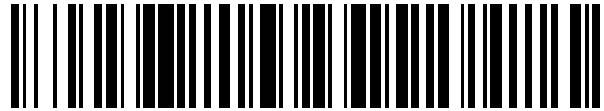


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 898 510**

51 Int. Cl.:

B01L 3/02 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)
B01F 11/00 (2006.01)
B01F 13/00 (2006.01)
B01F 13/08 (2006.01)
B01L 7/00 (2006.01)
G01N 1/38 (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01)
G01N 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2016 PCT/US2016/043855**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2017 WO17019598**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2016 E 16831187 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.08.2021 EP 3331451**

54 Título: **Dispositivo de extracción de muestra y métodos de uso del mismo**

30 Prioridad:

24.07.2015 US 201562196816 P
01.12.2015 US 201562261577 P
04.05.2016 US 201662331635 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2022

73 Titular/es:

NOVEL MICRODEVICES, INC. (100.0%)
1363 Chestnut Avenue
Annapolis, MD 21403, US

72 Inventor/es:

PAIS, ANDREA MARIA, DOMINIC;
PAIS, ROHAN JOSEPH, ALEXANDER y
ZHOU, CHELSEA, QINJIE

74 Agente/Representante:

BALLESTER INTELLECTUAL PROPERTY S.L.P.U

ES 2 898 510 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

Dispositivo de extracción de muestra y métodos de uso del mismo

ANTECEDENTES

5 **[0001]** Los hisopos se utilizan principalmente como dispositivos de recogida de muestras biológicas. Mientras que los hisopos como los FLOQSwabs™ de COPAN están diseñados para que toda la muestra permanezca cerca de la superficie para una elución rápida y completa, es necesario utilizar fuerzas físicas para maximizar la elución de la muestra en el medio de transferencia o el tampón. Normalmente, en los laboratorios se utiliza la agitación manual agitando enérgicamente el hisopo en el medio de transporte o mezclando con agitador vórtex para maximizar la elución de la muestra desde el hisopo a la solución. El hisopo se exprime manualmente y la solución que contiene la muestra se pipetea a continuación y se sigue procesando en función del tipo de ensayo.

15 **[0002]** En los puntos de atención (POC, por sus siglas en inglés) y en los entornos con pocos recursos, la mezcla con agitador vórtex de las muestras no es un método conveniente para la elución de las muestras en un medio líquido y la agitación manual puede dar lugar a incongruencias entre operadores. Además, como los hisopos son absorbentes, se pierde una cantidad finita de muestra en la solución al permanecer en el hisopo. En los casos en los que el analito está presente en concentraciones muy bajas, esto puede dar lugar a una reducción de la sensibilidad debido a cantidades insuficientes de analito que se eluyen del hisopo a la solución.

20 **[0003]** En los sistemas microfluídicos en los que los volúmenes de reactivo se reducen al mínimo, concentrar más analito en un volumen más pequeño permite añadir más analito al sistema en el mismo volumen. Sin embargo, en estos sistemas microfluídicos es necesario exprimir el líquido de los hisopos para maximizar la cantidad de muestra extraída del hisopo.

25 **[0004]** En consecuencia, se necesitan dispositivos y métodos mejorados para la extracción de muestras.

30 **[0005]** En el documento US 2015/076008 (DNA Electronics Ltd.), se describe un cartucho y un método para manipular una muestra de fluido que se va a analizar con un biosensor. El cartucho comprende un alojamiento, un chip semiconductor con una serie de sensores integrados en él, un bloque de sellado separado del chip para formar un espacio entre ellos y una serie de pocillos abiertos por un lado para recibir las muestras. El bloque de sellado y el chip están dispuestos para moverse uno respecto al otro entre una posición de no sellado y una posición de sellado para cerrar el espacio con el fin de aislar los pocillos entre sí. El método comprende proporcionar un dispositivo de preparación de muestras acoplado al cartucho; hacer funcionar el dispositivo de preparación de muestras para dispensar la muestra de fluido en el cartucho de detección; y desacoplar el cartucho de detección del dispositivo de preparación de muestras, durante cuya acción el bloque de sellado y el chip se mueven uno respecto al otro entre una posición de no sellado y una posición de sellado para cerrar el espacio con el fin de aislar los pocillos entre sí.

35 **[0006]** En el documento DE 102010036216 (Microfluidic Chipshop GMBH), se describe un dispositivo para la transferencia de muestras recogidas por aparatos de toma de muestras a plataformas fluidicas. El dispositivo consiste en una unidad de toma de muestras, que consiste en una varilla de toma de muestras con una almohadilla de soporte de muestra unida y un tapón de sellado en la varilla de toma de muestras, así como una unidad de recipiente de transferencia que contiene el propio recipiente de transferencia, y un cierre superior e inferior del recipiente de transferencia.

SUMARIO

40 **[0007]** La invención es tal y como se define en las reivindicaciones 1 a 14. De acuerdo con la presente invención, se dan a conocer varias realizaciones de dispositivos de extracción de muestra y métodos de uso del mismo. Se proporciona un dispositivo de extracción de muestra, que comprende:

- 40 una varilla de hisopo que comprende un primer extremo, un tope y un segundo extremo;
- una tapa unida al primer extremo de la varilla de hisopo, donde la tapa puede deslizarse a lo largo de la varilla de hisopo;
- una junta tórica de compresión en el interior de la tapa;
- una punta de hisopo en el segundo extremo de la varilla de hisopo; y
- 45 un recipiente de extracción de muestra que comprende un medio líquido y una estructura de compresión, donde la estructura de compresión comprende una abertura más pequeña que la punta de hisopo;
- donde la tapa está configurada para acoplarse al recipiente de extracción de muestra y
- el tope está configurado para entrar en contacto con la parte inferior de la tapa cuando la varilla de hisopo se extrae por deslizamiento a través de la tapa; y
- 50 donde la junta tórica está configurada para ser comprimida al apretar la tapa en el recipiente de extracción de muestra, con el fin de sellar la tapa contra el recipiente de extracción de muestra y la varilla de hisopo.

[0008] En algunas realizaciones del dispositivo de extracción de muestra de la presente invención, la tapa es una tapa con cierre de rosca o una tapa de ajuste a presión. En otras realizaciones, la estructura de compresión es una junta tórica. En otras realizaciones, el medio líquido está situado entre dos juntas frangibles.

5 **[0009]** En otras realizaciones, el recipiente de extracción de muestra comprende, además, un puerto de salida. En otras realizaciones, el puerto de salida está conectado fluidicamente a un dispositivo microfluídico por medio de un conector de ajuste. En otras realizaciones, el conector de ajuste es un luer, una rosca, una conexión a presión o un ajuste a presión. En otras realizaciones, el dispositivo microfluídico comprende una estructura afilada que puede romper una junta frangible en el recipiente de extracción de muestra para permitir la transferencia del medio líquido al dispositivo microfluídico. En otras realizaciones, el dispositivo de extracción de muestra comprende, además, una válvula de retención entre el
10 recipiente de extracción de muestra y el dispositivo microfluídico para impedir el reflujo del medio líquido. En otras realizaciones, el dispositivo microfluídico comprende, además, un filtro, una membrana semipermeable o una membrana porosa para filtrar materiales indeseables. En otras realizaciones, el dispositivo microfluídico comprende, además, un cartucho microfluídico con reactivos almacenados a bordo en bolsas de reactivo, una tira de flujo lateral de ácido nucleico integrada para la detección, y uno o más elementos actuadores.

15 **[0010]** En otras realizaciones, el dispositivo de extracción de muestra comprende, además, un calentador con forma de anillo que forma una cubierta con encamisado alrededor del recipiente de extracción de muestra. En otras realizaciones, el calentador es un elemento calefactor por resistencia que comprende una resistencia incrustada en un bloque de material de conductividad térmica. En otras realizaciones, el calentador es un calentador resistivo de película fina o un elemento Peltier. En otras realizaciones, el calentador es un elemento autorregulador de coeficiente de temperatura positivo. En
20 otras realizaciones, el calentador comprende un material de cambio de fase en una bolsa sellada.

[0011] En otras realizaciones, la estructura de compresión comprende una cubierta estrecha, donde la cubierta estrecha está configurada para formar un ajuste apretado alrededor de la cabeza de hisopo y, de esta manera, deformar y comprimir la cabeza de hisopo cuando se inserta en la estructura de compresión. En otras realizaciones, el medio líquido está
25 conectado fluidicamente a la parte superior de la cubierta a través de un canal. En otras realizaciones, la estructura de compresión comprende una junta tórica y el recipiente de extracción de muestra comprende un émbolo de pistón. En otras realizaciones, el recipiente de extracción de muestra comprende, además, una mano de mortero accionada por resorte y una rejilla.

[0012] Se proporciona un método para la extracción de muestra de una punta de hisopo que comprende el uso de cualquiera del dispositivo de extracción de muestra descrito en la presente memoria que comprende las etapas siguientes:

- 30 a. insertar la punta de hisopo en el recipiente de extracción de muestra;
- b. presionar la punta de hisopo a través de la estructura de compresión y hacia el medio líquido;
- c. deslizar la tapa a lo largo de la varilla de hisopo y cerrar la tapa, de tal manera que se forme un cierre hermético entre la varilla de hisopo y el recipiente de extracción de muestra;
- d. tirar de la punta de hisopo hasta que el tope haga contacto con el interior de la tapa; y
- 35 e. conectar el dispositivo de extracción de muestra a una entrada de un dispositivo microfluídico. En algunas realizaciones, las etapas (c) y (d) se repiten una o más veces.

[0013] En otras realizaciones, la varilla de hisopo de cualquiera de los dispositivos de extracción de muestra descritos en la presente memoria es una varilla de hisopo rompible que comprende un punto de ruptura marcado.

40 **[0014]** Se proporciona un método para la extracción de muestra de una punta de hisopo que comprende el uso de los dispositivos de extracción de muestra descritos en el presente documento que comprenden una varilla de hisopo rompible que comprende un punto de ruptura marcado, donde el método comprende las etapas de:

- a. abrir la tapa del recipiente de extracción de muestra;
- b. insertar la punta de hisopo a través de la estructura de compresión y hacia el medio líquido;
- c. sacar la punta de hisopo a través de la estructura de compresión;
- 45 d. romper la varilla de hisopo rompible en el punto de ruptura marcado y dejar que la punta de hisopo descansa sobre la estructura de compresión;
- e. cerrar la tapa del recipiente de extracción de muestra; y
- f. conectar el dispositivo de extracción de muestra a una entrada de un dispositivo microfluídico. En algunas realizaciones, las etapas (b) y (c) se repiten una o más veces.

50 **[0015]** Habiéndose expuesto anteriormente ciertos aspectos del objeto descrito en el presente documento, que son abordados total o parcialmente mediante el objeto descrito en el presente documento, resultarán evidentes otros aspectos conforme avance la descripción cuando se adopten en relación con los ejemplos y las figuras que los acompañan, que se describen mejor a continuación en el presente documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0016] Habiéndose descrito así el objeto descrito en el presente documento en términos generales, se hará referencia ahora a las figuras adjuntas, que no están necesariamente dibujadas a escala.

- 5 La figura 1 muestra vistas en sección y detalladas de un dispositivo de extracción de muestra ilustrativo para la extracción de muestra de hisopo.
- La figura 2 muestra una secuencia de etapa tras etapa ilustrativa para la extracción de muestra de una muestra de hisopo.
- La figura 3 muestra una secuencia de etapa tras etapa ilustrativa para la extracción de muestra de un hisopo con una varilla rompible.
- 10 La figura 4 muestra una vista lateral de un recipiente de extracción de muestra ilustrativo conectado a un dispositivo microfluídico con un calentador integrado.
- La figura 5 muestra un esquema de un recipiente de extracción de muestra con una cubierta ajustada para comprimir y deformar un hisopo.
- 15 La figura 6A muestra un esquema de un dispositivo de extracción de muestra con un émbolo de pistón para la extracción de muestra de hisopo.
- La figura 6B muestra la secuencia de etapa tras etapa para la extracción de muestra de hisopo de un dispositivo de extracción de muestra ilustrativo con un émbolo de pistón.
- 20 La figura 7 muestra una representación esquemática de un dispositivo microfluídico integrado para un ensayo de prueba de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT, por sus siglas en inglés) de muestra a respuesta a partir de una muestra de hisopo.
- La figura 8 muestran el principio de transferencia de fluidos en un dispositivo microfluídico, desde un pocillo fluídico hasta una tira de flujo lateral utilizando una lanceta accionada.
- La figura 9 muestra un esquema de una realización de un recipiente de extracción de muestra con mano de mortero accionada por resorte y rejilla para la homogeneización de muestra.

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA

- [0017]** El asunto dado a conocer en el presente documento se describirá ahora de forma más completa en adelante con referencia a las figuras adjuntas, en las que se muestran algunas, aunque no todas las realizaciones del asunto dado a conocer en el presente documento. Los números similares se refieren a elementos similares a lo largo de la descripción. El objeto dado a conocer en el presente documento puede plasmarse de muchas formas diferentes, y no debería interpretarse como limitado a las realizaciones expuestas en el presente documento; en su lugar, estas realizaciones se proporcionan para que esta divulgación cumpla los requisitos legales aplicables. De hecho, a un experto en la materia a la que pertenece el asunto actualmente dado a conocer se le ocurrirán muchas modificaciones y otras realizaciones del objeto divulgado en el presente documento, teniendo la ventaja de las enseñanzas presentadas en las descripciones anteriores y en las figuras asociadas. Por consiguiente, debe entenderse que el objeto dado a conocer en el presente documento no debe limitarse a las realizaciones específicas dadas a conocer, y que las modificaciones y otras realizaciones pretenden incluirse dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

Dispositivo y métodos de extracción de muestra

- 40 **[0018]** La invención divulgada está ideada para extraer el material recogido en una muestra de hisopo. Las muestras de hisopo son un método comúnmente utilizado para recoger el material biológico necesario para pruebas de diagnóstico. Estas muestras podrían recogerse en un momento anterior al de la realización de la prueba o en el momento de la prueba. El material biológico atrapado en el hisopo puede variar en cuanto a viscosidad, sequedad, contenido sólido y adhesión al hisopo.

- 45 **[0019]** En el presente documento se describen métodos y dispositivos para maximizar la elución de muestra de un hisopo durante el procesamiento de muestra biológica. En una realización, el método de preparación de muestra implica, en primer lugar, la inserción del hisopo en un recipiente de extracción de muestra (SEC, por sus siglas en inglés) que contiene un tampón pertinente para la etapa de procesamiento de muestra. Las dimensiones del recipiente se seleccionan de forma que la punta del hisopo pueda sumergirse completamente en el volumen de tampón necesario para realizar el ensayo. Esto hidrata el hisopo y sirve para aflojar el material biológico atrapado en él. Para facilitar la extracción de la muestra del hisopo, el recipiente comprende una o más estructuras en instancias inferiores y en el nivel de líquido del tampón. Las dimensiones y la forma de las estructuras se seleccionan de forma que se ajusten y retengan y compriman la punta de hisopo a medida que se empuja hacia abajo en el SEC y se saca de él. Las dimensiones y la forma de las estructuras en el nivel de líquido están diseñadas de tal manera que forman un ajuste apretado con la punta de hisopo a medida que se mueve a través de ella, exprimiendo así el líquido y el material sólido del hisopo.

[0020] Haciendo referencia a la figura 1, se muestran vistas en sección y detalladas de una unidad de extracción de muestra 101 para la extracción de muestra de hisopo. En una realización, un tapón de rosca o una tapa de ajuste a presión 102 está unida a la varilla de hisopo 103 como se muestra en la sección AA'. Una junta tórica de compresión 104 está presente en el interior de la tapa y la interfaz entre la varilla de hisopo y la tapa. El hisopo puede insertarse en el recipiente de extracción de muestra 107 que contiene un medio líquido o tampón para eluir la muestra allí. La tapa sobre la varilla de hisopo puede deslizarse hacia arriba y hacia abajo en la varilla. Cuando se aprieta la tapa, la junta tórica se aplasta para crear un cierre hermético con el recipiente de extracción de muestra y la varilla de hisopo. La muestra que debe extraerse está presente en la punta de hisopo 105. Como se muestra en el detalle A, el recipiente de extracción de muestra tiene una estructura de compresión 112 con una abertura más pequeña que la punta de hisopo, de manera que la punta de hisopo se deforma y se comprime y a medida que es empujada a través de ella. Esto obliga a la muestra recogida a desprenderse del hisopo y eluir en la solución contenida en la unidad inferior 108 del recipiente de extracción de muestra. Un ejemplo no limitante de la forma de la estructura de compresión se muestra en el detalle B. En algunas realizaciones, la estructura de compresión puede ser una junta tórica. La estructura de compresión puede diseñarse basándose en la forma, la estructura y el material del hisopo. Para extraer la muestra de la punta de hisopo, el usuario coloca el hisopo en el recipiente de extracción de hisopo, cierra la tapa deslizante y tira de la varilla de hisopo hasta que el tope 106 hace contacto con la parte inferior de la tapa. El fondo del recipiente de extracción de muestra está sellado con un material de junta frangible o perforable 109 y puede tener un accesorio con un puerto de salida 110 que permite conectarlo a una unidad fluidica, como un cartucho microfluidico, para su posterior procesamiento. En algunas realizaciones puede haber una junta frangible superior 111, de manera que el medio líquido dentro del recipiente de extracción de muestra se almacena dentro del volumen entre las dos juntas frangibles. Esto sirve para evitar el movimiento y la adherencia del líquido a la tapa y las paredes durante el envío, el transporte y antes de su uso, y para restringir el medio líquido al fondo del recipiente de extracción de muestra. La junta frangible puede ser rota por el hisopo, para liberar su contenido líquido cuando el hisopo se inserta en el recipiente de extracción de muestra.

[0021] En referencia a la figura 2, se muestra una secuencia de etapa tras etapa 201 para la extracción de muestra de una muestra de hisopo. Etapa 1 - el hisopo se inserta en el recipiente de extracción de muestra; Etapa 2 - el hisopo se empuja hacia abajo a través de la estructura de compresión en la solución contenida en el fondo del recipiente de extracción de muestra. Esto también hace que la solución se desplace desde el fondo y suba para sumergir e hidratar completamente la punta de hisopo. Etapa 3 - la tapa unida a la varilla de hisopo se desliza hacia abajo y se cierra para formar un cierre hermético entre la varilla de hisopo y el recipiente de extracción de muestra. Etapa 4 - el hisopo se extrae hasta que el tope hace contacto con el fondo de la tapa. Esto hace que el hisopo se comprima para evitar que absorba la solución que contiene la muestra, en la que fue sumergido e hidratado. Las etapas 3 y 4 pueden repetirse varias veces si es necesario para maximizar la eficacia de la elución de muestra y también pueden funcionar para homogeneizar la muestra. Etapa 5 - el dispositivo de extracción de muestra se conecta entonces a una entrada del dispositivo microfluidico 202 a través de un accesorio 203 del dispositivo microfluidico.

[0022] En una realización alternativa, se puede utilizar un hisopo con una varilla rompible. En la figura 3, se representa una secuencia de etapa tras etapa 301 para la extracción de muestra de un hisopo con una varilla rompible. Etapa 1 - se abre la tapa del recipiente de extracción de muestra. Etapa 2 - el hisopo se inserta completamente en el recipiente de extracción de muestra a través de la estructura de compresión. Etapa 3: se tira del hisopo hacia arriba a través de la estructura de compresión. Las etapas 2 y 3 pueden repetirse varias veces si es necesario para homogeneizar la muestra. Después de exprimir el hisopo, se rompe la varilla por el punto de ruptura marcado 302 en la etapa 4 y se cierra la tapa del recipiente de extracción de muestra en la etapa 5. El hisopo se sitúa por encima de la estructura de compresión y no entra en contacto con la solución que se encuentra debajo. El recipiente de extracción de muestra se conecta, a continuación, al dispositivo microfluidico para permitir la transferencia de su contenido al mismo.

[0023] Como se observa en la figura 4, el puerto de salida de la cámara de extracción de hisopo realiza una conexión fluidica con el dispositivo microfluidico 401 a través de un conector de ajuste 402, como un luer, una rosca, una conexión a presión o un ajuste a presión. El dispositivo microfluidico puede contener una estructura afilada, como una aguja o un alfiler, que puede romper o perforar el material frangible del fondo del recipiente de extracción de muestra para permitir que su contenido sea transferido al dispositivo microfluidico. Alternativamente, las fuerzas de torsión o presión aplicadas al conectar el recipiente de extracción de muestra al accesorio del dispositivo microfluidico pueden romper el material frangible que lo sella. Una válvula de retención 406 puede estar presente en el dispositivo microfluidico en la interfaz entre el recipiente de extracción de muestra y el conducto fluidico 403 que se conecta a un pocillo fluidico 405, con el fin de evitar el reflujo del contenido. En algunas realizaciones, puede haber un filtro, una membrana semipermeable o una membrana porosa en el dispositivo microfluidico para filtrar materiales indeseables en el recipiente de extracción de muestra que pueden inhibir la entrada del ensayo de diagnóstico posterior en el dispositivo microfluidico. El filtro o la membrana pueden situarse en cualquier lugar del dispositivo microfluidico en la trayectoria entre la entrada del recipiente de extracción de muestra en el dispositivo microfluidico y la salida del conducto fluidico en un pocillo fluidico 405.

[0024] Mover fluidos en un dispositivo microfluidico es una tarea difícil, que requiere el uso de bombas sofisticadas y actuadores. En una realización ilustrativa, puede utilizarse energía térmica para presurizar el recipiente de extracción de muestra, lo que hace que la muestra se transfiera al dispositivo microfluidico. El calentamiento al mismo tiempo también puede utilizarse para lisar las células y liberar los ácidos nucleicos para las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) posteriores, así como para desactivar los inhibidores presentes en la muestra. En algunas realizaciones, puede

haber una válvula en el dispositivo microfluídico que puede accionarse para transferir la muestra desde el recipiente de extracción de muestra al dispositivo microfluídico. Esta válvula adicional es ventajosa cuando la muestra necesita ser calentada durante un período de tiempo predefinido antes de que pueda ser transferida al dispositivo microfluídico. La presión acumulada en el recipiente de extracción de muestra funciona entonces para empujar la muestra hacia el dispositivo microfluídico cuando se acciona la válvula. Como se ve en la figura 8, un calentador en forma de anillo ilustrativo 404 está presente en la interfaz del dispositivo microfluídico y el recipiente de extracción de muestra. El calentador forma una cubierta con encamisado alrededor del recipiente de extracción de muestra y es hueco en la parte inferior, lo que permite que el recipiente de extracción de muestra se conecte al dispositivo microfluídico. En una realización, el calentador puede ser un elemento calefactor por resistencia que comprende una resistencia incrustada en un bloque de material de conductividad térmica, como un metal, un óxido de metal o una aleación de metal. El calentador también puede ser un calentador resistivo de película fina o un elemento Peltier. En otras realizaciones, el calentador es un elemento autorregulador de coeficiente de temperatura positivo. El calentador puede estar integrado como parte del dispositivo microfluídico y estar pensado como un elemento desechable de un solo uso. En una realización adicional, puede utilizarse un material de cambio de fase para generar la energía térmica para la lisis y la transferencia de muestra. Los materiales de cambio de fase se utilizan ampliamente para una variedad de aplicaciones que requieren almacenamiento de energía térmica y se han desarrollado para su uso en una amplia gama de temperaturas (entre -40 °C y más de 150 °C). Los materiales de cambio de fase son ventajosos porque ofrecen un almacenamiento de energía de alta densidad y almacenan el calor dentro de un rango de temperatura reducido. Además, son baratos, no son tóxicos y no requieren energía eléctrica para generar calor. Por lo tanto, son una opción atractiva para entornos de punto de atención y para dispositivos de un solo uso que requieren energía térmica. En una realización adicional, se utiliza un material de cambio de fase contenido en una bolsa sellada para formar una cubierta con encamisado alrededor del recipiente de extracción de muestra. La cubierta de material de cambio de fase puede estar presente como parte del dispositivo microfluídico o como parte del recipiente de extracción de muestra. El acto de conectar el recipiente de extracción de muestra al dispositivo microfluídico funciona para crear un sitio de nucleación que, a su vez, activa el material de cambio de fase, lo que hace que aumente su temperatura y caliente la muestra. Esto puede lograrse mediante el empaquetado de una pieza metálica en la bolsa que contiene el material de cambio de fase, que se encaja cuando el recipiente de extracción de muestra se conecta al dispositivo microfluídico. El material de cambio de fase también puede ser activado por un actuador externo presente en el elemento actuador del dispositivo microfluídico. En algunas realizaciones, se puede activar un material de cambio de fase adecuado para enfriar la muestra con el fin de evitar su degradación. En algunas realizaciones, el calentador puede servir para calentar la lisis y transferir la muestra al pocillo fluídico de los dispositivos microfluídicos, así como para ejecutar una NAAT en el dispositivo microfluídico.

[0025] En una realización adicional, una reacción química que libera un gas o una reacción exotérmica, que se produce en la tapa del recipiente de extracción de muestra, puede utilizarse para presurizar el recipiente y transferir la muestra a una segunda cámara fluídica.

[0026] En una realización adicional mostrada en la figura 5, la estructura de compresión puede ser una cubierta estrecha 502 que forma un ajuste apretado alrededor de la cabeza de hisopo, de tal manera que deforma y aprieta la cabeza de hisopo cuando se inserta en ella. A medida que el hisopo es empujado hacia la cubierta ajustada, la muestra es expulsada de la superficie del hisopo y se acumula en la parte superior de la cubierta. El medio líquido dentro del recipiente de extracción de muestra fluye hacia la parte superior de la cubierta a través del canal 504. Se puede empujar y tirar repetidamente a través de la cubierta ajustada para homogeneizar la muestra y maximizar la elución. El recipiente de extracción de muestra tiene una junta de membrana frangible o perforable 503 en la parte inferior y una salida 505 que puede conectarse a un segundo dispositivo fluídico.

[0027] En una realización adicional de un dispositivo de extracción de muestra 601 para la extracción de muestra de hisopo que se muestra en la figura 6A, la estructura de compresión para exprimir la muestra y el líquido del hisopo es una junta tórica 605 que forma parte del conector 606 unido a la varilla de hisopo, como se ve en el detalle C. El recipiente de extracción de muestra tiene un émbolo de pistón 604 en un extremo y se llena con el medio líquido o tampón 603 para eluir la muestra en el hisopo y se tapa con una tapa 602. La figura 6B muestra la secuencia de etapa tras etapa para la extracción de muestra de hisopo, en un dispositivo de extracción de muestra ilustrativo con un émbolo de pistón que se acciona mecánica/manualmente. En algunas realizaciones, el émbolo de pistón puede ser accionado neumáticamente como, por ejemplo, mediante el uso de un bulbo exprimible para empujar el aire y desplazar el émbolo.

[0028] Si bien las NAAT son muy sensibles y específicas, su aplicación se ha restringido en gran medida a los laboratorios. Esto se debe a que las NAAT son pruebas complejas que requieren mano de obra cualificada y un costoso equipo de laboratorio para su realización. Los avances recientes en las tecnologías de ensayo de amplificación isotérmica han simplificado los requisitos de instrumentación para la realización de las NAAT. Sin embargo, los verdaderos sistemas de muestra a respuesta todavía requieren la automatización de las etapas de ensayo que dependen de la instrumentación externa. La preparación de muestra se considera el cuello de botella para la realización de las NAAT y se requieren métodos para simplificar y automatizar las etapas para la preparación de muestra para las NAAT para facilitar su implementación en entornos de punto de atención. Los módulos de la invención expuestos en la presente memoria pueden integrarse para llevar a cabo la automatización de muestra a respuesta de una NAAT para entornos de punto de atención.

[0029] En una realización de ejemplo, se puede realizar un ensayo de amplificación de ácidos nucleicos de muestra a respuesta en una muestra de hisopo. La figura 7 es una representación esquemática de un dispositivo microfluídico integrado para un ensayo NAAT de muestra a respuesta a partir de una muestra de hisopo.

[0030] El dispositivo microfluídico comprende un cartucho microfluídico 702 con reactivos almacenados a bordo en bolsas de reactivo 708, una tira de flujo lateral de ácido nucleico integrada 707 para la detección, un elemento actuador superior 703 y un elemento actuador inferior 704. La muestra de hisopo se inserta en el recipiente de extracción de muestra 705 del dispositivo microfluídico y el hisopo se exprime hasta secarse mediante uno de los métodos descritos en las diversas realizaciones de la presente exposición, de tal manera que se eluye la muestra en un tampón de lisis celular almacenado dentro del recipiente de extracción de muestra. El calentamiento del recipiente de extracción de muestra provoca la lisis celular, así como la presión acumulada en el recipiente fuerza el lisado a través de un conducto fluídico hacia un pocillo fluídico del dispositivo microfluídico, que contiene perlas magnéticas para la extracción y purificación de ácidos nucleicos. Un filtro 706 está presente en el dispositivo microfluídico para filtrar los inhibidores y sólo permitir que los ácidos nucleicos entren en el pocillo que contiene el tampón de unión y las perlas magnéticas. A medida que el cartucho microfluídico se desliza cerca de los elementos actuadores, se realiza automáticamente una secuencia de ensayo predefinida. La secuencia puede ser diseñada por el usuario en función de los requisitos del ensayo. Una secuencia de ejemplo es la siguiente: el tampón de unión, el tampón de lavado 1, el tampón de lavado 2 y el tampón de elución se dispensan desde las bolsas de reactivo almacenadas y se llenan en paralelo en sus respectivos pocillos fluídicos. Tras la dispensación de los reactivos miscibles, se dispensa un líquido inmiscible, como el aceite mineral, de tal manera que los reactivos miscibles forman un circuito fluídico sin mezclarse entre sí, ya que están separados entre sí por una fase de aceite inmiscible.

[0031] Las perlas magnéticas con grupos ionizables que presentan una carga neta positiva a un pH determinado se utilizan para unir ADN. Un ejemplo de este tipo de perla magnética es la perla magnética ChargeS witch (Life Technologies, Inc. Carlsbad, California). El ADN se une a este tipo de perla magnética en presencia de un tampón de unión capaz de crear una carga neta positiva en la perla y el ADN se eluye en presencia de un tampón de elución capaz de crear una carga neta neutra o negativa en la perla. En esta realización, se utilizan perlas magnéticas ChargeS witch que hacen que el ADN se una a ellas en presencia de un tampón con un pH <5 y se eluya de ellas en presencia de un tampón con un pH > 8. Las perlas magnéticas se mueven secuencialmente a través de todos los pocillos del cartucho microfluídico mediante los métodos descritos en esta divulgación. En primer lugar, se permite que el ADN se una a las perlas magnéticas en presencia de un tampón de unión. A continuación, las perlas se mueven dentro y fuera de dos pocillos que contienen tampón de lavado para lavar las impurezas de las perlas. Las impurezas se quedan en la solución tampón de lavado. Las perlas lavadas se trasladan, a continuación, a un pocillo que contiene tampón de elución, donde el ADN se eluye de las perlas en el tampón de elución. El ADN eluido puede utilizarse, a continuación, para hidratar reactivos liofilizados para una prueba de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT). En algunas realizaciones, las perlas magnéticas pueden eluirse directamente en el pocillo de amplificación. Uno o más calentadores se encienden como parte de la secuencia de automatización para suministrar las temperaturas para la amplificación.

[0032] Se pueden utilizar varios métodos de detección para detectar los productos amplificados, incluida la detección visual mediante la utilización de tintes sensibles al pH o indicadores sensibles a los metales, la detección electroquímica, la detección óptica utilizando tintes intercalantes o sondas fluorescentes, la turbidimetría, la detección en tira de flujo lateral. En este ejemplo, se utiliza una tira de flujo lateral para detectar los ácidos nucleicos amplificados. En la reacción LAMP, pueden utilizarse cebadores FIP y BIP modificados con biotina y FAM/FITC respectivamente. Puede utilizarse una prueba de flujo lateral en formato sándwich. El producto amplificado puede mezclarse con un tampón de dilución o de corrida antes de la detección en tira de flujo lateral. Puede haber una válvula que se acciona como parte de la secuencia de automatización del ensayo para permitir que los productos amplificados fluyan en la tira de flujo lateral. Alternativamente, se puede perforar un tabique para permitir que el producto amplificado fluya en la tira de flujo lateral.

[0033] En una realización, puede accionarse una lanceta con un canal hueco o una aguja mediante el elemento actuador para perforar la pared de la cámara de amplificación y transferir el fluido a una tira de flujo lateral para su detección. La figura 8 describe el principio de mover producto líquido que contiene el analito que se quiere detectar desde el pocillo fluídico 802 hasta una tira de flujo lateral 803. La figura 8A muestra la lanceta 805 con un canal hueco 804 antes de su accionamiento. La figura 8B muestra la lanceta hueca tras su accionamiento, donde perfora a través de la tira de flujo lateral y el fondo del pocillo fluídico, de tal forma que se crea un conducto para el flujo del fluido hasta la tira de flujo lateral.

[0034] Para algunas muestras, como las de tejidos, plantas, alimentos, suelos y organismos pequeños, los hisopos pueden no ser los dispositivos de recogida de muestra preferidos. Además, estas muestras deben ser homogeneizadas durante la preparación de muestra. La figura 9 muestra una realización de un recipiente de extracción de muestra con una mano de mortero accionada por resorte 902 unida a la tapa. En el interior del recipiente se encuentra una rejilla 903 que comprende numerosos agujeros diminutos, bordes dentados, cuchillas y similares, seleccionados en función de la muestra. El recipiente puede estar lleno de un tampón, como un tampón de lisis o un tampón de licuefacción. El acto de girar la tapa para cerrar el recipiente comprime el resorte, de tal forma que empuja la mano de mortero sobre la rejilla inferior mientras se enrosca la tapa. Cualquier material de muestra atrapado entre la mano de mortero y la rejilla se comprime, se aplasta y se corta, debido al movimiento relativo entre la mano de mortero y la rejilla mientras la tapa se cierra. A continuación, la muestra homogeneizada preparada en tampón puede transferirse para su posterior procesamiento en un cartucho fluídico u otro sistema.

5 **[0035]** En función de la aplicación y de los requisitos de usuario, el sistema de procesamiento de muestra puede integrar motores, actuadores, elementos calefactores, termopares, ventiladores, unidades de refrigeración, microcontroladores, detectores ópticos, electrodos, filtros, fuentes de luz, paquetes de baterías, módulos inalámbricos y componentes electrónicos, de tal manera que forme un sistema integrado único, independiente y autosuficiente para realizar el procesamiento de muestras biológicas. El volumen de las bolsas de reactivo, depósitos y pocillos fluidicos puede variar en función del bioensayo y de las necesidades del usuario. Los volúmenes típicos pueden oscilar entre 1 µl y 10 ml, o entre 5 µl y 1 ml.

10 **[0036]** Existen muchos materiales adecuados para el dispositivo microfluídico. Los plásticos del tipo materiales termoplásticos son una buena elección para un dispositivo desechable de un solo uso debido a su bajo coste y su capacidad para ser producidos en masa.

15 **[0037]** Entre los materiales adecuados para el dispositivo microfluídico totalmente integrado de muestra a respuesta se incluyen materiales como el vidrio, el polipropileno, el policarbonato, el PMMA, el COC, el silicio o una combinación de uno o más de los materiales. Un dispositivo microfluídico puede estar moldeado mediante inyección polimérica con una micromatriz o matriz de electrodos funcionalizada MEMS de silicio o vidrio integrada, o una tira de flujo lateral para la detección. El material puede seleccionarse en función de las necesidades del usuario y del ensayo que se vaya a realizar en este, en función de su biocompatibilidad, compatibilidad química.

20 **[0038]** El espacio ocupado por el dispositivo microfluídico puede oscilar entre unos pocos milímetros cuadrados y unas decenas de centímetros cuadrados, en función de las necesidades del usuario y de la aplicación de procesamiento de muestra. En algunas realizaciones, pueden apilarse o disponerse y procesarse en paralelo múltiples dispositivos microfluídicos. Las fuerzas de atracción, formas y tamaños de los imanes permanentes en el sistema de procesamiento de muestra pueden seleccionarse en función de las necesidades del procesamiento de muestra, la forma, el tamaño, el volumen, las propiedades del material y la presión de ruptura de la junta frangible. Entre los materiales de la junta frangible se incluyen láminas de aluminio, polímeros, gomas, metales, cintas adhesivas, óxidos metálicos o una combinación de materiales.

25 Definiciones generales

[0039] A pesar de que en el presente documento se emplean términos específicos, estos se usan solo con un sentido genérico y descriptivo, y no con fines de limitación. A no ser que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto en la materia a la que pertenece el objeto actualmente descrito.

30 **[0040]** Tal como se utiliza en el presente documento, "ácido nucleico" se refiere a un compuesto polimérico que comprende subunidades unidas covalentemente denominadas nucleótidos. Un "nucleótido" es una molécula, o una unidad individual en una molécula de ácido nucleico mayor, que comprende un nucleósido (esto es, un compuesto que comprende una base de purina o pirimidina unida a un azúcar, habitualmente ribosa o desoxirribosa) unido a un grupo fosfato.

35 **[0041]** Los términos "polinucleótido" u "oligonucleótido" o "molécula de ácido nucleico" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a la forma polimérica del éster de fosfato de ribonucleósidos (adenosina, guanosina, uridina o citidina; "moléculas de ARN" o simplemente "ARN") o desoxirribonucleósidos (desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina o desoxicitidina; "moléculas de ADN" o simplemente "ADN"), o a cualquier análogo fosfoéster de los mismos, tales como fosforotioatos y tioésteres, ya sea en forma monocatenaria o bicatenaria. Los polinucleótidos que comprenden ARN, ADN, o secuencias híbridas de ARN/ADN de cualquier longitud son posibles. Los polinucleótidos para su uso en la presente invención pueden ser naturales, sintéticos, recombinantes, generados *ex vivo*, o una combinación de estos, y también pueden estar purificados mediante cualquier método de purificación conocido en la técnica. En consecuencia, el término "ADN" incluye, pero sin carácter limitativo, ADN genómico, ADN plasmídico, ADN sintético, ADN semisintético, ADN complementario ("ADNc"; ADN sintetizado a partir de un molde de ARN mensajero), y ADN recombinante (ADN que ha sido diseñado artificialmente y, por lo tanto, se ha sometido a manipulación biológica molecular a partir de su secuencia de nucleótidos natural).

45 **[0042]** Los términos "amplificar", "amplificación", "amplificación de ácido nucleico", o similares, hacen referencia a la producción de múltiples copias de un molde de ácido nucleico (p. ej., una molécula de ADN molde), o a la producción de múltiples copias de secuencia de ácidos nucleicos que son complementarias con el molde de ácido nucleico (p. ej., una molécula de ADN molde).

50 **[0043]** Los términos "superior", "inferior", "encima", "debajo" y "sobre" se emplean a lo largo de la descripción en referencia a las posiciones relativas de los componentes de los dispositivos descritos, tales como las posiciones relativas de sustratos superiores e inferiores en un dispositivo. Se podrá apreciar que los dispositivos son funcionales independientemente de su orientación en el espacio.

55 Siguiendo las convenciones arraigadas sobre legislación de patentes, los términos "un", "una" y "el/la" se refieren a "uno/a o más" cuando se utilizan en la presente solicitud, incluidas las reivindicaciones. Así, por ejemplo, una referencia a "un objeto" incluye una pluralidad de objetos, a no ser que quede claro lo contrario por el contexto (p. ej., una pluralidad de objetos), etc.

5 **[0044]** A lo largo de la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones, los términos "comprender", "comprende(n)" y "comprendiendo" se utilizan con un sentido no exclusivo, salvo cuando el contexto requiera lo contrario. Del mismo modo, el término "incluir" y sus variantes gramaticales pretenden ser no limitativos, de manera que una enumeración de elementos en una lista no excluye otros elementos similares que puedan ser sustituidos o añadidos a los elementos enumerados.

10 **[0045]** A efectos de la presente memoria descriptiva y de las reivindicaciones anexas, a no ser que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades, tamaños, dimensiones, proporciones, formas, formulaciones, parámetros, porcentajes, características, y otros valores numéricos utilizados en la descripción y en las reivindicaciones, deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente", aunque el término "aproximadamente" pueda no aparecer expresamente junto al valor, cantidad o intervalo. Por consiguiente, a no ser que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la siguiente memoria descriptiva y en las reivindicaciones anexas no son exactos ni tienen por qué serlo, sino que pueden ser aproximados y/o mayores o menores, según se requiera, reflejando tolerancias, factores de conversión, redondeo, error de medición, etc., y otros factores conocidos por los expertos en la materia en función de las propiedades deseadas que se pretenda obtener en el objeto dado a conocer en el presente documento.

15 **[0046]** Además, cuando se usa el término "aproximadamente" en relación con uno o más números o intervalos numéricos, debería entenderse que se refiere a la totalidad de dichos números, incluidos todos los números en un intervalo, y que modifica ese intervalo ampliando los límites por arriba y por abajo de los valores numéricos expuestos. La enumeración de intervalos numéricos por puntos finales incluye todos los números; p. ej., números enteros, incluyendo fracciones de los mismos, subsumidos en ese intervalo (por ejemplo, la enumeración de 1 a 5 incluye 1, 2, 3, 4 y 5, así como fracciones de los mismos, p. ej., 1,5, 2,25, 3,75, 4,1, etc.) y cualquier intervalo dentro de ese intervalo.

20 **[0047]** Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en la memoria descriptiva indican el nivel de los expertos en la materia a la que pertenece el objeto expuesto en el presente documento. Se comprenderá que, a pesar de que en el presente documento se hace referencia a una serie de solicitudes de patente, patentes y otras referencias, dicha referencia no implica una admisión de que cualquiera de estos documentos forma parte del conocimiento general común en la materia.

25 **[0048]** A pesar de que el objeto expuesto anteriormente se ha descrito de forma detallada a título ilustrativo y ejemplificativo en aras de la claridad de entendimiento, los expertos en la materia comprenderán que se pueden aplicar determinados cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo de extracción de muestra (101) que comprende:
 - una varilla de hisopo (103) que comprende un primer extremo, un tope (106), y un segundo extremo;
 - una tapa (102) unida al primer extremo de la varilla de hisopo (103), donde la tapa (102) puede deslizarse a lo largo de la varilla de hisopo (103);
 - una junta tórica (104) en el interior de la tapa (102);
 - una punta de hisopo (105) en el segundo extremo de la varilla de hisopo (103); y
 - un recipiente de extracción de muestra (107) que comprende un medio líquido y una estructura de compresión (112), donde la estructura de compresión (112) comprende una abertura más pequeña que la punta de hisopo (105);
 - donde la tapa (102) está configurada para acoplarse al recipiente de extracción de muestra (107) y el tope (106) está configurado para entrar en contacto con la parte inferior de la tapa (102) cuando la varilla de hisopo (103) se extrae por deslizamiento a través de la tapa (102); y
 - donde la junta tórica (104) está configurada para ser aplastada al apretar la tapa (102) en el recipiente de extracción de muestra (107), con el fin de sellar la tapa (102) contra el recipiente de extracción de muestra (107) y la varilla de hisopo (103).
2. Dispositivo de extracción de muestra (101) según la reivindicación 1, donde la tapa (102) es una tapa con cierre de rosca o una tapa de ajuste a presión; y/o donde la estructura de compresión (112) es una junta tórica (605); y/o el medio líquido se sitúa entre dos juntas frangibles (109, 111).
3. Dispositivo de extracción de muestra (101) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde el recipiente de extracción de muestra (107) comprende además un puerto de salida (110).
4. Dispositivo de extracción de muestra (101) según la reivindicación 3, donde el puerto de salida (110) está conectado fluidicamente a un dispositivo microfluídico (401) a través de un conector de ajuste (402) y donde el conector de ajuste es un luer, una rosca, una conexión a presión o un ajuste a presión.
5. Dispositivo de extracción de muestra (101) según la reivindicación 4, donde el dispositivo microfluídico (401) comprende una estructura afilada que puede romper una junta frangible (109, 111) en el recipiente de extracción de muestra (107) para permitir la transferencia del medio líquido al dispositivo microfluídico (401) y opcionalmente una válvula de retención (406) entre el recipiente de extracción de muestra (107) y el dispositivo microfluídico (401) para evitar el reflujo del medio líquido.
6. Dispositivo de extracción de muestra (101) según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, donde el dispositivo microfluídico (401) comprende además un filtro, una membrana semipermeable o una membrana porosa para filtrar materiales indeseables y/o donde el dispositivo microfluídico (401) comprende un cartucho microfluídico (702) con reactivos almacenados a bordo en bolsas de reactivo (708), una tira de flujo lateral de ácido nucleico integrada (707) para la detección y uno o más elementos actuadores (703, 704).
7. Dispositivo de extracción de muestra (101) según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que comprende además un calentador con forma de anillo (404) que forma una cubierta con encamisado alrededor del recipiente de extracción de muestra (107), opcionalmente, donde el calentador es un elemento calefactor por resistencia que comprende una resistencia incrustada en un bloque de material de conductividad térmica, o donde el calentador es un calentador resistivo de película fina o un elemento Peltier o un calentador autorregulador de coeficiente de temperatura positivo (PTC), o donde el calentador comprende un material de cambio de fase en una bolsa sellada.
8. Dispositivo de extracción de muestra (101) según la reivindicación 1, donde la estructura de compresión (112) comprende una cubierta estrecha (502), donde la cubierta estrecha está configurada para formar un ajuste apretado alrededor de la punta de hisopo (105) y, de esta manera, deformar y comprimir la punta de hisopo (105) cuando se inserta en la estructura de compresión (112), opcionalmente, donde el medio líquido está conectado fluidicamente a la parte superior de la cubierta a través de un canal (504).
9. Dispositivo de extracción de muestra (101) según la reivindicación 1, donde la estructura de compresión (112) comprende una junta tórica (605) y el recipiente de extracción de muestra (107) comprende un émbolo de pistón (604).
10. Dispositivo de extracción de muestra (101) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el recipiente de extracción de muestra (107) comprende además una mano de mortero accionada por resorte (902) y una rejilla (903).
11. Método para la extracción de muestra de una punta de hisopo (105) que comprende el uso del dispositivo de extracción de muestra (101) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 comprendiendo las etapas de:
 - a. insertar la punta de hisopo (105) en el recipiente de extracción de muestra (107);
 - b. presionar la punta de hisopo (105) a través de la estructura de compresión (112) y hacia el medio líquido;

- c. deslizar la tapa (102) a lo largo de la varilla de hisopo (103) y cerrar la tapa (102), de tal manera que se aplasta la junta tórica (104) en el interior de la tapa (102) y se forma un cierre hermético entre la varilla de hisopo (103) y el recipiente de extracción de muestra (107);
- 5 d. tirar de la punta de hisopo (105) hasta que el tope (106) hace contacto con el interior de la tapa (102); y
e. conectar el dispositivo de extracción de muestra (101) a una entrada de un dispositivo microfluídico (401).
12. Dispositivo de extracción de muestra (101) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la varilla de hisopo (103) es una varilla de hisopo rompible que comprende un punto de ruptura marcado.
13. Método para la extracción de muestra de una punta de hisopo (105) que comprende el uso del dispositivo de extracción de muestra (101) según la reivindicación 12 comprendiendo las etapas de:
- 10 a. abrir la tapa (102) del recipiente de extracción de muestra (107);
b. insertar la punta de hisopo (105) a través de la estructura de compresión (112) y hacia el medio líquido;
c. sacar la punta de hisopo (105) a través de la estructura de compresión (112);
d. romper la varilla de hisopo rompible en el punto de ruptura marcado y dejar que la punta de hisopo (105) descansa sobre la estructura de compresión (112);
- 15 e. cerrar la tapa (102) del recipiente de extracción de muestra (107); y
e. conectar el dispositivo de extracción de muestra (101) a una entrada de un dispositivo microfluídico (401).
14. Método según la reivindicación 11 donde las etapas (c) y (d) se repiten una o más veces o la reivindicación 13, donde las etapas (b) y (c) se repiten una o más veces.

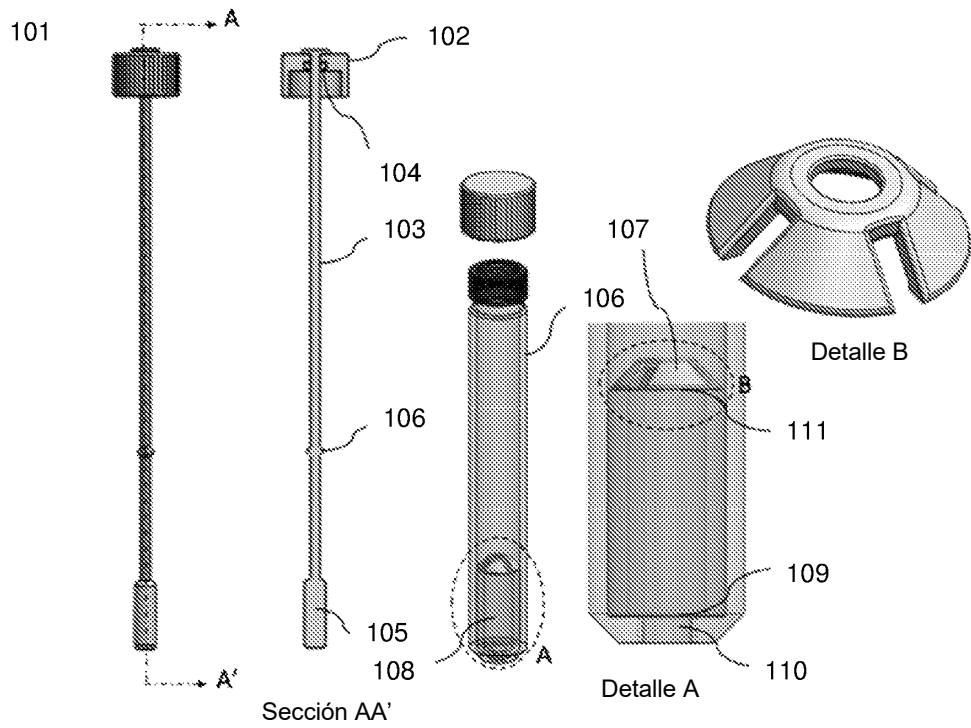


FIG. 1

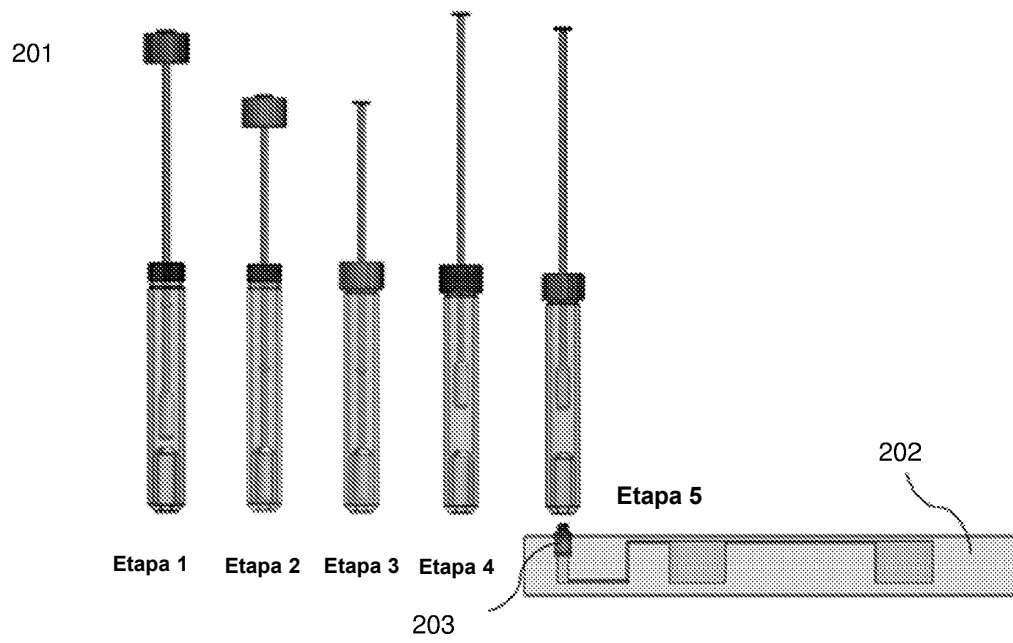


FIG. 2

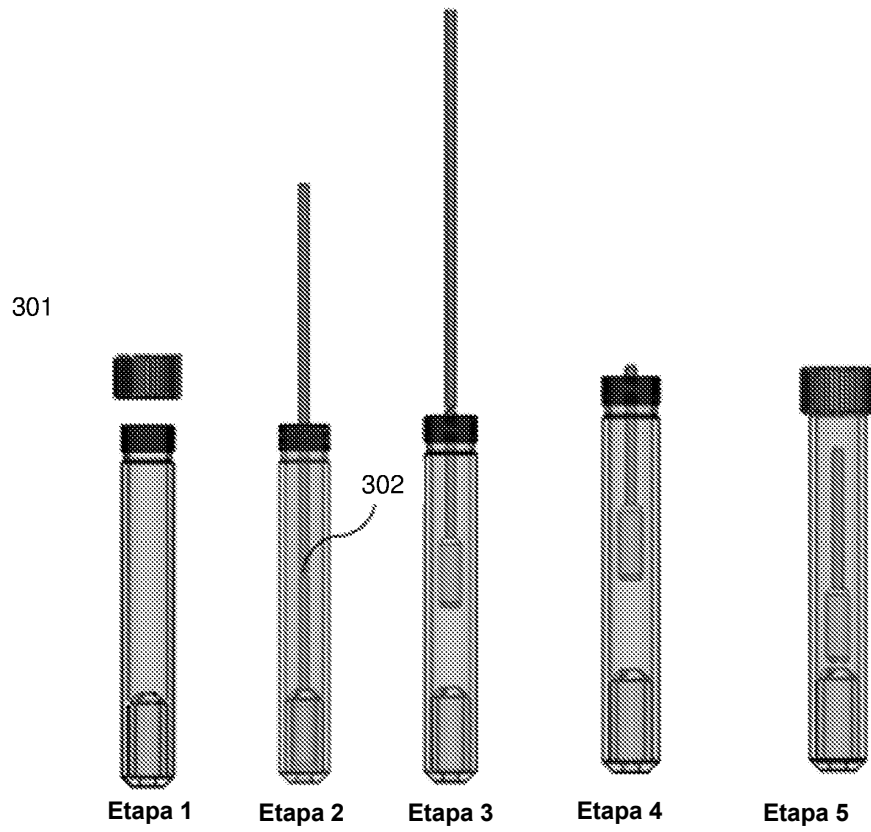


FIG. 3

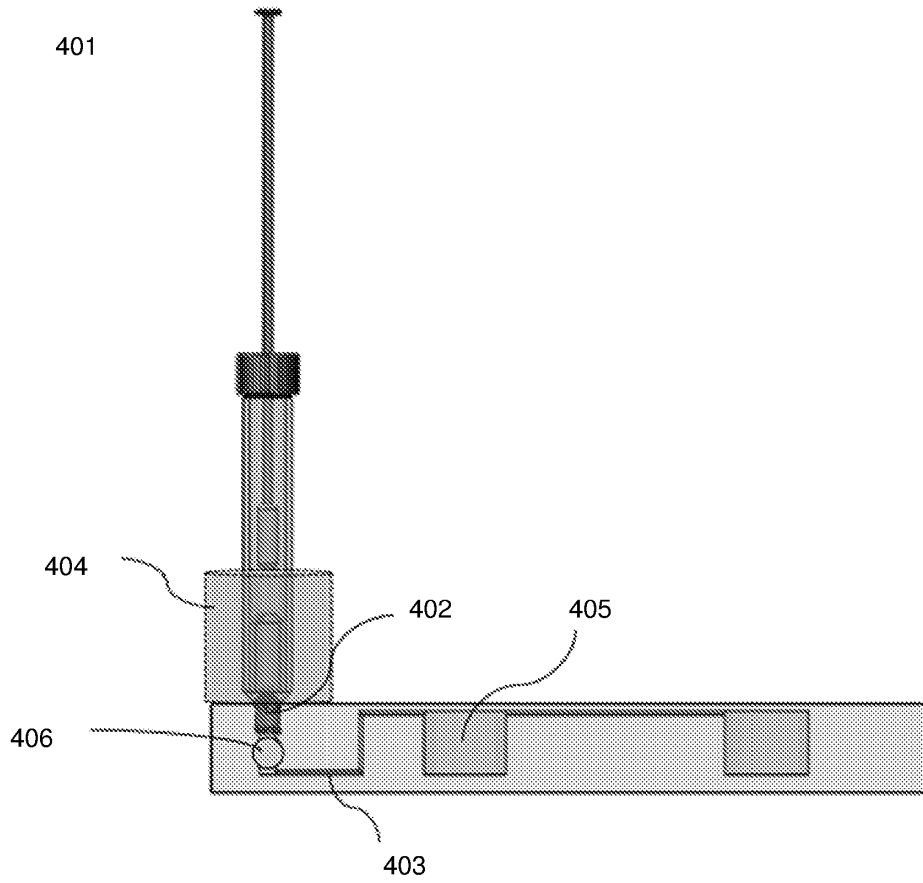


FIG. 4

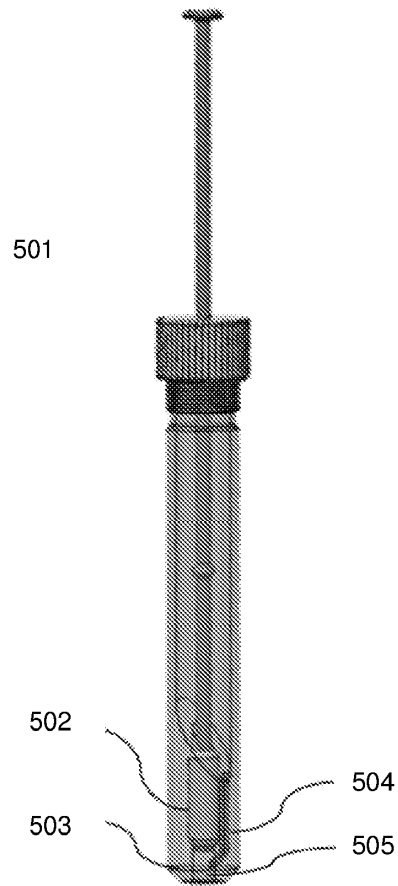


FIG. 5

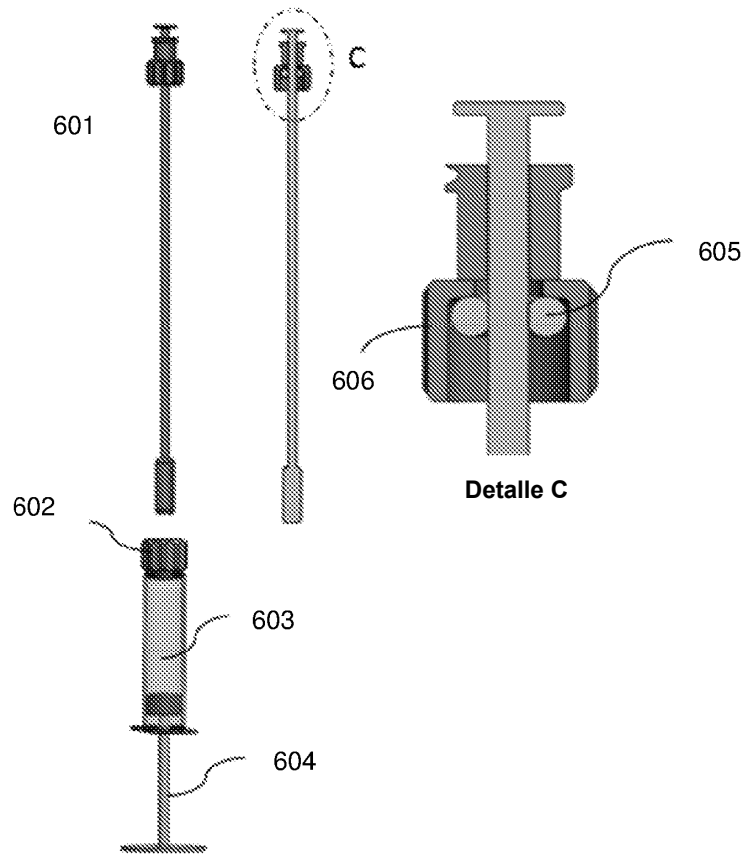


FIG. 6A

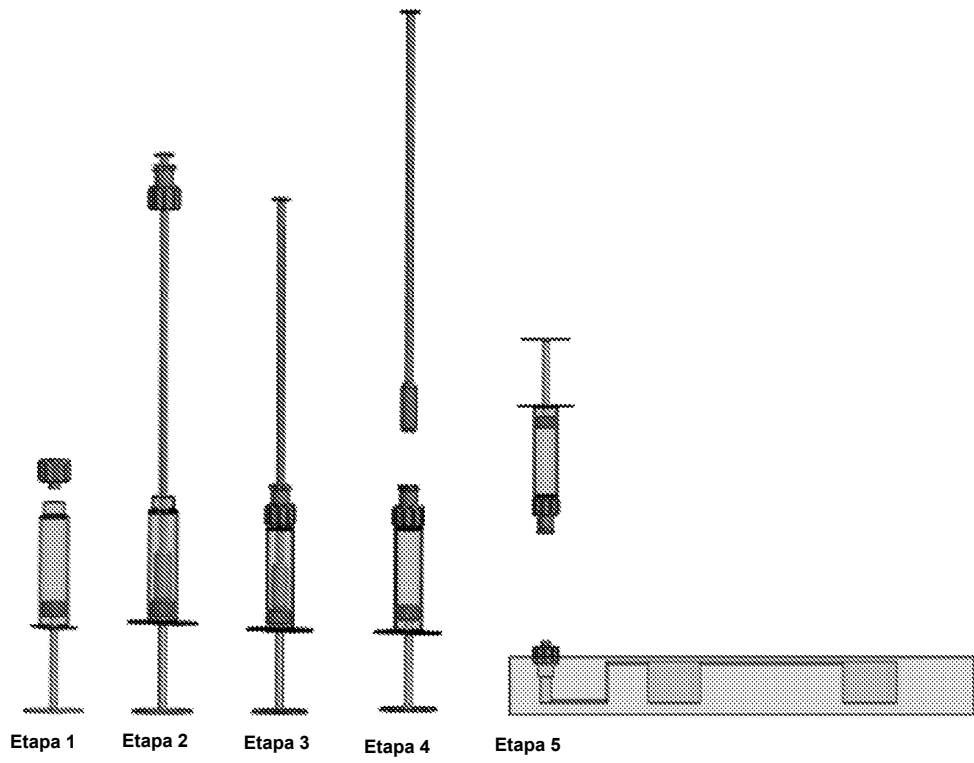


FIG. 6B

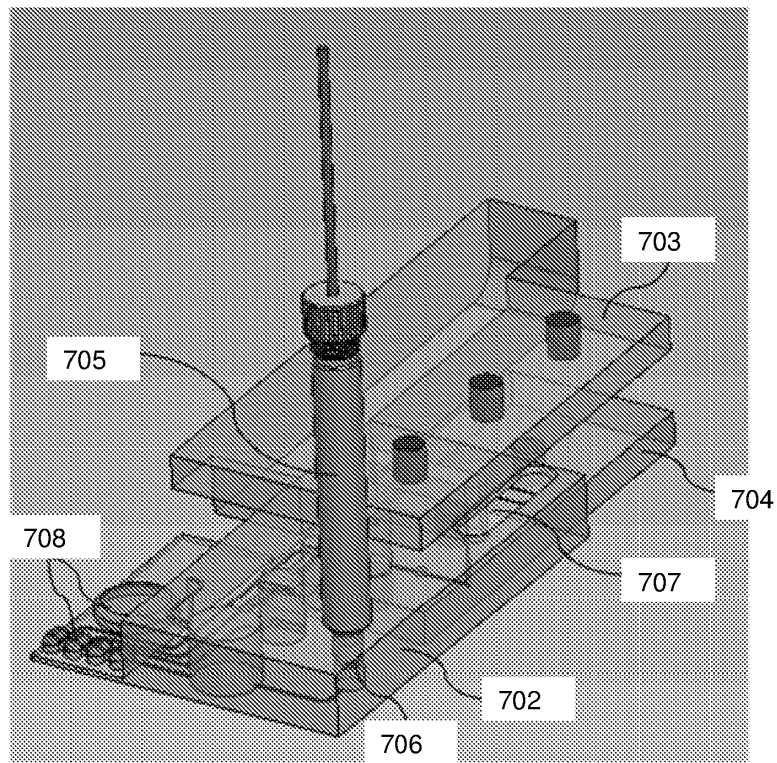


FIG. 7

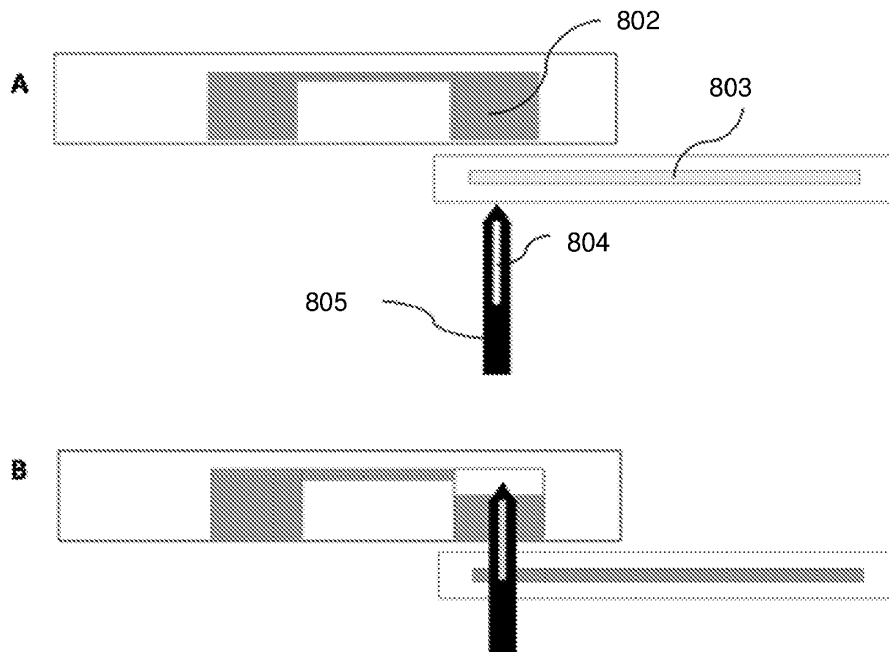


FIG. 8

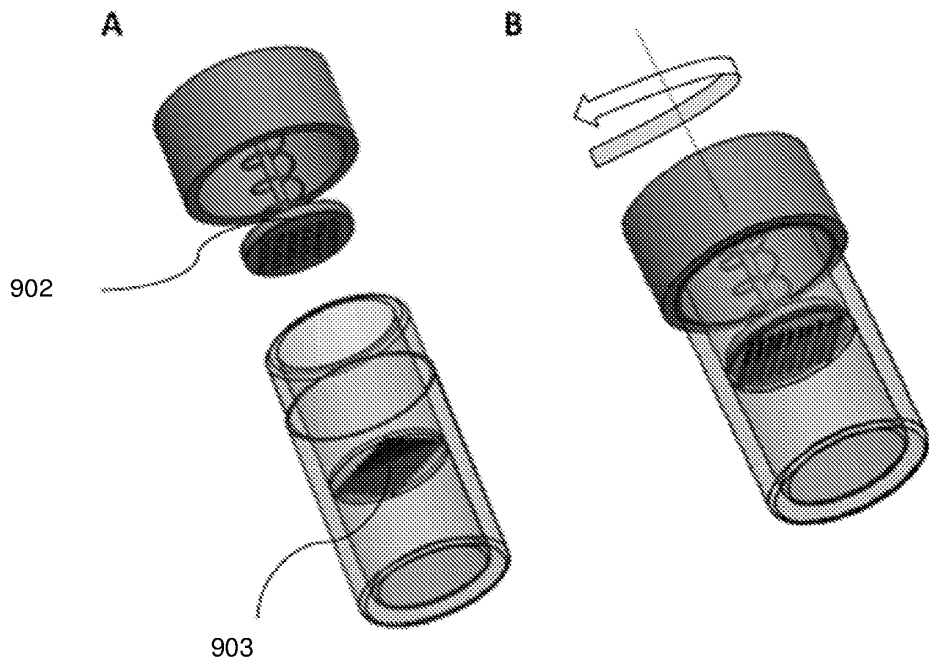


FIG. 9