(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 401 121**

(51) Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 1/00 (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.1997** **E 97909878 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2012** **EP 0938381**

(54) Título: **Dispositivos de recolección de muestras y métodos que utilizan marcadores y el uso de dichos marcadores como controles en la validación de una muestra, evaluación y/o certificación de laboratorio**

(30) Prioridad:

04.10.1996 US 27647 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.04.2013

(73) Titular/es:

VERI-Q INC. (100.0%)
840 Main Campus Drive, Suite 3500
Raleigh, NC 27606, US

(72) Inventor/es:

MITCHELL, LLOYD G.

(74) Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 401 121 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

Dispositivos de recolección de muestras y métodos que utilizan marcadores y el uso de dichos marcadores como controles en la validación de una muestra, evaluación y/o certificación de laboratorio

La presente invención se refiere a un dispositivo y a un método para recoger sangre y otros fluidos corporales, como por ejemplo orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, etc., así como tejidos de personas y/o animales en análisis de muestras procedentes del ámbito forense, clínico, de pruebas de paternidad, veterinario u otros tipos de análisis de muestras con el fin de marcar exclusivamente el espécimen que se va a estudiar y detectar así fácilmente cualquier contaminación y/o manipulación indebida. También puede aplicarse este método al marcado de otras muestras, como por ejemplo las que se derivan de plantas, de animales o tienen un origen no biológico. También pueden utilizarse los marcadores de la presente invención como controles en la evaluación de procedimientos de laboratorio, como por ejemplo la manipulación de muestras y/o el análisis de laboratorios y personal forenses, clínicos, de pruebas de paternidad, veterinarios o de otro tipo para fines de certificación, pruebas de aptitud o acreditación.

Las muestras se recogen para su análisis utilizando una gran variedad de métodos y con muchos fines diferentes, entre los que figura el establecimiento de identidad mediante el análisis de ADN. La identificación incorrecta y la contaminación cruzada de muestras constituyen dos problemas que deben ser eliminados para asegurar la validez de los resultados de cualquier análisis. La manipulación de las muestras para fines de identificación forense ha causado problemas para los investigadores y laboratorios que se dedican a analizar pruebas y muestras sospechosas procedentes de lugares donde se han perpetrado delitos. Los abogados defensores con frecuencia consiguen la absolución de sus clientes si pueden impugnar las pruebas forenses basándose en el argumento de que se ha producido una contaminación accidental o deliberada de las pruebas encontradas en los lugares donde se han cometido delitos con material (sangre o ADN) obtenido de un sospechoso (es decir, el acusado). El caso de *O.J. Simpson contra el Estado de California* es un ejemplo notorio en el que se puso en duda la integridad de las pruebas de ADN.

Existen aproximadamente 3.300 millones de pares de bases de ADN en el genoma humano, y muchas regiones varían entre diferentes personas, haciendo así posible la identificación de una persona específica. Se eligen diferentes regiones de ADN para su análisis forense basándose en su especificidad para los seres humanos y el grado de polimorfismo, es decir, que es probable que las regiones polimórficas sean diferentes entre individuos escogidos al azar.

Existen muchas secuencias de ADN de otras especies que no se encuentran presentes en el ADN humano y que no deberían interferir con el análisis del polimorfismo genético humano. Entre las mismas figuran los genes bacterianos (por ejemplo, la neomicina y otros genes de resistencia a antibióticos), los fagos, las levaduras, los animales no primates y los genes de plantas. La secuencia de muchos de estos genes es conocida y es relativamente fácil producirlas y analizarlas para determinar si existe una falta de reactividad cruzada en los análisis forenses o de otro tipo actuales. Adicionalmente, se pueden construir secuencias de ADN completamente artificiales que no tienen análogos humanos. Se pueden utilizar estas secuencias para marcar las muestras en el momento de la recogida, de modo que se pueda establecer cualquier contaminación cruzada posterior.

Recientemente, ha existido una presión cada vez mayor para que los laboratorios que manipulan fluidos corporales y muestras de tejido se sometan a certificaciones, pruebas de aptitud y/o acreditación con el fin de garantizar que un laboratorio específico está administrado con profesionalidad y cumple determinadas normas a nivel nacional. Se pueden utilizar marcadores como los ilustrados anteriormente y/o marcadores que no son de ácido nucleico, por ejemplo proteínas o péptidos, productos químicos o elementos, como controles en la evaluación de los procedimientos de laboratorio –por ejemplo la manipulación de muestras– para obtener las mencionadas certificación, pruebas de aptitud y/o acreditación.

Existen en el estado de la técnica numerosos dispositivos a prueba de manipulaciones indebidas para la recogida de muestras. Por ejemplo, la patente estadounidense nº 4.873.193 se refiere a un método y a un aparato para la recogida y conservación de pruebas biológicas de fluidos. Este aparato comprende un vial de especímenes y su tapa, teniendo la tapa un disco recubierto con adhesivo insertado en la misma. La tapa está inicialmente invertida en el borde del vial de especímenes y está encerrada en una envoltura de plástico con precinto de seguridad. El vial de especímenes y la tapa, encerrados en la envoltura con precinto de seguridad, están sellados dentro de un recipiente exterior con una segunda envoltura de plástico con precinto de seguridad. El recipiente existe en un estado con precinto de seguridad antes de que el producto sea colocado en su interior. Este primer sello con precinto de seguridad se rompe, se coloca en el interior del recipiente el artículo de prueba y a continuación se vuelve a sellar el recipiente una vez que el artículo ha sido colocado en el recipiente. Se crea así un nuevo sello con precinto de seguridad. No se divulga en la patente nº 4.873.193 la adición de marcadores al vial de muestras para impedir una manipulación indebida.

También existen numerosos métodos y equipos para el etiquetado de sustancias. Por ejemplo, las patentes estadounidenses nº 4.953.562, 5.039.616 y 5.179.027 se refieren todas al etiquetado con el fin de impedir la introducción de especímenes falsos en los análisis de orina. Estas patentes están relacionadas con la identificación del origen de las muestras de orina recogidas para el análisis bioquímico donde existe un potencial de error de laboratorio o de sustitución engañosa de una muestra de orina por otra. En estos métodos de identificación de muestras de orina, la persona cuya orina se va a analizar consume una o varias formulaciones que contienen una o más sustancias de identificación inocuas que puede ser absorbidas rápidamente por el cuerpo y que aparecerán rápidamente en la orina. La orina recogida se analiza posteriormente para detectar la presencia de estas sustancias, determinando así la fuente de la muestra y detectando cualquier error o sustitución engañosa de la misma. No se divulga en estas patentes la adición de marcadores al dispositivo de recogida antes de añadir la muestra de orina al mismo. En lugar de ello, la persona que va a proporcionar la muestra consume en primer lugar todos los marcadores. De esta forma se “etiqueta” la muestra de orina antes de ser recogida.

La patente estadounidense nº 4.441.943 se refiere a un método de etiquetado de una sustancia para permitir la identificación posterior de la misma al incorporar un polipéptido en la sustancia. Entre los ejemplos de sustancias que se etiquetan figuran composiciones o aceite explosivos. La patente nº 4.441.943 divulga la incorporación de etiquetas en la sustancia que se va a etiquetar y posteriormente la liberación de las sustancias etiquetadas en sus entornos de uso habituales. Después de un accidente o una actividad ilegal relacionada con las sustancias etiquetadas, se recogen las sustancias etiquetadas y se examinan las etiquetas para obtener información sobre su origen. No se divulga un dispositivo de recogida de muestras que posea marcadores asociados con el dispositivo.

La patente estadounidense nº 5.451.505 se refiere a métodos para el etiquetado y la localización de materiales que utilizan ácidos nucleicos como elementos etiquetadores (*taggants*). Más en concreto, la invención proporciona un método de control de la presencia de una sustancia mediante el etiquetado de la sustancia con un ácido nucleico, la recogida de sustancia y la detección del ácido nucleico. Los materiales o sustancias previstos para el etiquetado incluyen los contaminantes atmosféricos, los aceites, los compuestos aromáticos, las composiciones explosivas, los productos alimenticios, los medicamentos, las tintas, los artículos de papel y los productos de pintura. No se divulga un dispositivo de recogida de muestras que posea marcadores asociados con el mismo. En WO 96/19586 se muestra un dispositivo para el marcado de una muestra recogida utilizando marcadores de ácido nucleico.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un dispositivo y un método para la recogida de muestras que minimiza el riesgo de contaminación cruzada no detectada debida a un error o a un fraude. Se proporciona un método y un dispositivo para el marcado de una muestra procedente de una persona, un animal, una planta o una sustancia no biológica, desde el momento de la recogida de la muestra (es decir, la identificación de que una muestra particular proviene de una persona, animal, planta o sustancia no biológica determinada), así como un método para determinar la integridad de una muestra (es decir, la presencia o ausencia de marcadores externos, lo que podría indicar contaminación, o la determinación del deterioro de la muestra). El presente dispositivo y método proporcionan un medio para determinar si se ha producido o no una contaminación cruzada en cualquier punto posterior en la manipulación de materiales de la muestra.

Específicamente, la presente invención incluye un dispositivo adecuado para el marcado de una muestra recogida, el cual comprende un medio de recogida que comprende un tubo o un sistema de recogida de membrana para recoger la muestra; y en el que al menos un marcador detectable que no es de ácido nucleico puede entrar en contacto con la muestra en el momento de recogida de la muestra para marcar la muestra recogida tras el contacto de la muestra con al menos una parte del medio de recogida que posee al menos un marcador detectable que no es de ácido nucleico contenido en la misma; y en el que el marcador detectable que no es de ácido nucleico es distinto al componente que está presente en la muestra y es inerte a cualquier componente presente en la muestra; y en el que al menos una parte del marcador detectable que no es de ácido nucleico pasa a la muestra recogida tras la recogida de la muestra.

También se incluye en la invención un equipo adecuado para el marcado de una muestra de pruebas de fluido corporal, el cual comprende el dispositivo descrito anteriormente, medios para identificar la identidad y la cantidad, o al menos una de las mismas, de al menos un marcador detectable y medios de sellado con precinto de seguridad para el sellado del medio de recogida y del mencionado marcador detectable.

La invención incluye además un método para marcar una muestra, el cual comprende la recogida de la muestra utilizando un dispositivo de recogida del primer aspecto mencionado anteriormente y posibilitar que la muestra entre en contacto con al menos un marcador detectable para pasar al menos una parte del mencionado marcador detectable a la muestra con el fin de marcar dicha muestra.

La invención también incluye un método para determinar la integridad de una muestra marcada, el cual comprende:

(a) el suministro de una muestra que está marcada como se ha indicado anteriormente;

(b) posteriormente, la detección de la identidad y la cantidad, o al menos una de las mismas, de al menos un marcador detectable para proporcionar un resultado; y

(c) la comparación del resultado del paso (b) con la información conocida con respecto a la identidad y la cantidad, o al menos una de las mismas, de al menos un marcador detectable para establecer la integridad de la muestra marcada.

También se incluye el uso de al menos un marcador detectable en los análisis de laboratorio para garantizar la integridad de las muestras y como un control para evaluar los procedimientos de laboratorio, junto con el uso de al menos un marcador detectable para los análisis de laboratorio y/o personal de laboratorio con fines de certificación, pruebas de aptitud o acreditación.

La invención también incluye el uso de al menos un marcador detectable en la fabricación de un dispositivo apropiado para el marcado de una muestra, en el que al menos un marcador detectable es distinto a un componente que ya se encuentra presente en la muestra y es inerte a cualquier componente presente en la muestra.

BREVE DESPRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Aunque los resultados mostrados en las figuras se obtuvieron a partir de análisis que utilizan marcadores de ácido nucleico, estos se incluyen en el presente únicamente a título ilustrativo.

La Figura 1 es un análisis de un marcador de ADN para la comigración con ADN extraído de sangre total utilizando extracción Chelex. El procedimiento de extracción/purificación de ADN Chelex (Bio-Rad Laboratories) puede reducir la concentración de ADN por un factor de 10^5 a partir de la cantidad inicial añadida a una muestra de sangre total. Un fragmento de 302 pb (pares de bases) del marcador fue amplificada por PCR (reacción en cadena de polimerasa) a partir de 13 muestras (incluidos 3 controles negativos) después de la extracción Chelex, y los productos resultantes fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio y fotografiados.

Las bandas 1 y 15 contenían una escala de 100 pb; la banda 2 tenía 100 ng de marcador añadido a 10 µl de sangre antes de la extracción; la banda 3 tenía 10 ng de marcador; la banda 4 tenía 1 ng de marcador; la banda 5 tenía 100 pg de marcador; la banda 6 tenía 10 pg de marcador; la banda 7 tenía 1 pg de marcador; y las bandas comprendidas entre 8 y 11 tenían respectivamente 100 fg, 10 fg, 1 fg y 0,1 fg de marcador. Las bandas 12-14 eran controles negativos que contenían sangre procesada, pero ningún marcador.

Las concentraciones finales de marcador detectado oscilaban entre 1 pg (banda 2) y 10 ag (attogramo), lo que es el equivalente de aproximadamente 10 moléculas.

La Figura 2 es un gel de poliacrilamida teñida con plata de diluciones de marcador añadido a una mezcla de tres STR (Repeticiones Cortas en Tándem, por sus siglas en inglés) forenses comúnmente utilizadas para FvW (factor de von Willebrand), THO1 y TPOX (bandas 1-13), y la detección del marcador a partir de una alícuota de cada reacción de STR amplificada por PCR (bandas 14-24).

Se llevaron a cabo tres combinaciones de cebador (en inglés, *primer*) de PCR utilizando cebadores para amplificar los fragmentos de STR para FvW, THO1 y TPOX (Promega Inc.) utilizando una plantilla de ADN humano K562. Las bandas 2-6 y 8-11 son idénticas, excepto en que contienen diferentes cantidades de ADN marcador (producido a partir de un fragmento de ADN de *Corynebacterium diphtheriae*) que oscilan entre 10 ng (Banda 1) a 0,1 fg (Banda 10). No se percibe ninguna interferencia con las STR.

Banda	Concentración de marcador	Banda	Concentración de marcador
1	10 ng	8	10 fg
2	1 ng	9	1 fg
3	100 pg	10	100 ag
4	10 pg	11	0 (Control Negativo)
5	1 pg	12	100 ng (no contiene ADN humano)
6	100 fg		

Las bandas 7 y 13 contenían marcadores de tamaño de gel electroforético de STR mezclados para FvW, THO1 y TPOX (Promega Inc.).

Se amplificaron por PCR dos microlitros de cada uno de los productos STR PCR mencionados (dilución de $4x10^{-2}$) para detectar la presencia del marcador utilizando cebadores que amplificaban un segmento de 302 pb del genoma de *Corynebacterium diphtheriae*). Se consiguió la detección del marcador a aproximadamente 40 ag (attogramos, banda 22) del marcador, que se encuentra en el rango de 30 a 100 moléculas de marcador.

Banda	Reamplificado desde muestra en banda	Concentración de marcador
14	-	0 (Control negativo, cont. ADN humano K562)
15	1	400 pg
16	2	40 pg
17	3	4 pg
18	4	400 fg
19	5	40 fg
20	6	4 fg
21	8	400 ag
22	9	40 ag
23	10	4 ag
24	-	0 (Control negativo, ningún ADN excepto cebadores).

Este gel demuestra que el marcador no humano no interfiere con un análisis forense realizado normalmente. No hay diferencia en los resultados de las muestras que contienen el marcador en comparación con los resultados de las muestras que no contienen ningún marcador. Adicionalmente, se puede detectar el marcador con un alto grado de sensibilidad en una muestra que se ha analizado previamente para otros fines.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención incluye métodos y dispositivos para el marcado de una muestra recogida, y el uso de dichos marcadores en análisis forenses, clínicos, de paternidad o veterinarios para garantizar la integridad de la muestra, o como un control en la evaluación de procedimientos de laboratorio, o para fines de certificación, pruebas de aptitud o acreditación. La muestra puede ser una muestra animal, una muestra humana, una muestra de planta o una muestra no biológica. Con la expresión “garantizar la integridad de la muestra” el inventor quiere decir no solo establecer si se ha producido una contaminación, sino también establecer si se ha producido alguna degradación o deterioro en la muestra. Preferentemente, la presente invención incluye los pasos de producir marcadores (por ejemplo proteínas, péptidos, productos químicos y/o elementos) que no interfieren con el análisis de muestras (es decir, que son inertes (o sustancialmente no reactivos) a los componentes ya presentes en la muestra) y añadir uno o varios de estos marcadores a dispositivos para la recogida de muestras individualmente registradas o de control en laboratorios. Una combinación de marcadores estará presente en todas las muestras que se afirma se derivan de la muestra marcada. Si no se puede detectar la combinación apropiada de marcadores en las muestras marcadas, los resultados de análisis que se supone proceden de la muestra marcada serían sospechosos. Si la combinación de marcadores presente en la muestra marcada fuera detectada en cualesquiera muestras no marcadas (por ejemplo, en pruebas procedentes de lugares donde se han cometido delitos en el análisis forense), ello indicaría de manera convincente la contaminación de las muestras no marcadas. El uso de muestras marcadas que han sido marcadas utilizando el método y el dispositivo de la presente invención para fines forenses eliminará, por consiguiente, cualquier duda en la mente de miembros de jurados que toman parte en juicios con respecto a la integridad de la muestra.

Se pueden utilizar los marcadores de la presente invención como controles en la evaluación de procedimientos de laboratorio. Se pueden añadir los marcadores a un dispositivo de control de laboratorio en una concentración conocida para el laboratorio con el fin de proporcionar una norma interna que pueda servir como referencia para los análisis del equipo y el personal de los laboratorios. Un laboratorio puede utilizar los marcadores de la presente invención, suministrados en la forma indicada anteriormente, para fines de control de calidad, validación de

muestras, establecimiento de contaminación o confusión de muestras, análisis para la manipulación de muestras o pruebas de aptitud. La presencia de marcadores indica si el laboratorio funciona dentro de unos parámetros aceptables.

También se pueden utilizar los marcadores de la presente invención para determinar la integridad de una muestra marcada en un procedimiento de certificación o acreditación. Este método incluye en primer lugar un laboratorio de referencia que proporciona una muestra que comprende un material de análisis (por ejemplo, ADN que se va a analizar) y al menos un marcador detectable a un laboratorio para que analice el material de análisis, en donde al menos un marcador detectable está presente en la muestra en una identidad y/o una cantidad que es desconocida para el laboratorio de análisis. Este laboratorio de análisis lleva a cabo a continuación sus análisis sobre el material de análisis (por ejemplo, para detectar regiones polimórficas). Posteriormente, el laboratorio de referencia obtiene al menos una parte de la muestra, una vez que el laboratorio de análisis ha analizado el material de análisis. A continuación el laboratorio de referencia determina la integridad de la muestra al detectar la identidad y/o la cantidad del marcador detectable y al comparar los resultados con la información conocida con respecto a la identidad y/o la cantidad del marcador detectable. Los resultados serán evaluados por el laboratorio de referencia para garantizar el cumplimiento de las normas nacionales. Si el laboratorio que se va a analizar cumple las normas, el laboratorio recibirá la certificación o acreditación. La cantidad y los tipos de marcadores solo serán conocidos para un laboratorio externo o de referencia que ha sido certificado o aprobado previamente para llevar a cabo actividades de referencia de forma competente y objetiva.

Los marcadores que no son de ácido nucleico pueden ser de una gama amplia de materiales, siempre y cuando ayuden a establecer la identidad de una muestra y puedan ser utilizados para determinar la presencia o ausencia de la muestra marcada entre otras muestras que pueden ser procesadas por el mismo personal de laboratorio o en la misma ubicación física.

El dispositivo de recogida o de control de laboratorio de la presente invención no está limitado a una estructura física específica. El dispositivo de recogida o control de la presente invención puede ser cualquier dispositivo capaz de contener una muestra. Los dispositivos preferidos incluyen un tubo (preferentemente al vacío) o un sistema de recogida de membrana, como por ejemplo papel de filtro u otra matriz de recogida de sangre (por ejemplo, el papel FTA® de Fitzco o la matriz Isocode® de Scleicher & Schuell). El dispositivo elegido contiene preferentemente medios para la identificación de la identidad y/o la cantidad del marcador detectable mediante un código, como por ejemplo un número de serie único, un código de barras u otro identificador conocido que se pueda utilizar para identificar el dispositivo y que está correlacionado con uno o varios marcadores detectables contenidos en el mismo. Con independencia de la forma física que el dispositivo de recogida o control pueda adoptar, cada dispositivo está fabricado con uno o varios marcadores que no son de ácido nucleico. Cada uno de los marcadores puede ser añadido individualmente al dispositivo, o pueden ser combinados antes de su adición al dispositivo. Si el dispositivo de recogida o control es un tubo al vacío, se pueden añadir los marcadores después de que se ha extraído el aire del tubo y se ha sellado el mismo. Para un sistema de recogida de membrana, se pueden aplicar los marcadores a la membrana en una instalación de fabricación, o se puede recoger sangre de muestra en una jeringa o tubo al vacío que contenga un conjunto de marcadores, y después se aplican al sistema de recogida de membrana. Adicionalmente, se pueden utilizar marcadores que no son tóxicos para recubrir el interior de la aguja hipodérmica de recogida y cualesquiera dispositivos de manipulación de muestras intermedios, como por ejemplos tubos o jeringas.

Los marcadores incluidos en la presente invención pueden ser marcadores no nucleicos que pueden detectarse fácilmente con sondas específicas mediante amplificación por PCR o por otros métodos que resultan obvios para los especialistas en este campo, y están presentes en concentraciones suficientes para que puedan continuar siendo detectables después de procesar la muestra marcada por los métodos utilizados rutinariamente en análisis forenses, clínicos, de paternidad o veterinarios. Los organismos de los que se derivan los marcadores no deberían estar presentes normalmente en el entorno en el que se recoge la muestra, como por ejemplo los lugares donde se cometen delitos u otras ubicaciones que pueden hacer que la muestra resulte sospechosa. Entre los ejemplos de marcadores aceptables figuran secuencias de organismos típicos de las profundidades marinas, aguas termales, montañas o entornos árticos. Esto podría abarcar secuencias procedentes de organismos como los pingüinos, los cóndores, los gusanos de tubo que viven en fumarolas, o incluso animales extintos como el mamut, la paloma migratoria o el quagga. Adicionalmente, los marcadores no nucleicos no deberían interferir con cualquier procedimiento de análisis que se vaya a realizar sobre la muestra marcada. Algunos ejemplos serían la reacción cruzada con sondas de hibridación o cebadores de amplificación, o la alteración de la movilidad electroforética del ADN derivado de la muestra marcada, en comparación con el ADN no marcado de la misma fuente.

Se deberían analizar los marcadores utilizados de conformidad con la invención en laboratorios forenses mediante procedimientos forenses usados normalmente para determinar que no interfieren con los análisis de pruebas forenses. Con independencia de qué tipo de laboratorio esté llevando a cabo análisis de la muestra, se pueden detectar los marcadores utilizando técnicas habituales que se describen en la bibliografía.

Se detectarán los marcadores que no son de ácido nucleico incluidos en la presente invención, como por ejemplo los péptidos, las proteínas, los compuestos fluorescentes, los productos químicos o los elementos con unidades de masa isotópicamente diferentes, los tintes y tinturas mediante métodos apropiados conocidos en el estado de la técnica, como la fluorescencia de un compuesto conocido o la detección de productos químicos, proteínas o isótopos no radiactivos de marcador mediante métodos tales como la espectrometría de masas, la HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento), la inmunorreactividad, la electrofóresis capilar u otros medios conocidos entre los especialistas en este campo. También se pueden producir y utilizar como marcadores las bibliotecas químicas o familias de compuestos con diferentes longitudes y composición, de conformidad con la presente invención. Estas bibliotecas químicas pueden incluir combinaciones de aminoácidos, aminoalcoholes, cloruros de sulfonilo funcionalizados, isocianatos, ácidos carboxílicos, cloroformatos (véase Baldwin *et ál.*, *J. Am. Chem. Soc.* 117, págs. 5.588-89 (1995) y aminas secundarias (véase Ni *et ál.*, *J. Med. Chem.* 39, págs. 1.601-08 (1996)). Los compuestos como los descritos pueden ser alicíclicos, alifáticos, aromáticos, heterocíclicos, pueden contener fluorocarbonos, clorocarbonos (por ejemplo, benzenos halogenados, véase Nestler *et ál.*, *J. Org. Chem.* 59, págs. 4723-24 (1994)) u otros grupos sustitutivos que producen un perfil detectable definido. Adicionalmente, también se pueden utilizar microchips (microesferas) que están codificados con un transpondedor de radiofrecuencia (véase Moran *et ál.*, *J. Am. Chem. Soc.* 117, págs. 10.787-88 (1995). Los productos químicos de marcador utilizados deberían ser fácilmente detectables por métodos sensibles, como por ejemplo cromatografía de gases de captura de electrones, espectrometría de masas (incluidas ionización por electroaspersión y desorción por láser asistida de matriz MS), cromatografía líquida, cromatografía de capa fina o espectroscopia UV/luz visible.

El dispositivo de recogida preferentemente tendrá características de seguridad adicionales para proporcionar una protección contra manipulaciones indebidas. En una realización preferida, un dispositivo de recogida contará con un sello con precinto de seguridad encima del dispositivo y será sellado dentro de una bolsa a prueba de manipulaciones indebidas con el número de serie del dispositivo impreso en la bolsa y en el propio dispositivo. Cuando es necesaria la recogida de muestras, se le puede dar al donante de la muestra una fotografía de un dispositivo de recogida intacto y los sellos externos intactos antes de llevar a cabo la recogida de la muestra, y se le pedirá que firme o ponga sus iniciales para certificar que los sellos de seguridad se encontraban intactos con anterioridad a la recogida de muestras. También es posible que se necesite un segundo testigo, además del agente de recogida (por ejemplo, un flebotomista). De conformidad con la presente invención, la muestra será marcada instantáneamente en el momento en que se introduzca la muestra en el dispositivo de recogida, puesto que se encuentra presente al menos un marcador en el interior del dispositivo de recogida. Los sellos de seguridad garantizarán que los marcadores del dispositivo de recogida no son eliminados por alguien con la intención de manipular indebidamente o invalidar este sistema.

No se comunicará al usuario final la identidad y/o cantidad de marcadores utilizados dentro de cualquier dispositivo de recogida o control, excepto en situaciones muy concretas. Por ejemplo, se pueden suministrar los marcadores en identidades y cantidades conocidas en un dispositivo de control para su detección por parte de un laboratorio como parte de un procedimiento de control interno. Para dispositivos de recogida de muestras que contengan muestras marcadas, o para dispositivos de control utilizados para fines de certificación y/o acreditación, la presencia o ausencia de marcadores desconocidos puede estar determinada por un laboratorio externo que tenga conocimiento de la identidad y cantidad de los marcadores utilizados dentro del dispositivo de recogida. El laboratorio externo puede estar certificado o aprobado y debería estar capacitado para llevar a cabo esta tarea de una forma competente y objetiva. De esta manera se protege la integridad del marcador o marcadores contra una manipulación intencional y fraudulenta.

Mediante el uso de combinaciones de marcadores derivados de diversos organismos, la probabilidad de contaminaciones en el lugar donde se han cometido delitos procedentes de todos los organismos utilizados para producir secuencias de marcador sería sumamente pequeña.

A continuación se enumerarán algunos de los beneficios de la presente invención:

- Esta tecnología proporciona un medio de análisis para detectar la contaminación entre muestras, como por ejemplo muestras de pruebas judiciales, que se puede utilizar para determinar si los laboratorios tienen problemas en la manipulación de muestras. Se pueden utilizar los marcadores en un proceso de certificación para laboratorios y técnicos individuales.
- Se marca la muestra de una persona inmediatamente en el momento de la recogida. Puede utilizarse esta característica para resolver cualquier duda de validez o integridad de muestras. Se puede utilizar un conjunto único de marcadores para identificar cada muestra, si así se desea.
- En el análisis forense, las conclusiones derivadas de las muestras de pruebas judiciales procedentes de lugares donde se han cometido delitos pueden ser validadas por la ausencia de marcadores contenidos en una muestra recogida del sospechoso;
- En el caso de destrucción de etiquetas en el dispositivo de recogida, se puede determinar que el origen de la muestra de un paciente es el propio paciente al analizar los marcadores presentes en la muestra y establecer una correlación entre la identidad y/o cantidad de marcadores en el dispositivo de recogida. Un registro

independiente indicará que la muestra del paciente fue asignada a ese dispositivo de recogida específico, autentificando la identidad de la muestra.

- La cantidad y/o identidad de los marcadores utilizados es desconocida para el personal que se encarga de procesar la muestra, excepto cuando se utiliza como control interno.
- Los marcadores utilizados pueden ser de origen químico o proteínico, o una combinación de los mismos. De esta forma se proporcionan garantías adicionales de que se puede determinar que se ha producido una manipulación indebida.

Ejemplos

Cualquier ejemplo que se muestra a continuación y se encuentra fuera del ámbito de las reivindicaciones se incluye a título ilustrativo únicamente.

Ejemplo 1: Recogida de muestras

En este ejemplo, un tubo de recogida de muestras que contiene uno o varios marcadores está contenido en un paquete sellado a prueba de manipulaciones indebidas, con un número de serie en el paquete y el tubo de recogida contenido dentro de la bolsa de seguridad. Un flebotomista extraerá una muestra de sangre de la persona o animal al que se va a analizar y se requerirá al menos un testigo para firmar una declaración que afirme que se ha seguido el protocolo de recogida. El flebotomista llevará a cabo las siguientes acciones: (1) identificar con plena seguridad a la persona; (2) abrir la bolsa sellada y verificar que el número de serie en la bolsa coincide con el del tubo de recogida; (3) extraer la muestra de sangre de la persona utilizando una aguja mariposa suministrada con el equipo y acoplando el tubo de recogida de muestras hasta que éste quede lleno; (4) extraer la aguja de la persona y extraer el tubo de recogida de la aguja; (5) insertar la aguja en un tubo que contiene una solución destructora de ADN (que se describe más adelante) y acoplar un tubo de recogida al vacío y vacío al otro extremo de la aguja, de forma que la solución destructora de ADN pase a través de la aguja; (6) enviar el tubo de recogida de muestras con el resto del equipo de recogida utilizado y un impreso de cadena de custodia al laboratorio forense para su análisis.

Se prefiere utilizar un tubo sellado al vacío como dispositivo de recogida con el ADN y/o otros marcadores contenidos en el mismo, de tal forma que los marcadores no puedan escapar al medio ambiente. Alternativamente, se prefiere aún más añadir uno o varios marcadores a una matriz de recogida (preferentemente, papel FTA® fabricado por Fitzco) que une los fragmentos de ADN superiores a 1.000 pares de bases.

Se puede grabar en vídeo este procedimiento para garantizar el cumplimiento del protocolo de recogida. Otra opción puede ser incluir una tarjeta con una fotografía del equipo de recogida en su bolsa de seguridad intacta, y con una descripción de las características de la bolsa de seguridad, de manera que la persona a la que se va a analizar pueda inspeccionar la bolsa de seguridad y firmar con su nombre para certificar que la bolsa de seguridad estaba intacta y que el número de serie en la bolsa de seguridad y el dispositivo de recogida eran el mismo que los escritos en el impreso de cadena de custodia de pruebas. El testigo y el flebotomista firmarán un impreso de cadena de custodia de pruebas con el fin de certificar que la bolsa de seguridad estaba intacta antes de la recogida de pruebas, que la persona correcta proporcionó la muestra, que se extrajo la sangre utilizando el aparato suministrado con el equipo y se puso en el tubo de recogida o matriz de recogida de sangre marcados con el número de serie suministrado con ese equipo específico, y que se limpiaron todos los dispositivos de recogida complementarios para destruir toda la sangre residual. Después de llevar a cabo la recogida de la muestra de sangre, se extrae de la persona la aguja mariposa con tubo (dispositivo complementario de recogida, que también podría ser una aguja y una jeringa) y se destruye cualquier sangre residual dentro de los dispositivos de recogida complementarios mediante la aspiración de una solución destructora de ADN proporcionada con el equipo de recogida de pruebas (por ejemplo, una solución con un 10% de lejía o ácido clorhídrico a pH de 2) a través del dispositivo de recogida complementario. Lo más probable es que solo una aguja mariposa con su tubo acoplado constituya el dispositivo de recogida complementario. Esta aguja mariposa podría tener un color distintivo que sea distinto al de las agujas no marcadas. Después de la recogida de pruebas, la aguja mariposa usada será insertada en la solución destructora de ADN y se insertará el otro extremo de la aguja mariposa en un tubo al vacío, que puede contener una sustancia indicadora, y que cambia de color cuando se añade la solución destructora de ADN. También podría modificarse la reacción del indicador de tal manera que el desarrollo del color final requeriría una pequeña cantidad de sangre (hierro) de la traza de sangre residual contenida en la aguja mariposa. Este procedimiento colorimétrico demostraría rápidamente a los testigos que toda la sangre no marcada completamente ha sido destruida.

Se pueden revestir las superficies interiores de los dispositivos de recogida complementarios con marcadores no tóxicos, como por ejemplo uno o varios productos químicos que son fácilmente detectables por espectrometría de masas. Esto también garantizará que no existe ninguna sangre residual no marcada.

Ejemplo 2: Producción de equipo marcador con marcadores de ácido nucleico

Se producirán los marcadores de ácido nucleico por diferentes medios, entre los cuales pueden figurar la clonación, la síntesis directa, la amplificación por PCR y otros medios conocidos en este campo. Se llevará a cabo la producción de los marcadores en instalaciones separadas físicamente de cualquier laboratorio de análisis con el fin de evitar una transferencia involuntaria de los marcadores a un entorno de análisis forenses, clínicos, de paternidad o veterinarios. Una vez que se han producido, los marcadores individuales de ácido nucleico de diferentes fuentes pueden ser mezclados en combinaciones únicas. También se pueden añadir a la combinación de marcadores otros marcadores no nucleicos, como por ejemplo proteínas o productos químicos fácilmente identificados. Se puede añadir cada combinación a uno o varios dispositivos de control de laboratorio o de recogida de muestras, cada uno con su número de serie único que estará asociado a esa combinación única de marcadores. Se puede llevar a cabo la producción de mezclas de combinación fácilmente mediante una estación de pipeta robótica. Se pueden transferir todos los marcadores utilizando pipetas desechables con filtros con barrera de aerosol para impedir la contaminación cruzada, o mediante jeringas y agujas de uso único. Se puede almacenar la información relacionada con los tipos de marcador y los números de serie correspondientes en diferentes formatos, incluidos CD ópticos y discos duros de ordenador, manteniéndose una copia de seguridad en una ubicación independiente. Se pueden añadir los marcadores directamente a un dispositivo fabricado previamente mediante el uso de una jeringa y una aguja. En el caso de un tubo que se utiliza como dispositivo de recogida o control, se pueden añadir los marcadores a un tubo vacío, que después se liofilizan mediante centrifugación al vacío en el tubo. Se pueden colocar tapones de caucho de colores en el tubo mientras el tubo se encuentra al vacío. También se pueden usar tapones de colores únicos para distinguir fácilmente los tubos marcados.

En el caso de que se utilice un papel de filtro o una matriz de recogida de sangre como dispositivo de control o de recogida, se pueden colocar las soluciones que contienen ADN y/o otros marcadores en el papel de filtro o matriz de recogida de sangre y proceder a secarlas. La sangre que manche el papel de filtro o matriz será marcada gracias a los marcadores presentes en el dispositivo.

Se pueden producir agujas mariposa marcadas mediante la aspiración de una solución estéril de uno o varios marcadores no tóxicos a través de la aguja y el tubo. A continuación se puede permitir a la solución secarse en la aguja mariposa, con o sin vacío o calor adicional. Se puede suministrar un número de serie a cada aguja que coincide con un tubo de recogida, y se pueden añadir los mencionados uno o varios marcadores contenidos en la aguja mariposa a la base de datos para el tubo. Una muestra de sangre debería contener todos los marcadores que se encuentren en la aguja mariposa y el tubo de recogida. Después se envasan el tubo y la aguja juntos sirviéndose de una técnica aséptica en una bolsa de seguridad, diseñada para ser a prueba de manipulaciones indebidas, y que también puede estar marcada con el número de serie del dispositivo de recogida.

Se pueden proporcionar los dispositivos a los que se refiere la presente invención a departamentos de policía, prisiones, hospitales, laboratorios forenses, clínicos, de pruebas de paternidad y veterinarios, así como a otras organizaciones relacionadas con la recogida de muestras. La combinación de marcadores presentes en el equipo de recogida no se divulgará a la organización que obtiene la muestra. De esta forma se contribuirá a preservar la integridad de la muestra tomada de una persona específica.

Si, en el caso de análisis forenses, se extrajo la sangre de un sospechoso del dispositivo de recogida y se añadió a las pruebas procedentes del lugar donde se cometió un delito, toda la gama de marcadores sería detectable en las pruebas procedentes del lugar del delito, demostrando así de forma concluyente que las pruebas han sido contaminadas. Al utilizar marcadores que pueden detectarse fácilmente mediante anticuerpos, espectrometría de masas, fluorescencia u otros métodos conocidos entre los especialistas en este campo, se podrán analizar muestras muy pequeñas de pruebas, como por ejemplo manchas de sangre, de forma rápida y económica para detectar si contienen marcadores. Con el fin de garantizar que el sistema descrito en la presente invención no es invalidado, se prefiere utilizar marcadores de ácido nucleico o una combinación de marcadores de ácido nucleico y otros que no son de ácido nucleico, ya que algunos marcadores que no son de ácido nucleico pueden ser eliminados por determinados procedimientos utilizados para purificar el ADN contenido en las pruebas que se van a someter a un análisis forense de ADN. Los marcadores de ácido nucleico se co-purifican con el ADN de las pruebas, de forma que resulta sumamente difícil eliminarlos.

Si un laboratorio intentara manipular pruebas mediante la amplificación de las regiones forenses de ADN de uso corriente del sospechoso, purificando considerablemente los productos y ubicándolos después en las pruebas, esta acción podría ser detectada al someter a análisis adicionales dichas pruebas con respecto a las regiones polimórficas de uso menos corriente. Las regiones que no se analizan normalmente en el genoma del sospechoso estarían ausentes, lo que indicaría una manipulación indebida de las pruebas.

Ejemplo 3: Análisis para detectar la presencia o ausencia de marcadores

Por lo que respecta a marcadores que no son de ácido nucleico, se puede analizar una muestra para detectar la presencia o ausencia de dichos marcadores mediante espectrometría de masas o fluorescencia, técnicas que pueden detectar rápidamente la contaminación de muestras. Se analizarían marcadores tales como los ácidos nucleicos, los cuales no aparecen fácilmente cuando se utilizan instrumentos como un espectrómetro de masas, como se indica más adelante.

En un contexto forense, si la defensa o la acusación sospechan que se ha producido una manipulación indebida de pruebas o una mezcla en el laboratorio de pruebas y muestras de sospechosos, se puede enviar una muestra de la prueba o ADN no procesados extraídos de las pruebas a un laboratorio de referencia forense certificado (certificado por el fabricante, el FBI, el Instituto Nacional de Normas y Tecnología de Estados Unidos (NIST por sus siglas en inglés, *National Institute of Standards and Technology*) u otro organismo). No será necesaria una muestra del sospechoso. De esta forma se elimina el posible problema de una contaminación cruzada en el laboratorio de referencia. Tras la notificación, el fabricante o un organismo independiente proporcionarán al laboratorio de referencia un informe de los marcadores que estaban contenidos en el dispositivo o dispositivos de recogida utilizados para el sospechoso o sospechosos en el caso. Se puede enviar la secuencia de cebadores de PCR para detectar marcadores de ácido nucleico, o se pueden proporcionar cebadores reales. Si se incluyeran en el dispositivo de recogida proteínas como marcadores, entonces se puede proporcionar anticuerpos de detección o se puede enviar un listado de anticuerpos apropiados. Se incluirán los espectros de productos químicos de marcadores que no son de ácido nucleico para todos los productos químicos utilizados, junto con información sobre cuál es la mejor forma de detectarlos.

Para cada análisis que se realiza, el laboratorio de referencia deberá llevar a cabo controles positivos y negativos adecuados. Se deberá interpretar que la ausencia de marcadores en la muestra de pruebas elimina la posibilidad de contaminación; por otra parte, la presencia de marcadores implica la mezcla de pruebas. Si se encuentran uno o dos de los marcadores de ADN procedentes del dispositivo de recogida en una muestra de prueba, será posible realizar análisis para detectar la posibilidad de la presencia ambiental del marcador de ADN. El ejemplo que se expone a continuación aclarará esta cuestión. Digamos, por ejemplo, que se produce un crimen en la jaula de los pingüinos en un zoológico, y se ha utilizado una región de ADN de pingüino como uno de los marcadores en el dispositivo de recogida que se utiliza en ese caso. El marcador de pingüino en el dispositivo de recogida será una pequeña región definida de ADN de pingüino. Se pueden realizar análisis de PCR u otro ADN con cebadores o sondas para detectar regiones que no son del marcador del genoma del pingüino, y si se encuentran, se puede descartar el resultado positivo encontrado para marcador de pingüino en las pruebas. También se puede verificar la integridad de los especímenes mediante la presencia o ausencia de otros marcadores que estaban presentes en el dispositivo de recogida. Gracias al uso de marcadores de ADN procedentes de una combinación de organismos raros, extintos y aislados geográficamente con ADN producido artificialmente, la posibilidad de que todas estas secuencias existieran en un lugar donde se cometió un delito sería muy reducida, exceptuando la instalación de producción de marcadores.

El ámbito de la presente invención estará determinado por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1.Un dispositivo apropiado para marcar una muestra recogida, y dicho dispositivo comprende:
un medio de recogida que comprende un tubo o un sistema de recogida de membrana para recoger la muestra, en el que el medio de recogida incluye un revestimiento que comprende al menos un marcador detectable en una superficie interior del mismo; y en el que al menos un marcador detectable puede entrar en contacto con la muestra en el momento de recogida de la muestra para marcar la muestra recogida tras el contacto de la muestra con la superficie interior del medio de recogida, la cual tiene al menos un marcador detectable contenido en la misma; y en el que al menos un marcador detectable es distinto al componente que ya está presente en la muestra y es inerte a cualquier componente presente en la muestra; y en el que al menos una parte del marcador detectable pasa a la muestra recogida tras la recogida de la muestra para marcar dicha muestra, y que se caracteriza porque el marcador detectable es un marcador que no es de ácido nucleico.

2.Un dispositivo, de conformidad con la reivindicación 1, en el que el medio de recogida recoge y contiene la muestra.

3.Un dispositivo, de conformidad con la reivindicación 2, en el que el medio de recogida es un tubo y al menos un marcador detectable que no es de ácido nucleico está ubicado en una superficie interior del tubo.

4.Un dispositivo, de conformidad con la reivindicación 2, en el que el medio de recogida es un sistema de recogida de membrana y al menos un marcador detectable que no es de ácido nucleico está ubicado en una superficie del sistema de recogida de membrana o está incorporado al mismo.

5.Un dispositivo, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones comprendidas entre la 1 y la 4, en el que el medio de recogida es un sistema de extracción de sangre.

6.Un dispositivo, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones comprendidas entre la 1 y la 5, en el que la muestra es una muestra humana o animal.

7.Un dispositivo, de conformidad con la reivindicación 6, en el que la muestra es una muestra de fluido corporal o una muestra de tejido.

8.Un dispositivo, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones comprendidas entre la 1 y la 7, en el que al menos un marcador detectable que no es de ácido nucleico comprende al menos un miembro seleccionado de entre un péptido, una proteína, un compuesto fluorescente, un elemento isotópico, un compuesto isotópico, un tinte y una tintura.

9.Un dispositivo, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones comprendidas entre la 1 y la 8, que además comprende medios de identificación para identificar la identidad y la cantidad –o al menos una de las mismas– de al menos un marcador detectable que no es de ácido nucleico.

10.Un dispositivo, de conformidad con la reivindicación 9, en el que el medio de identificación identifica la identidad y la cantidad –o al menos una de las mismas– de al menos un marcador detectable que no es de ácido nucleico mediante un código.

11.Un equipo apropiado para marcar una muestra de prueba de fluido corporal que comprende:
un dispositivo de conformidad con la reivindicación 9 o 10; y medios de sellado con precinto de seguridad para llevar a cabo el mencionado sellado con precinto de seguridad de los medios de recogida y al menos un marcador detectable que no es de ácido nucleico.

12.Un método para marcar una muestra, el cual comprende la recogida de la muestra utilizando un dispositivo de recogida de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones comprendidas entre la 1 y la 10, y posibilita que la muestra entre en contacto con al menos un marcador detectable que no es de ácido nucleico para pasar al menos una parte del mencionado marcador detectable que no es de ácido nucleico a la muestra con el fin de marcar la mencionada muestra.

13.Un método para determinar la integridad de una muestra marcada, el cual comprende:
(a) el suministro de una muestra que está marcada de conformidad con la reivindicación 12;
(b) posteriormente, la detección de la identidad y la cantidad –o al menos una de las mismas– de al menos un marcador detectable que no es de ácido nucleico en la muestra marcada para proporcionar un resultado; y

(c) la comparación del resultado del paso (b) con la información conocida con respecto a la identidad y la cantidad –o al menos a una de las mismas– de al menos un marcador detectable que no es de ácido nucleico para establecer la integridad de la muestra marcada.

14.Un método, de conformidad con la reivindicación 13, en el que la información conocida en el paso (c) está codificada en el medio de identificación.

15.Un método para marcar una muestra de fluido corporal o tejido humanos con el fin de confirmar la identidad de una muestra en una fecha posterior; este método comprende el marcado de la muestra mediante un método de conformidad con la reivindicación 12, en el que el dispositivo de recogida comprende un medio de identificación para identificar la identidad y la cantidad –o al menos una de ellas– de al menos un marcador detectable que no es de ácido nucleico de tal forma que se pueda confirmar la identidad de la muestra en una fecha posterior al comparar el mencionado marcador detectable que no es de ácido nucleico en la muestra y el medio de identificación.

16.Un método, de conformidad con la reivindicación 15, en el que el medio de identificación contiene información conocida con respecto a la identidad y la cantidad –o al menos una de las mismas– de al menos un marcador detectable que no es de ácido nucleico codificado en el mismo.

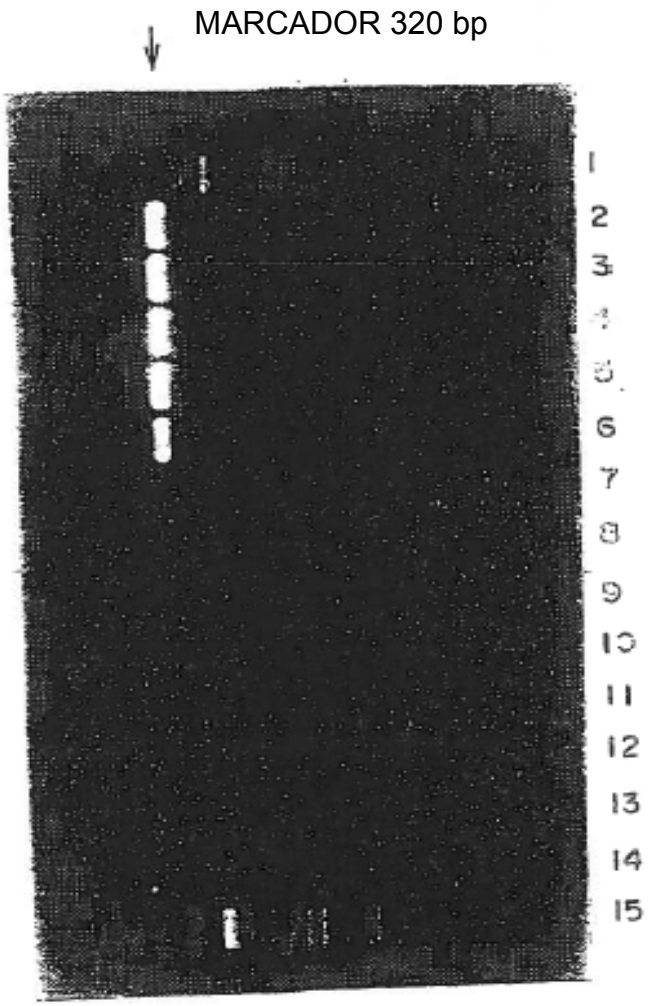

Fig. 1

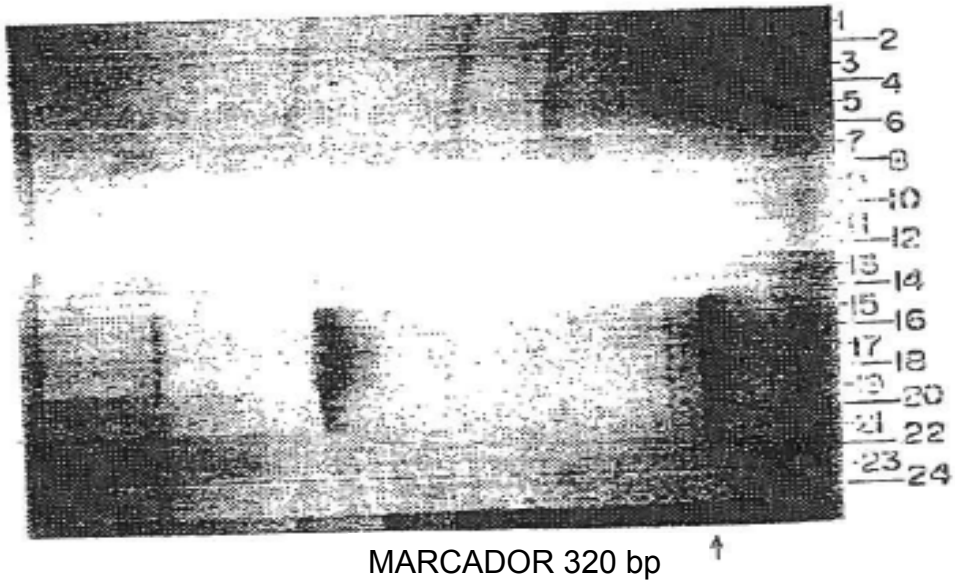

Fig. 2

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 4873193 A **[0006]**
- US 4953562 A **[0007]**
- US 5039616 A **[0007]**
- US 5179027 A **[0007]**
- US 4441943 A **[0008]**
- US 5451505 A **[0009]**
- WO 9619586 A **[0009]**

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **BALDWIN.** *J. Am. Chem. Soc.,* 1995, vol. 117, 5588-89 **[0033]**
- **NI et al.** *J. Med. Chem.,* 1996, vol. 39, 1601-08 **[0033]**
- **NESTLER et al.** *J. Org. Chem.,* 1994, vol. 59, 4723-24 **[0033]**
- **MORAN et al.** *J. Am. Chem. Soc.,* 1995, vol. 117, 10787-88 **[0033]**