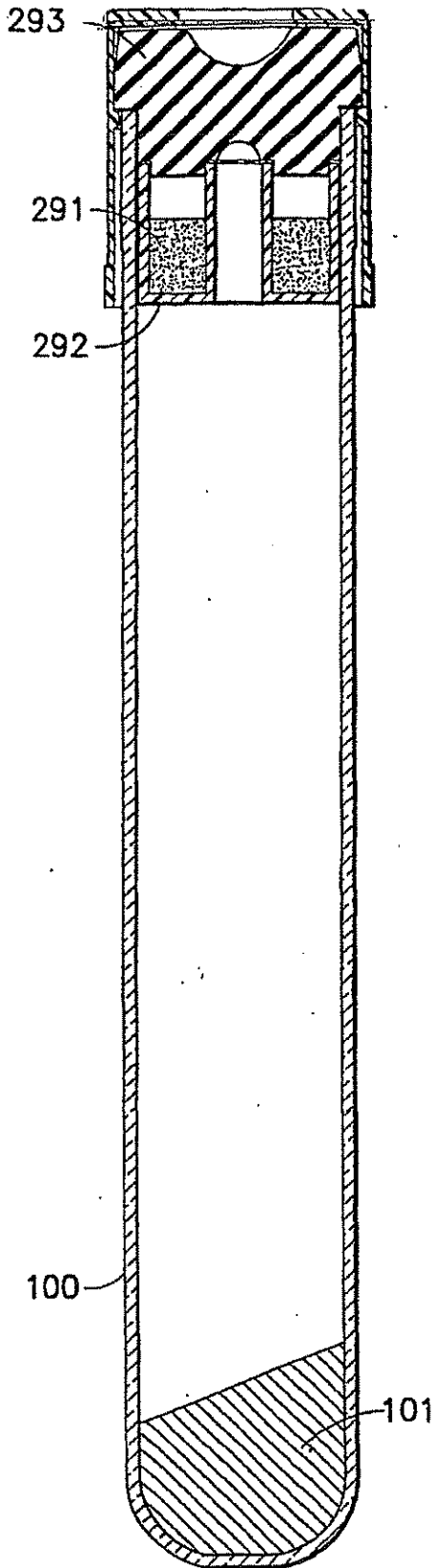


FIG. 20A

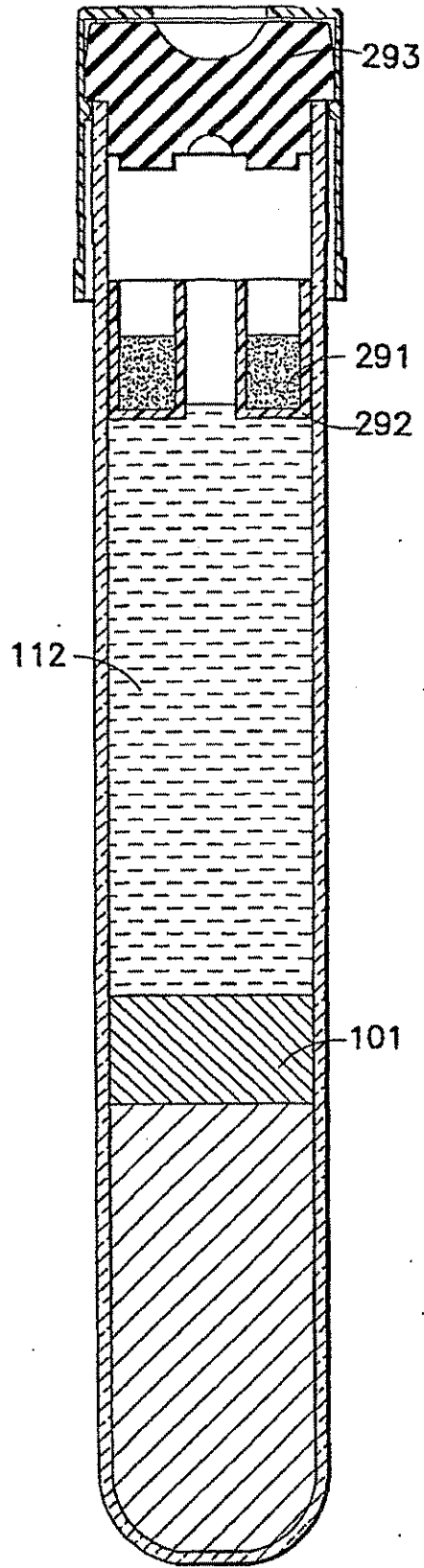


FIG. 20B

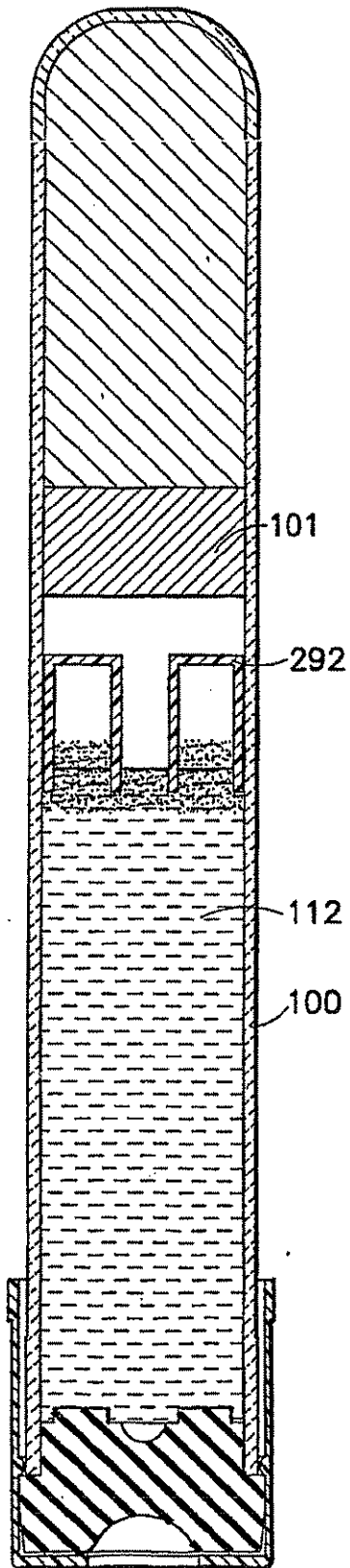


FIG.20C

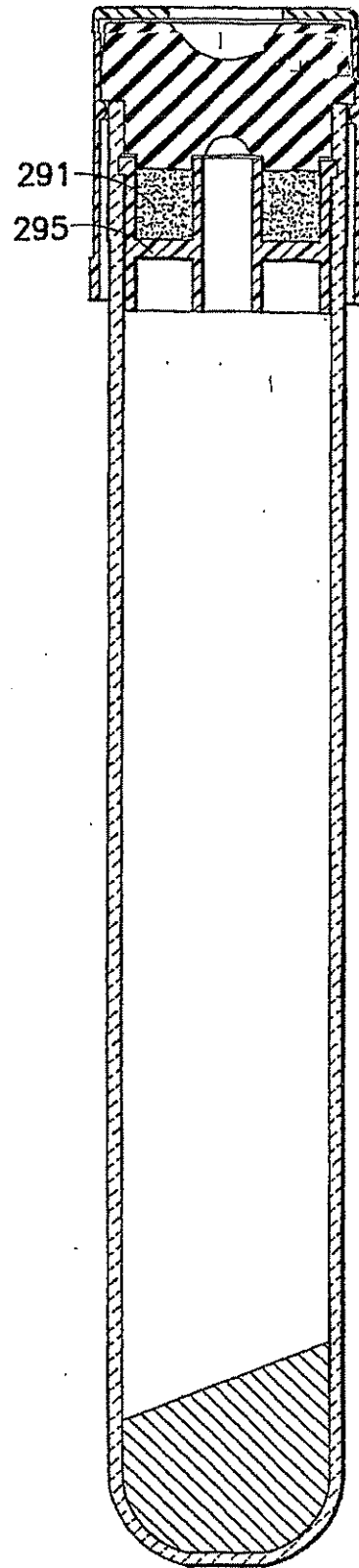


FIG.20D

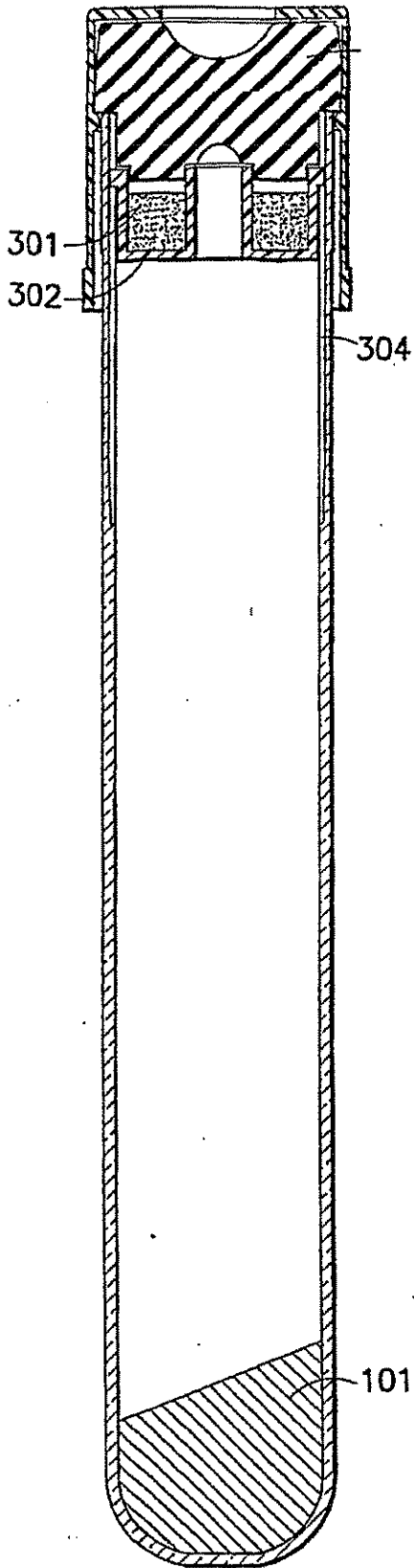


FIG. 21A

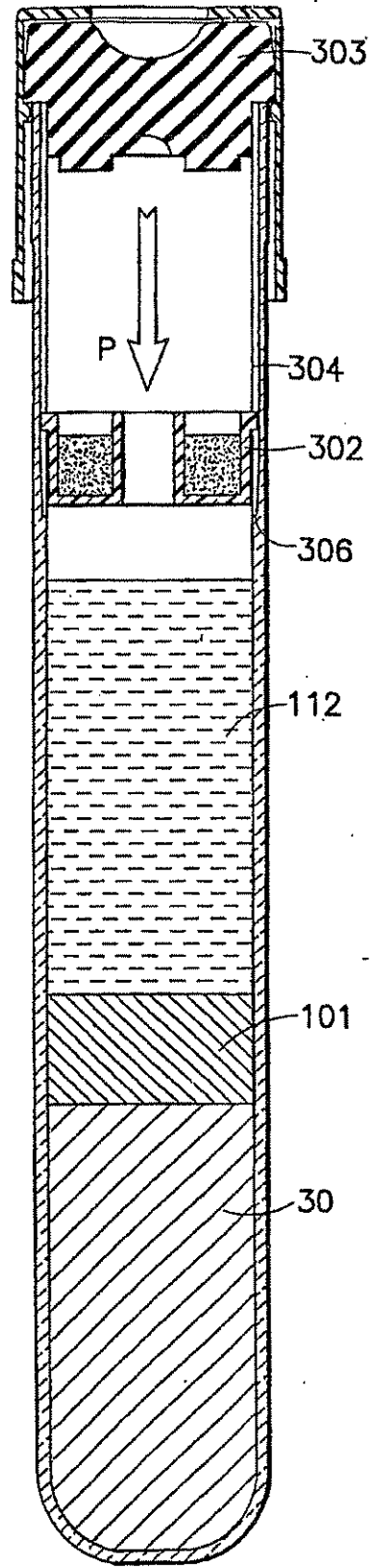


FIG. 21B

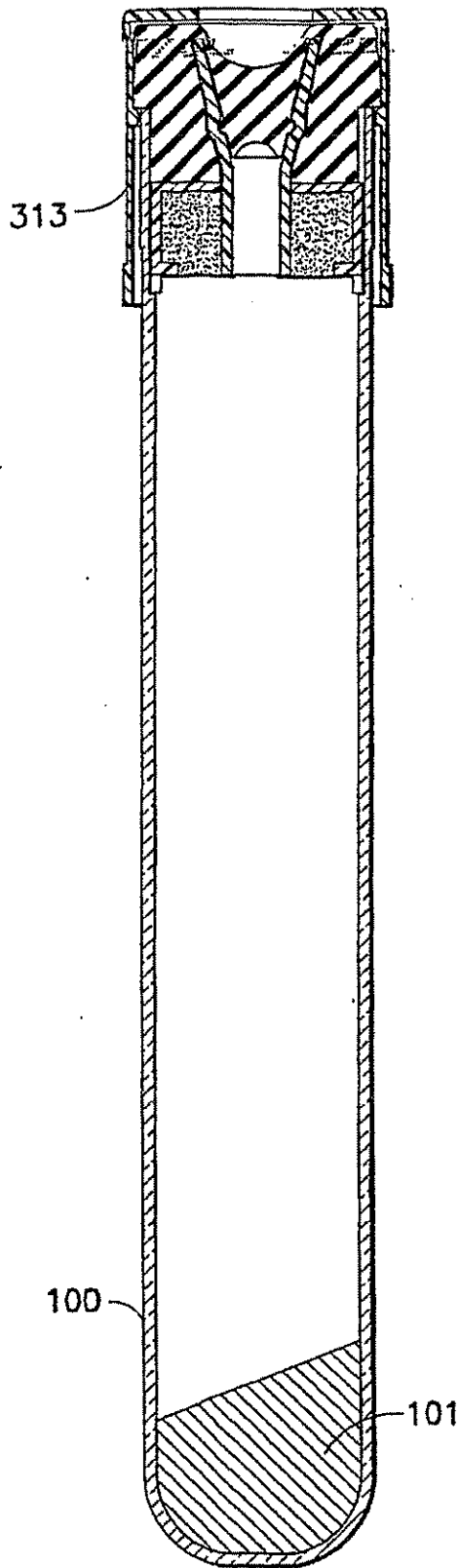


FIG. 22A

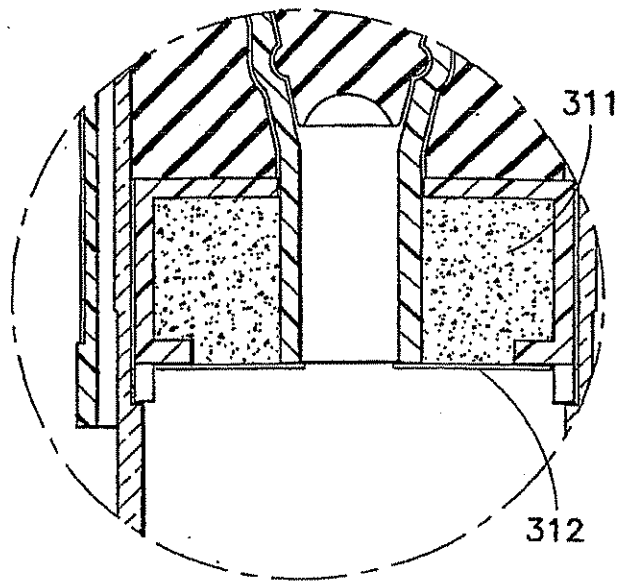


FIG. 22B

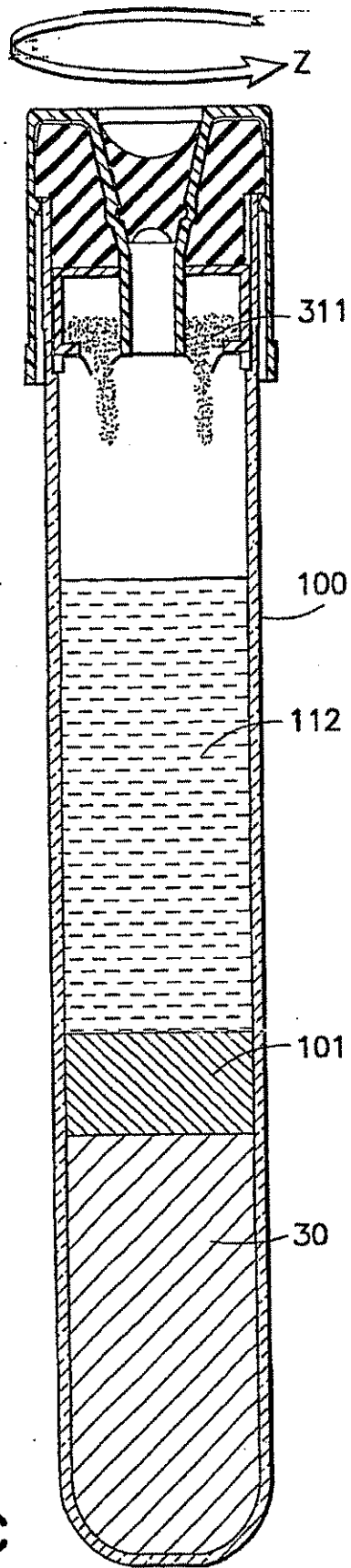


FIG.22C