

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 441**

51 Int. Cl.:

G01N 1/02 (2006.01)

A61B 10/00 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

C12M 1/30 (2006.01)

A61B 10/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2011 E 11151118 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2395337**

54 Título: **Método para la transferencia cuantitativa de analitos**

30 Prioridad:

09.06.2010 IT MI20101032

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

08.06.2015

73 Titular/es:

COPAN ITALIA S.P.A. (100.0%)

**Via Perotti, 10
25125 Brescia, IT**

72 Inventor/es:

TRIVA, DANIELE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 537 441 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

Método para la transferencia cuantitativa de analitos

5 La presente invención se refiere a un método para la transferencia cuantitativa de analitos. El método se puede aplicar, por ejemplo, en sectores clínicos, diagnósticos y, en general, analíticos, para permitir la obtención de muestras y la transferencia de cantidades predeterminadas conocidas de analitos a un lugar para su uso para análisis o ensayos de diversa naturaleza.

10 El método se puede aplicar específicamente para la recolección y la transferencia de diversas sustancias, tales como por ejemplo: microorganismos, anticuerpos/antígenos, sustancias de acción antimicrobiana, nucleótidos, antibióticos, hormonas, secuencias de ADN, enzimas, sustancias de enriquecimiento o suplementos selectivos de terreno cultivable, y en general material orgánico, material biológico o de origen biológico o similares.

15 La técnica anterior comprende numerosísimas aplicaciones en las que se deben usar cantidades conocidas de analitos, tales como sustancias orgánicas o biológicas, para diversas necesidades analíticas o diagnósticas. Por ejemplo, los programas de empresa para la verificación de las cualidades microbiológicas incluyen el uso de cultivos de microorganismos convencionales para la verificación de que se han cumplido los requisitos indicados por los patrones de referencia. Para este fin, se llevan a cabo controles microbiológicos para verificar y validar los métodos y procedimientos de laboratorio, que por ejemplo pueden comprender el control de la eficacia de los componentes selectivos y nutricionales del suelo usados para el cultivo de microbios, y también para la verificación de la eficacia de las operaciones de inactivación de microorganismos, o también para otros fines.

25 Un ejemplo conocido adicional viene dado por los kits diagnósticos que se proporcionan con controles positivos y negativos de una sustancia a identificar y que permiten el control y validación del propio kit, así como el procedimiento de ensayo y la preparación de la muestra a analizar. Por ejemplo, en los ensayos de búsqueda e identificación de una bacteria, con el objetivo de diagnosticar infecciones actuales y previas, como en el caso específico de *Staphylococcus aureus* en un ensayo por aglutinación, un control positivo que se realiza usando una muestra de la bacteria debe proporcionar una aglutinación evidente, mientras que un control negativo de la misma bacteria no debe dar aglutinación en los tiempos predeterminados incluidos en el protocolo analítico.

30 En un ensayo adicional, en los kits de investigación para inhibidores de matriz alimentarios, como en el caso específico de investigación para antimicrobianos en un ensayo de la leche, un control positivo que se realiza usando una solución que contiene un antibiótico debe proporcionar un resultado positivo en los tiempos establecidos y de acuerdo con los procedimientos de ensayo.

40 Normalmente, los controles positivos se suministran en forma líquida o liofilizada en gránulos, o polvos para rehidratar antes de su uso, puesto que la estabilidad limitada de los controles positivos rehidratados limita significativamente su vida útil. Además, en general se ve limitada la liberación cuantitativa en el caso de controles suministrados sobre un soporte, de manera que para obtener una respuesta positiva en un ensayo, hay una tendencia general a usar un exceso de muestra de control de la sustancia sometida a investigación, tal como superar el umbral cuantitativo para cada ensayo.

45 Como es sabido en el campo de los ensayos de resistencia de microbios, después del aislamiento del microorganismo es necesario determinar qué sustancia puede combatir el microorganismo, y en qué concentración. Normalmente, estos ensayos se llevan a cabo preparando una serie de diluciones seriadas partiendo de una solución matriz conocida. El procedimiento para la preparación de las diluciones es laborioso y por tanto tiene un efecto económico negativo sobre la productividad de los procesos realizados en el laboratorio analítico. Los dispositivos de recolección y transferencia de tipo conocido usados generalmente en laboratorios están constituidos, por ejemplo, por pipetas Pasteur, jeringuillas, almohadillas o cucharas.

50 En todos los ejemplos mencionados anteriormente, y en general en todas las metodologías de transferencia de analitos y sus análisis posteriores, hay muchas áreas problemáticas. Estas áreas problemáticas están relacionadas, por ejemplo, con la complejidad de los procedimientos de preparación de los analitos y las dificultades en su transferencia y conservación. Cabe señalar que muchos analitos requieren, para su conservación con el tiempo, de condiciones medioambientales muy específicas y controladas. Además, la cuantificación correcta de analitos con frecuencia es compleja, especialmente en el caso de uso de cantidades de analitos muy pequeñas, puesto que la única forma de obtener la pequeña cantidad deseada consiste en la preparación de una solución de analito cuando se necesita que tiene una concentración conocida y la extracción directa de una parte de la solución inmediatamente después de haberla preparado.

60 Con frecuencia, para realizar los análisis, son necesarias operaciones largas, complejas y caras. Además, diversas metodologías analíticas conocidas requieren el uso de cantidades extremadamente precisas de analito, para la realización de ensayos comparativos u otros análisis, y a menudo esto es difícil de obtener, si no es con operaciones delicadas y laboriosas. En otras palabras, con la técnica anterior no es posible aprovechar los diversos tipos de analitos cada vez que se necesiten, en las cantidades y modos específicos adecuados para la aplicación requerida.

Además, del documento de Estados Unidos 5.163.441, se conoce un dispositivo de transporte y recolección de una muestra biológica en poliuretano, y un método para la recolección y transporte de muestras microbiológicas y para la recuperación de antígeno detectable con dicho dispositivo. Además, del documento WO 2007/075412 se conoce un aparato y un método para la obtención de muestras superficiales de microbios con un alto rendimiento, en el que se obtiene una muestra desde un entorno o una superficie biológica usando un material de microfibras en forma de dispositivo de microfibras, toallita, o torunda. Además, del documento de Estados Unidos 4.030.978 se conoce un ensamblaje y un método para el transporte de microorganismos aeróbicos, aeróbicos y facultativos procedentes de un paciente clínico a un laboratorio, junto con un medio protector para mantener la viabilidad de los microorganismos durante su transporte. Además, del documento de Estados Unidos 2005/181517 se conoce un dispositivo de ensayo para la identificación de un analito de interés en una muestra. Además, del documento de Estados Unidos 2002/197738 se conoce un instrumento de pretratamiento y un método de pretratamiento de la saliva, usado para la identificación y cuantificación de *Streptococcus mutans* en saliva mediante un método inmunocromatográfico utilizando una reacción de antígeno-anticuerpo. Además, del documento WO 2009/134509 se conoce un dispositivo de obtención de muestras que incluye un montaje capilar configurado para extraer una muestra y retener la muestra por acción capilar. Además, del documento de Estados Unidos 2003/073932 se conoce un método para el aislamiento de componentes solubles procedentes de muestras de fluidos corporales que contienen material celular.

El objetivo principal de la presente invención es obviar uno o más de los problemas encontrados en la técnica anterior. Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para la transferencia de cantidades de analitos que permita la obtención de una muestra así como la transferencia cuantitativamente correcta y precisa de analitos.

Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un método para la transferencia cuantitativa de analitos que también sea muy eficiente para analitos que son difíciles de recoger, transferir, conservar o tratar.

Un objetivo adicional de la presente invención es poner a disposición un método para la transferencia cuantitativa de analitos que reduce el riesgo de contaminaciones por parte de los usuarios.

Un objetivo adicional de la presente invención es poner a disposición un método para la transferencia cuantitativa de analitos que se puede aplicar y es eficaz con un amplio espectro de analitos.

Un objetivo adicional de la presente invención es poner a disposición un método para la transferencia cuantitativa de analitos que proporciona analitos que están listos para su uso en ensayos analíticos o diagnósticos, también en cantidades que son muy pequeñas y precisas.

Un objetivo adicional de la presente invención es poner a disposición un método para la transferencia cuantitativa de analitos que permite la realización de un dispositivo de toma de muestras pre-dosificadas de una cantidad predeterminada conocida de analito y/o para cualquier cantidad, incluso una cantidad muy pequeña, de analito y/o en el que el método se puede realizar para un amplio espectro de analitos y/o en el que el dispositivo pre-dosificado presenta analitos en unas condiciones de uso rápido. Un objetivo adicional de la presente invención es poner a disposición un método para la transferencia cuantitativa de un analito que permite una reducción significativa de la complejidad, el tiempo y los costes involucrados en la realización de un amplio espectro de análisis y ensayos diagnósticos.

Un objetivo adicional de la presente invención es poner a disposición un método para la transferencia cuantitativa de un analito que sea simple y económico de usar.

Estos objetivos y otros, que aparecerán de forma más completa de la descripción siguiente, se obtienen esencialmente mediante un método para la transferencia cuantitativa de analitos como se expone en las reivindicaciones acompañantes.

La invención se define en las reivindicaciones anexas.

La Figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra esquemáticamente algunas realizaciones de un método de la invención;
 la Figura 2 es una vista lateral de un dispositivo de acuerdo con una realización de la presente invención;
 la Figura 2a es una vista de un detalle del dispositivo de la Figura 2, que se refiere a una parte de recolección;
 la Figura 3 es un contenedor de una realización de la presente invención.

La Figura 1 ilustra un método para la transferencia cuantitativa de analitos de la presente invención, que comprende al menos fases de preparación (fase A en la Figura 1) de una mezcla esencialmente homogénea, de al menos una cantidad inicial predeterminada de al menos un analito y un líquido; la obtención (fase A4) de al menos una concentración conocida del analito en la mezcla; la inserción (fase B) de al menos una porción de recolección 3 de un dispositivo de obtención de muestras 1 que tiene una estructura de soporte 2 en la mezcla, la porción de recolección 3 que comprende una primera porción 2a de la estructura de soporte 2 y una pluralidad de fibras 6 unidas y dispuestas sobre la primera porción 2a de la estructura de soporte 2 mediante texturización, para definir

una porción de recolección texturizada 3, o una torunda texturizada, para así recoger una parte de la mezcla sobre la porción de recolección 3.

5 En la presente descripción, la expresión "esencialmente homogénea" se refiere a mezclas definidas habitualmente como homogéneas, en las que los componentes no se pueden distinguir y se encuentran en una sola fase (por ejemplo, soluciones), y también tipos de mezclas generalmente consideradas heterogéneas, pero que en cualquier caso presentan, a nivel macroscópico, un alto nivel de mezcla recíproca que impide una distinción macroscópica de los diversos constituyentes. Por ejemplo, "esencialmente homogénea" se usa para referirse a cada sustancia que es esencialmente constante en cantidades suficientemente pequeñas, incluso si esto se obtiene únicamente durante un período limitado de tiempo gracias a una fase deliberada de mezcla de los componentes de las mezclas. En otras palabras, "esencialmente homogénea" se puede referir a una mezcla entre un analito y un líquido en la que es posible determinar, con un grado de precisión suficiente, la cantidad de analito contenido en una cantidad de mezcla de la que se pueden tomar muestras contenidas en una cantidad determinada de mezcla que se puede recoger mediante la porción de recolección 3 del dispositivo de toma de muestras 1, para determinar la cantidad de analito recogida. La mezcla puede estar saturada o no, y también puede presentar un residuo inferior, puesto que la parte de la mezcla de interés esencialmente homogénea es aquella en la que la concentración deseada se puede definir y es esencialmente uniforme en diversas zonas de la mezcla.

20 El método además comprende una fase de extracción (fase C en la Figura 1) de la porción de recolección 3 del dispositivo de toma de muestras 1 de la mezcla, al tiempo que retiene, sobre la porción de recolección 3 una cantidad predeterminada conocida a transferir de la mezcla. El método puede estar dirigido a analitos de transferencia tales como, por ejemplo, microorganismos, anticuerpos/antígenos, sustancias antimicrobianas, nucleótidos, antibióticos, hormonas, secuencias de ADN, enzimas, materiales orgánicos, materiales biológicos o materiales de origen biológico, suplementos de enriquecimiento o suplementos selectivos de terreno cultivable, o similares. La fase de preparación de la mezcla puede comprender sub-fases de preparación (fase A1) de la cantidad inicial predeterminada de analito; la mezcla (fase A2) de la cantidad inicial predeterminada de analito con el líquido para obtener una mezcla de la cantidad inicial predeterminada de analito y líquido, y/o una fase de obtención de la mezcla esencialmente homogénea (fase A3), por ejemplo, mediante uso de un vórtex y/o mediante agitación con el uso de un dispositivo agitador. La mezcla se puede preparar, por ejemplo, en un contenedor adecuado. La fase de obtención de un valor de concentración conocido del analito en la mezcla se puede realizar mezclando una cantidad conocida del analito con una cantidad conocida del líquido y/o mediante la fase de medición de un valor de concentración del analito en la mezcla.

35 El método además puede comprender una fase de medición (fase C1) de la cantidad de mezcla retenida eficazmente en la porción de recolección 3 durante la fase de extracción de la porción de recolección 3 del dispositivo de toma de muestras desde la mezcla. La fase de medición se puede realizar por comparación entre el peso inicial de la mezcla antes de insertar la porción de recolección 3 y el peso final de la mezcla después de la extracción de la porción de recolección 3, o por comparación entre el peso del dispositivo de toma de muestras 1 antes de la inserción de la mezcla y el peso del dispositivo de toma de muestras 1 después de la extracción de la mezcla.

45 El método además puede comprender una fase de deshidratación, desecación (fase D) o crio-desecación (fase E) de al menos la porción de recolección 3, provista de la cantidad predeterminada de mezcla a transformar, para obtener un dispositivo de toma de muestras pre-dosificado 1 que tiene una cantidad predeterminada de analito seco o crio-desecado sobre la porción de recolección 3. La fase de desecación se puede realizar, por ejemplo, desecando en un horno con ventilación forzada, o usando otro método de tipo conocido y adecuado para el tratamiento del analito específico. El dispositivo de toma de muestras pre-dosificado 1 comprende una estructura de soporte 2 y una porción de recolección texturizada 3 provista de una cantidad predeterminada conocida de un analito a transferir y/o una cantidad predeterminada y seca de un analito a transferir.

50 El método también puede comprender fases de inserción de la porción de recolección 3 en un contenedor de vacío (de tipo conocido y por tanto no ilustrado en las Figuras) y la generación de unas condiciones esencialmente de vacío en el contenedor. Esta fase de generación de vacío se puede llevar a cabo durante la fase de desecación o crio-desecación, o en otro momento, por separado respecto a la fase de desecación o crio-desecación.

55 El método además puede comprender una fase de revitalización o rehidratación (fase F) de la cantidad predeterminada de analito seco o crio-desecado, por ejemplo, con al menos una solución eficaz y/o hidratante, para obtener una cantidad predeterminada de analito rehidratado sobre la porción de recolección 3.

60 El método además puede comprender una fase de liberación (fase G) de al menos el 85 % de la cantidad predeterminada a transferir de la mezcla o de la cantidad predeterminada de analito, por medio de siembra directa sobre una placa, o dilución en un terreno líquido para permitir la realización del análisis sobre el analito. El método también puede comprender uno o más fases de análisis del analito liberado de esta manera.

65 El método además puede comprender fases de inserción de la porción de recolección 3, provista de el analito, en un contenedor 7 tal como por ejemplo un tubo de ensayo, el cierre del contenedor 7 con un tapón 5 o una cubierta de

cierre y la transferencia del contenedor 7 que comprende la porción de recolección 3 y/o la fase de preparación, en el contenedor 7, de una cantidad predeterminada de una sustancia 8 destinada a licuar y/o conservar el analito y/o una fase de agitación, remoción o rotación del contenedor 7 que comprende la porción de recolección 3 con el analito a una velocidad predeterminada y destinada a licuar el analito.

5 Ahora sigue una descripción de un dispositivo de toma de muestras 1 que también sirve para transferir una cantidad de analito, de acuerdo con una realización de la invención.

10 Con referencia a las Figuras de los dibujos, 1 indica en su totalidad un dispositivo manual 1 para la toma de muestras y la transferencia de cantidades de analitos de diferente naturaleza y composición. El dispositivo de toma de muestras 1 comprende una estructura de soporte 2 que puede ser alargada y/o esencialmente con forma cilíndrica. La estructura de soporte 2 puede tener cualquier sección, que incluso puede ser variable a lo largo de su extensión longitudinal. La estructura de soporte 2 está provista de una primera porción 2a, por ejemplo una porción terminal, que define una porción de recolección 3 para el analito, una segunda porción 2b que es central y esencialmente con forma cilíndrica, y una tercera porción 23c que es una porción terminal en la que la estructura 2 se puede agarrar manualmente por un operador o que se puede conectar a un elemento de agarre 4 adicional tal como una cubierta 5 para un tubo de ensayo o similar.

20 La porción de recolección 3 para el analito se puede conformar en forma de torunda. La porción de recolección 3 está texturizada, realizada por texturización de una pluralidad de fibras 6 sobre el primer extremo 2a de la estructura. Las fibras 6 texturizadas sobre el primer extremo pueden estar fabricadas de un material no hidrófilo, por ejemplo nailon, pero la porción de recolección 3 es hidrófila por efecto de la capilaridad gracias a las características de las fibras 6 y de su distribución sobre la estructura de soporte 2. En otras palabras, la porción de recolección 3 puede presentar una capa continua de fibras 6 fabricadas de un material esencialmente no absorbente de analito, pero conformadas en una pluralidad ordenada de intersticios capilares 9 en los que se puede retener una cantidad predeterminada del analito mediante imbibición, y de las cuales posteriormente se puede liberar cuantitativamente la cantidad de analito en el momento de su análisis, por ejemplo, frotando la porción de recolección 3 sobre una superficie de liberación especial.

30 Un ejemplo de este tipo de torunda texturizada se ilustra en la patente EP 1.608.268 que pertenece al mismo Solicitante, cuyo contenido en la estructura de la torunda texturizada se incorpora como referencia en la presente descripción.

35 Como se describe en la patente citada anteriormente, sobre el extremo involucrado del dispositivo de toma de muestras, se deposita mediante procedimientos de texturizado una capa continua y homogénea de una pluralidad de fibras 6 en disposición ordenada esencialmente perpendicular en cada punto de la primera porción 2a de la estructura de soporte 2 y cada una de las cuales que está esencialmente paralela a las fibras adyacentes 6. Se define una pluralidad correspondientemente ordenada de intersticios capilares 9 entre las fibras 6, en cuyos intersticios 9 se puede recoger y retener una cantidad predeterminada de analito por imbibición debido a capilaridad.

40 Posteriormente, la capa texturizada puede liberar cuantitativamente el analito recogido, por ejemplo, frotando sobre una superficie o por dilución del analito en un diluyente. La porción de recolección texturizada 3 está configurada y tiene unas dimensiones tales que recoge una cantidad esencialmente conocida de analito y/o mezcla, o que recoge una cantidad de mezcla comprendida, por ejemplo, entre 5 y 1000 μl , 10 μl y 500 μl , o entre 50 y 200 μl , o entre 80 y 120 μl . Las fibras 6 pueden estar dispuestas sobre una estructura de soporte 2 de forma esencialmente ordenada y tal que forme una capa esencialmente continua sobre la porción de recolección 3 y/o están dispuestas sobre la porción de recolección 3 tal que definan una pluralidad de intersticios capilares 9 destinados a absorber la mezcla por capilaridad. Las fibras tienen una densidad lineal o recuento de fibras entre 1,7 y 3,3 Dtex, y/o tienen una longitud comprendida entre 0,6 y 3 mm. Las fibras 6 se pueden texturizar sobre la porción de recolección 3 de la estructura de soporte 2 con una densidad superficial, por ejemplo, comprendida entre 50 y 500 fibras por mm^2 , o entre 100 y 200 fibras por mm^2 . La capa de fibras puede definir una capacidad de absorción, por ejemplo, de al menos 0,5 μl por mm^2 , o de al menos 0,6 μl por mm^2 , o de al menos 0,7 μl por mm^2 , o de al menos 0,75 μl por mm^2 . Las fibras 6 pueden estar fabricadas de un material esencialmente no hidrófilo, o un material que no adsorbe la mezcla o el analito, y/o de un material seleccionado entre: poliamida, rayón, poliéster, fibra de carbono, alginato, un material natural que es no adsorbente con respecto a la mezcla, o una mezcla de los materiales anteriores.

50 La estructura de soporte 2 puede presentar una extensión longitudinal que está comprendida entre 2 cm y 20 cm, o entre 3 cm y 18 cm, o entre 6 cm y 16 cm y/o un espesor o un diámetro en una sección perpendicular a su eje central que está comprendida entre 0,5 mm y 5 mm, o entre 1 mm y 3 mm, o entre 1,5 y 2,5 mm.

60 La porción de recolección 3 puede presentar una extensión longitudinal que está comprendida entre 8 cm y 0,5 cm, o entre 5 cm y 1 cm y/o un diámetro o un espesor, que comprende las fibras 6, entre 10 mm y 1 mm o entre 8 mm y 2 mm o entre 5 mm y 2,5 mm.

65 La porción de recolección 3 puede presentar cualquier forma adecuada para el tipo específico de analito del que tomar muestras, por ejemplo, redondeada o con una o más aristas naturales.

La estructura de soporte 2 puede estar provista de una porción debilitante intermedia destinada a facilitar la rotura selectiva de la estructura 2 en una de sus posiciones intermedias entre el primer extremo y el segundo extremo, por ejemplo, para facilitar la inserción de la porción de recolección 3 en un contenedor 7 para su transporte.

5 El dispositivo de toma de muestras 1 puede comprender una pluralidad de estructuras de soporte, cada una provista de una porción de recolección 3 que tiene una conformación o una forma que es diferente y configurada específicamente para la recolección de un tipo de analito específico, o para la recolección de una cantidad específica de analito. El dispositivo de toma de muestras 1 además puede comprender un contenedor 7 para el transporte del analito que tiene un asiento de contención interno 10 y una apertura de acceso 11. El contenedor 7 puede ser un tubo de ensayo para el transporte de muestras de material biológico o material de origen biológico. El dispositivo de toma de muestras 1 además puede comprender un tapón de cierre 5 que es amovible al acceso de apertura para cerrar selectivamente el contenedor 7.

15 El dispositivo de toma de muestras 1 además puede comprender al menos un elemento desecante o deshumidificante, por ejemplo, una bolsa que contiene gel de silicio, alojada en un contenedor 7 o en otra posición útil. El contenedor 7 y/o el tapón de cierre 5 y/o la estructura de soporte 2 pueden estar fabricados en un material plástico, por ejemplo, poliestirol o poliestireno o polipropileno y/o en un material adecuado para su uso como materiales biológicos o materiales de origen biológico. El contenedor 7 y/o el tapón de cierre 5 y/o la estructura de soporte 2 se pueden esterilizar.

20 El dispositivo de toma de muestras 1 además puede comprender un envase sellado (no ilustrado en las Figuras puesto que son de tipo conocido) en el que la estructura de soporte 2 y/o el contenedor 7 y el tapón de cierre 5 se pueden alojar antes de su uso para la recolección de un analito. La estructura de soporte 2, el envase, el contenedor 7 y el tapón 5 pueden estar esterilizados.

25 La invención además permite realizar un kit para llevar a cabo ensayos diagnósticos o químicos, tal como controles positivos o negativos, o para la transferencia de sustancias frágiles en medio acuoso para suplementos de terrenos de cultivo, que comprende al menos un dispositivo de toma de muestras 1 del tipo descrito anteriormente, y que además comprende medios para desecar o crio-desecar una cantidad predeterminada de mezcla sobre una porción de recolección 3 del dispositivo de toma de muestras 1 y/o medios para revitalizar una cantidad predeterminada de analito seco o crio-desecado o sobre la porción de recolección 3 del dispositivo de toma de muestras 1, tal como por ejemplo, tubos de ensayo que contienen soluciones nutritivas y/o hidratantes.

30 Como se ha mencionado previamente, la invención hace posible el diseño y realización de dispositivos pre-dosificados para la transferencia de analitos con una liberación esencialmente completa del analito recogido en el momento de uso deseado, la cantidad de analito usable que es de al menos el 85 % del analito de muestra recogido.

35 Los dispositivos pre-dosificados se pueden aplicar a diversos usos, entre los cuales se encuentran los campos diagnósticos, químicos, farmacéuticos, cosméticos, de alimentos, control de aguas, etc. Entre los analitos de los que se pueden obtener muestras y posteriormente poner a disposición para su uso en laboratorios, a modo de ejemplo se pueden mencionar los siguientes:

- 40 analitos de naturaleza biológica o microbiológica, tales como, por ejemplo, microorganismos, anticuerpos, antígenos, sustancias de acción hormonal, oligonucleótidos o secuencias de ADN, enzimas, etc.;
- 45 analitos de naturaleza química, tales como por ejemplo antibióticos, suplementos de enriquecimiento que comprenden proteínas, suplementos selectivos, etc.

50 Para una mejor comprensión de las características y ventajas de la invención, a continuación en este documento se proporcionan algunos ejemplos específicos, pero no limitantes, de puesta en práctica, con referencia a la realización preferida constituida por una torunda sobre uno de cuyos extremos se deposita una capa de fibras 6, tal como por ejemplo, fibras de nailon, mediante texturización. Una aplicación adicional es la transferencia de material orgánico procedente de diversas zonas del cuerpo o del medio ambiente. Además, puramente a modo de ilustración no limitante de la invención, se presenta una tabla en la que se resumen los principales campos de aplicación del sistema pre-dosificado, con respecto a la sustancia a examinar en los respectivos ensayos.

55

Campo de aplicación	Sustancia
Control de calidad	1. Micro-organismos
	2. Anticuerpos/antígenos
	3. Antibióticos
	4. Hormones
	5. Secuencias de ADN
	6. Enzimas
Ensayos de sensibilidad	7. Antibióticos
Terrenos de cultivo	8. Suplementos de enriquecimiento
	9. Suplementos selectivos

Ejemplo 1

En una primera realización de la invención, la invención se aplica a la transferencia de una cantidad de microbios estabilizados, por ejemplo, para la realización de un kit de control de calidad en el campo de la microbiología. Se realiza un dispositivo de toma de muestras pre-dosificado para la transferencia de microorganismos vivos que después de un proceso de deshidratación adecuado permite la conservación y transporte de poblaciones de microbios vivos y estables; al mismo tiempo el dispositivo de toma de muestras 1, en forma de torunda, proporciona un sistema adecuado para la siembra directa de la muestra de análisis sobre una placa o sustrato sólido o para su dilución en un disolvente o en un terreno líquido.

El kit comprende una torunda texturizada sobre la que, mediante imbibición y posteriormente un proceso de criodesecación, se recoge una colonia determinada de microbios a una concentración conocida. El campo de aplicación de estos dispositivos cubre diversas áreas alimentarias y clínicas. El kit incluye medios para revitalizar la colonia criodesecada, es decir, tubos de ensayo que contienen soluciones nutricionales y/o hidratantes.

Ahora se describirá un ejemplo específico, que se refiere a *Escherichia coli* ATCC 25922. No obstante, se pueden obtener resultados similares con otros microorganismos.

En el presente ejemplo, se prepararon torundas texturizadas pre-dosificadas de microorganismos criodesecados en forma cuantitativa: se transfirieron 300 ufc aproximadamente de *Escherichia coli* sobre la torunda, se sometieron a un proceso de criodesecación y a continuación se recuperaron al final del proceso de desecación. Los dispositivos pre-dosificados de microorganismos criodesecados se pueden usar como patrones de referencia en controles de calidad microbiológicos de diversos campos, tales como por ejemplo, la industria farmacéutica en ensayos de aguas y aguas residuales, la industria alimentaria, la industria cosmética, y otras.

Un requisito esencial para preparar estos dispositivos y garantizar la normalización de los métodos analíticos es que la liberación de la muestra depositada sobre la porción de recolección 3 del dispositivo de toma de muestras 1 debe ser completa durante su uso. Para preparar dispositivos de toma de muestras pre-dosificados 1, la porción de recolección texturizada 3 se embebe usando una solución microbiana a una concentración conocida para así garantizar que la cantidad total de 300 ufc aproximadamente se transfiera sobre cada torunda. La cantidad de inyección microbiana a usar, en el caso particular de la torunda, puede estar comprendida en un intervalo de 100 a 200 µl y en el caso específico, de 100 µl. La concentración de suspensión microbiana usada es de 3000 ufc/ml; la suspensión microbiana a la concentración deseada se realiza directamente en el medio de conservación que contiene sustancias crioprotectoras y agentes neutralizantes que son capaces de conservar la vitalidad de las células. La inyección de las torundas con la suspensión microbianas se consigue mediante inmersión directa en micropipetas; de forma similar se puede usar una bomba microvolumétrica. La torunda se inserta en un contenedor de vacío adecuado que puede soportar tecnología de vacío y criodesecación, que es el proceso de deshidratación elegido, y al final del proceso se cierra hermética y directamente en estado de vacío.

Los ensayos realizados para cualificar el dispositivo de toma de muestras 1 para la transferencia de una cantidad conocida se refieren a la verificación de la recuperación de las colonias depositadas, la vitalidad y la estabilidad con el tiempo a diferentes condiciones de conservación. Los ensayos se realizaron directamente mediante siembra sobre un terreno sólido o por solución en un volumen conocido, específicamente 500 µl de sustancia hidratante. La comparación para la verificación de la transferencia se realizó usando una misma siembra de la muestra recogida usando una micropipeta.

La siguiente tabla presenta los valores medios del recuento realizado por siembra directa sobre terreno sólido de las torundas pre-dosificadas con *Escherichia coli*, en comparación con resultados similares obtenidos usando un método volumétrico convencional para la transferencia de la suspensión microbiana, tal como la micropipeta. Los datos se refieren a una muestra de 50 torundas pre-dosificadas.

Tipo	Recuento con micropipeta	Recuento con torunda pre-dosificada	Intervalo (min.-máx.)	% de recuperación
<i>E. coli</i>	297,8	285,8	293-279	96 %

La tabla informa de los valores medios de los recuentos realizados por dilución del torunda pre-dosificada en 500 µl de PBS y la siembra sobre terreno sólido de toda la muestra reconstituida de esta manera con resultados similares obtenidos usando, para la transferencia de la suspensión microbiana, un método volumétrico convencional tal como la micropipeta. Los datos se refieren a una muestra de 50 torundas pre-dosificadas.

Tipo	Recuento con micropipeta	Recuento con torunda pre-dosificada	Intervalo (min.-máx.)	% de recuperación media
<i>E. coli</i>	297,8	288,1	290-286	97 %

Se ha demostrado que el torunda texturizada es un dispositivo excelente de transferencia de cantidades para mantener las colonias de microbios mediante un proceso de criodesecación. La reproducibilidad del sistema es

buena, al igual que su estabilidad con el tiempo.

Ejemplo 2

5 En una segunda realización de la invención, el dispositivo de toma de muestras 1 está comprendido en un kit de control de calidad en sistemas diagnósticos de flujo lateral de tipo inmuno-enzimático, tales como los kits para el virus de la gripe, Strep A, MRSA, HIV, RSV, y similares. En el caso particular del dispositivo de muestreo 1 se usa para la transferencia de antígenos/anticuerpos que después de un proceso de deshidratación permite la conservación y estabilización del analito. El sistema pre-dosificado con la cantidad de analito modulada de acuerdo con el LDD (límite de detección, o límite) del ensayo específico proporciona un control positivo que se puede usar en el kit diagnóstico de referencia.

15 El kit comprende una torunda texturizada sobre el que se coloca un antígeno o anticuerpo determinado a una concentración conocida mediante imbibición y un proceso de desecación posterior. El campo de aplicación de estos dispositivos cubre diversos ámbitos químicos y farmacéuticos. El kit incluye medios que permiten completar el ensayo. Estos son dispositivos cargados con antígenos o anticuerpos a los que el kit es sensible (en el caso de controles positivos) o sin antígeno/anticuerpo o con antígenos/anticuerpos que son diferentes de las dianas del kit (en el caso de controles negativos).

20 Además, estos controles tienen el objetivo de ilustrar, al usuario final, cómo se deben presentar los resultados positivos y negativos del ensayo. El dispositivo de toma de muestras 1 provisto con una capa continua de composición polimérica permite la interacción de un tipo adsorbente con los analitos transferidos, garantizando la recolección total del analito por el medio disolvente sin absorción interna de la capa. Este mecanismo de interacción superficial es una garantía de la liberación total del analito durante su uso.

25

Ejemplo 3

30 En una tercera realización de la invención, el dispositivo de toma de muestras 1 está comprendido en un kit de control de calidad para investigación para inhibir sustancias en la leche y sus derivados; también son posibles aplicaciones similares para otras matrices alimentarias. En este caso, el dispositivo de toma de muestras 1 es para la transferencia de sustancias antimicrobianas que permite sucesivamente un sistema de deshidratación adecuado para la deshidratación del analito para su conservación. El sistema pre-dosificado con una cantidad predefinida de sustancia antimicrobiana proporciona, después de la rehidratación, un control positivo para el ensayo de referencia en la muestra de leche. El kit comprende una torunda texturizada al que se adhiere, mediante un proceso de desecación, un antibiótico determinado con una concentración conocida. El kit incluye medios que permiten la realización del ensayo. Estos son dispositivos cargados con antibióticos a los que el kit es sensible (en el caso de controles positivos) o sin ningún antibiótico o con antibióticos que son diferentes de las dianas del kit (en el caso de controles negativos). Además, estos controles tienen el objetivo de ilustrar, para el beneficio del usuario final, cómo se deben presentar los resultados positivos y negativos del ensayo.

40

Ejemplo 4

45 En una cuarta realización de la invención, el dispositivo de toma de muestras 1 está comprendido en un kit para verificar la resistencia a antibióticos de determinados microorganismos (MIC, inhibidor de concentración mínima). En este caso, el dispositivo de toma de muestras 1 para la transferencia de sustancias antimicrobianas posteriormente permite que un sistema apropiado para la deshidratación establezca los antibióticos depositados y los ponga a disposición en ensayos de resistencia de microbios. El kit comprende una serie de torundas texturizadas sobre las que, mediante un proceso de imbibición y desecado, se adhiere una cantidad determinada diferente de sustancia antimicrobiana de concentración conocida. El campo de aplicación de estos dispositivos cubre diversos campos clínicos y farmacéuticos.

50

Ejemplo 5

55 En una quinta realización de la invención, el dispositivo de toma de muestras está comprendido en un kit de control de calidad con métodos bioquímicos. En este caso, el dispositivo de toma de muestras 1 es para la transferencia de nucleótidos y permite, después de un proceso de deshidratación adecuado, la conservación y estabilización del analito. El sistema, pre-dosificado con una cantidad de analito modulada de acuerdo con el límite del ensayo específico, proporciona un control positivo que se puede usar en el método diagnóstico de referencia. El kit comprende una torunda texturizada sobre la que, mediante un proceso de imbibición y posterior desecado, se adhiere un nucleótido determinado a una concentración conocida. El campo de aplicación de estos dispositivos cubre diversos ámbitos químicos y farmacéuticos. El kit incluye medios que permiten completar el ensayo. Estos son dispositivos cargados con nucleótidos que pueden reaccionar con los reactivos de los instrumentos de referencia, en el caso de controles positivos, o sin nucleótidos, en el caso de controles negativos. Además, estos controles tienen el objetivo de ilustrar al usuario final cómo se deben presentar los resultados positivos y negativos del ensayo.

65

Ejemplo 6

5 En una sexta realización de la invención, el dispositivo de toma de muestras 1 está comprendido en un kit para el control de calidad en ensayos para detectar hormonas (por ejemplo, test de embarazo, antidoping, etc.). En este caso, el dispositivo de toma de muestras 1 es para la transferencia de hormonas, que después de un proceso de deshidratación permite la conservación y estabilización del analito. El sistema pre-dosificado con una cantidad de analito modulada de acuerdo con el LDD (límite de detección, o límite) del ensayo específico proporciona un control positivo que se puede usar en el kit diagnóstico de referencia.

10 El kit comprende una torunda texturizada sobre la que, mediante un proceso de imbibición y desecado posterior, se adhiere una hormona determinada a una concentración conocida. El campo de aplicación de estos dispositivos cubre diversas áreas clínicas y alimentarias.

15 El kit incluye medios que permiten completar el ensayo. Estos son dispositivos cargados con hormonas a las que el kit es sensible (en el caso de controles positivos), o sin ninguna hormona o con hormonas diferentes de las hormonas dianas del kit (en el caso de controles negativos). Además, estos controles tienen el objetivo de ilustrar al usuario final cómo se deben presentar los resultados positivos y negativos del ensayo.

Ejemplo 7

20 En una séptima realización de la invención, el dispositivo de toma de muestras 1 está comprendido en un kit para la transferencia cuantitativa de muestras biológicas procedentes de diversas zonas del cuerpo, o muestras medioambientales de recolecciones de superficie. En particular, el dispositivo de toma de muestras 1 se usa para la transferencia cuantitativa de muestras clínicas, tales como orina, heces, lavados bronquiales, nasales, vaginales, de faringe, inguinales y otros frotis superficiales. La aplicación se refiere al control de contaminación microbiana de las muestras.

Ejemplo 8

30 En una octava realización de la invención, el dispositivo de toma de muestras se usa para la transferencia cuantitativa de una cantidad determinada de una muestra orgánica que comprende esperma, saliva, o sangre. La aplicación se refiere al análisis de los ácidos nucleicos contenidos en la muestra.

Ejemplo 9

35 En una realización adicional de la invención, el dispositivo de toma de muestras 1 comprende un kit para la transferencia, conservación y liberación de determinados suplementos de enriquecimiento y/o suplementos selectivos para terreno cultivado. El dispositivo de toma de muestras 1 para la transferencia cuantitativa de sustancias para incrementar la fertilidad del terreno de cultivo (por ejemplo aminoácidos, azúcares, proteínas, etc.) o que permite el crecimiento de determinados microorganismos mientras previene el crecimiento de otros (tales como por ejemplo sales, antibióticos, sustancias químicas, etc.) y especialmente cuando se encuentra embebido o deshidratado permite la obtención de un sistema pre-dosificado que se puede usar directamente en el volumen correcto de terreno líquido. Muchas de las sustancias usadas para enriquecer terreno de cultivo tienen una estabilidad limitada en estado hidratado; esto limita y compromete el uso del propio terreno. La ventaja de un dispositivo de toma de muestras pre-dosificado es que el sistema está disponible y listo para su uso, permitiendo alargar la vida útil del terreno de cultivo al simplificar la gestión de las medidas a tomar y la conservación del propio terreno. El campo de aplicación de estos dispositivos cubre diversas áreas clínicas, alimentarias y farmacéuticas.

50 La presente invención proporciona una o más de las siguientes ventajas.

En primer lugar, la invención permite la realización de un método y un dispositivo realizado de acuerdo con el método, que obvia los problemas encontrados en la técnica anterior.

55 Un método de la invención da lugar a la obtención de una muestra y una transferencia que son cuantitativamente correctas y precisas, de diversos tipos de analito, y de una forma muy eficiente, incluso con analitos que son difíciles de muestrear, transferir, conservar o tratar.

60 Además, la invención proporciona analitos que están listos para su uso en exámenes analíticos o diagnósticos, en cantidades que pueden ser muy pequeñas y precisas, gracias a la realización de cantidades pre-dosificadas que están listas para su uso.

La invención permite una reducción significativa en la complejidad, tiempo y costes involucrados en la realización de un amplio espectro de análisis y ensayos diagnósticos.

65 Con la invención, se pueden realizar sistemas pre-dosificados con diferentes sustancias antimicrobianas, gracias a lo cual la posterior inyección de los microorganismos en el terreno de crecimiento, añadidos a sistemas pre-

dosificados con antimicrobianos en diversas cantidades permite una definición sencilla de la sensibilidad y resistencia del microorganismo.

5 Además, la invención permite la obtención de un control cuantitativo positivo o negativo en una forma que es adecuada para su aplicación en casos específicos, tales como ser capaz de correlacionar la respuesta del kit a la concentración real del control positivo, dando como resultado la ventaja de evitar el uso de una muestra de referencia en exceso.

10 La aplicación de un sistema pre-dosificado con una cantidad predefinida de microorganismos crio-desechados en un formato que se puede adaptar inmediatamente a la propia aplicación da lugar a una reducción significativa de los costes y los tiempos de los procedimientos relativos.

Por último, la invención es simple y económica de usar.

15

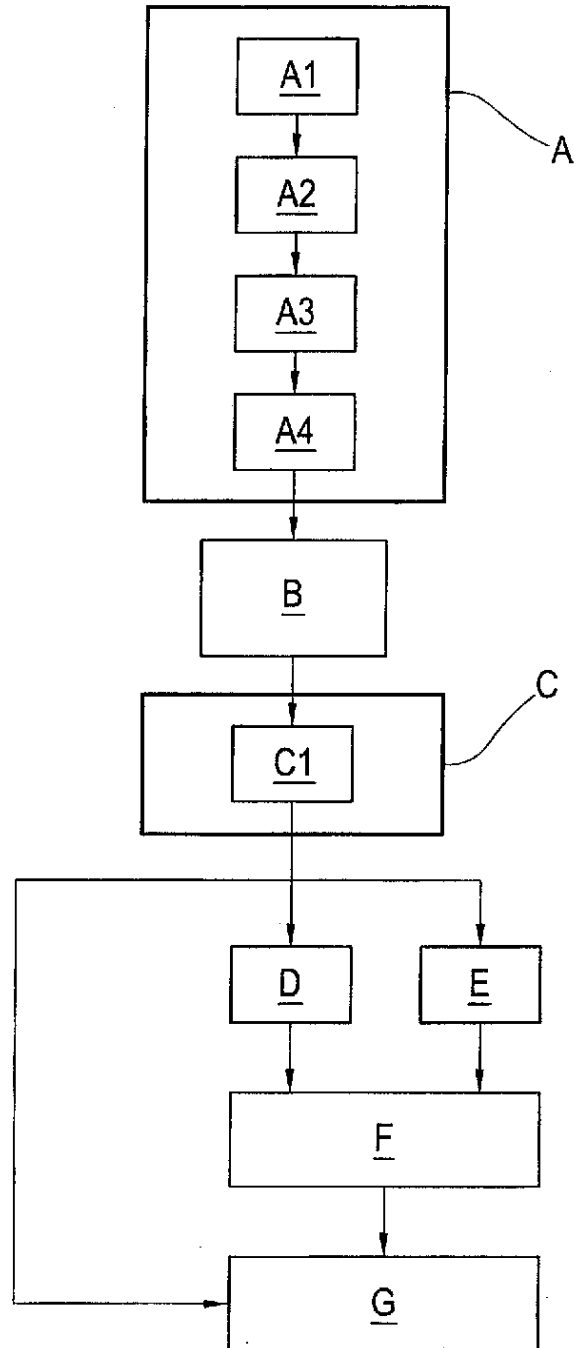
REIVINDICACIONES

1. Método para la transferencia cuantitativa de analitos, tales como microorganismos, anticuerpos/antígenos, sustancias de acción antimicrobiana, nucleótidos, antibióticos, hormonas, secuencias de ADN, enzimas, material orgánico, material biológico o material de origen biológico, suplementos de enriquecimiento del terreno o suplementos selectivos de tierra de cultivo o similares, que comprende al menos las fases de:
- 5 preparación de una mezcla esencialmente homogénea de una cantidad inicial predeterminada de al menos un analito y un líquido, obteniendo así un valor de concentración o una cantidad conocida del analito en la mezcla;
- 10 introducción en la mezcla de al menos una porción de recolección (3) de un dispositivo de toma de muestras (1) que tiene una estructura de soporte (2), comprendiendo la porción de recolección (3) una primera porción (2a) de la estructura de soporte (2) y una pluralidad de fibras (6) unidas y dispuestas sobre la primera porción (2a) de la estructura de soporte (2) por medios de texturización, para definir una porción de recolección texturizada (3) o torunda texturizada, para así recoger una parte de la mezcla sobre la porción de recolección (3);
- 15 extracción de la porción de recolección (3) del dispositivo de toma de muestras (1) procedente de la mezcla, reteniendo sobre la porción de toma de muestras (3) una cantidad predeterminada conocida de la mezcla a transferir; y
- 20 deshidratación, desecación o crio-desecación de al menos una porción de recolección (3) provista de la cantidad predeterminada de mezcla a transferir, para obtener un dispositivo de toma de muestras pre-dosificado (1) que tiene una cantidad predeterminada de analito seco o crio-desecado sobre la porción de recolección (3).
2. El método de la reivindicación 1, en el que la fase de preparación de la mezcla comprende las fases de:
- 25 preparación de la cantidad inicial predeterminada de analito;
- mezcla de la cantidad inicial predeterminada de analito con el líquido para obtener una mezcla de la cantidad inicial predeterminada de analito en el líquido, y/o la fase de: hacer que la mezcla sea sustancialmente homogénea.
3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la fase de obtención de un valor de concentración conocido del analito en la mezcla se realiza mezclando una cantidad conocida del analito con una cantidad conocida del líquido y/o por medio de una fase de medición de un valor de concentración del analito en la mezcla.
- 30 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende una fase de medición de una cantidad de mezcla que está retenida de forma eficaz en la porción de recolección (3) durante la fase de extracción de la porción de recolección (3) del dispositivo de toma de muestras (1) procedente de la mezcla y en particular, en donde la fase de medición se realiza por medio de una comparación entre el peso inicial de la mezcla antes de la inserción en la porción de recolección (3) y el peso final de la mezcla después de la extracción de la porción de recolección (3).
- 35 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que además comprende una fase de medición de una cantidad de mezcla que queda retenida eficazmente en la porción de recolección (3) durante la fase de extracción de la porción de recolección (3) del dispositivo de toma de muestras (1) desde la mezcla y/o en particular en donde la fase de medición se realiza por medio de una comparación entre el peso del dispositivo de toma de muestras (1) antes de la inserción en la mezcla y el peso del dispositivo de toma de muestras (1) después de la extracción desde la mezcla.
- 40 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la fase de desecación se realiza desecando en un horno con ventilación forzada, o usando otro método de tipo conocido y adecuado para tratar el analito específico.
- 45 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que además comprende las fases de inserción de la porción de recolección (3) en un contenedor de vacío y generación de unas condiciones esencialmente de vacío en el contenedor de vacío, durante la fase de desecación o crio-desecación independientemente de la fase desecación o crio-desecación.
- 50 8. El método de la reivindicación anterior en el que la porción de recolección (3) se cierra hermética y directamente en estado de vacío, después del proceso de deshidratación.
- 55 9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende una fase de revitalización o rehidratación de la cantidad predeterminada de analito seco o crio-desecado sobre la porción de recolección (3), por ejemplo, por medio de al menos una solución nutritiva y/o hidratante, para obtener una cantidad predeterminada de analito rehidratado sobre la porción de recolección (3).
- 60 10. El método de acuerdo con la reivindicación anterior que además comprende una fase de liberación de al menos el 85 % o al menos el 90 % o al menos el 95 % de la cantidad predeterminada a transferir de la mezcla o la cantidad
- 65

predeterminada de analito, por medio de siembra directa sobre una placa, o dilución en terreno líquido para permitir que se realice el análisis sobre el analito.

- 5 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la porción de recolección texturizada (3) está configurada de tal manera que reciba una cantidad esencialmente conocida de la mezcla, o para recoger una cantidad comprendida entre 5 y 1000 μl de la mezcla, o entre 10 μl y 500 μl de la mezcla, o entre 50 y 200 μl de la mezcla, o entre 80 y 120 μl de la mezcla, y/o recoger una cantidad de al menos 0,5 μl por mm^2 , al menos 0,6 μl por mm^2 , o al menos 0,7 μl por mm^2 , o al menos 0,75 μl por mm^2 y/o en el que las fibras (6) están dispuestas sobre la primera porción (2a) de la estructura de soporte (2) de forma esencialmente ordenada y de tal manera que forman una capa esencialmente continua sobre la porción de recolección (3), y/o están dispuestas sobre la porción de recolección (3) de tal manera que definen una pluralidad de intersticios capilares (9) adaptados para absorber la mezcla por capilaridad.
- 10
- 15 12. El método de la reivindicación anterior, en el que las fibras (6) tienen una densidad lineal o un recuento de fibras comprendido entre 1,7 y 3,3 Dtex, y/o una longitud comprendida entre 0,6 y 3 mm y/o una densidad superficial de las fibras (6) sobre la porción de recolección (3) comprendida entre 50 y 500 fibras por mm^2 , o entre 100 y 200 fibras por mm^2 y/o están fabricadas de un material esencialmente no hidrófilo o no adsorbente con respecto a la mezcla, y/o de un material seleccionado entre: poliamida, rayón, poliéster, fibra de carbono, alginato, un material natural que sea no adsorbente con respecto a la mezcla, o una mezcla de los materiales anteriores.
- 20
- 25 13. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la fase de inserción de una porción de recolección de la mezcla se realiza por inmersión directa de la porción de recolección en al menos un micro-contenedor o por medio de una bomba para micro-volúmenes.
- 30 14. Un dispositivo de toma de muestras (1) que comprende una estructura de soporte (2) y una porción de recolección texturizada (3), estando provista la porción de recolección (3) de una cantidad de un analito a transferir, **caracterizado por que** dicha porción de recolección (3) está provista de una cantidad conocida seca y predeterminada de dicho analito a transferir, produciendo así un dispositivo de toma de muestras pre-dosificado.
- 35 15. Un kit para realizar ensayos diagnósticos o químicos, tales como controles positivos o negativos, o para transferir sustancias lábiles en una fase hidratada para suplementar terrenos de cultivo, que comprende al menos un dispositivo de toma de muestras (1) de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el kit comprende además medios para desecar o liofilizar una cantidad predeterminada de mezcla sobre una porción de recolección (3) del dispositivo de toma de muestras (1) y/o medios para revitalizar una cantidad predeterminada de analito seco o crio-desecado sobre la porción de recolección (3) del dispositivo de toma de muestras (1).

FIG.1



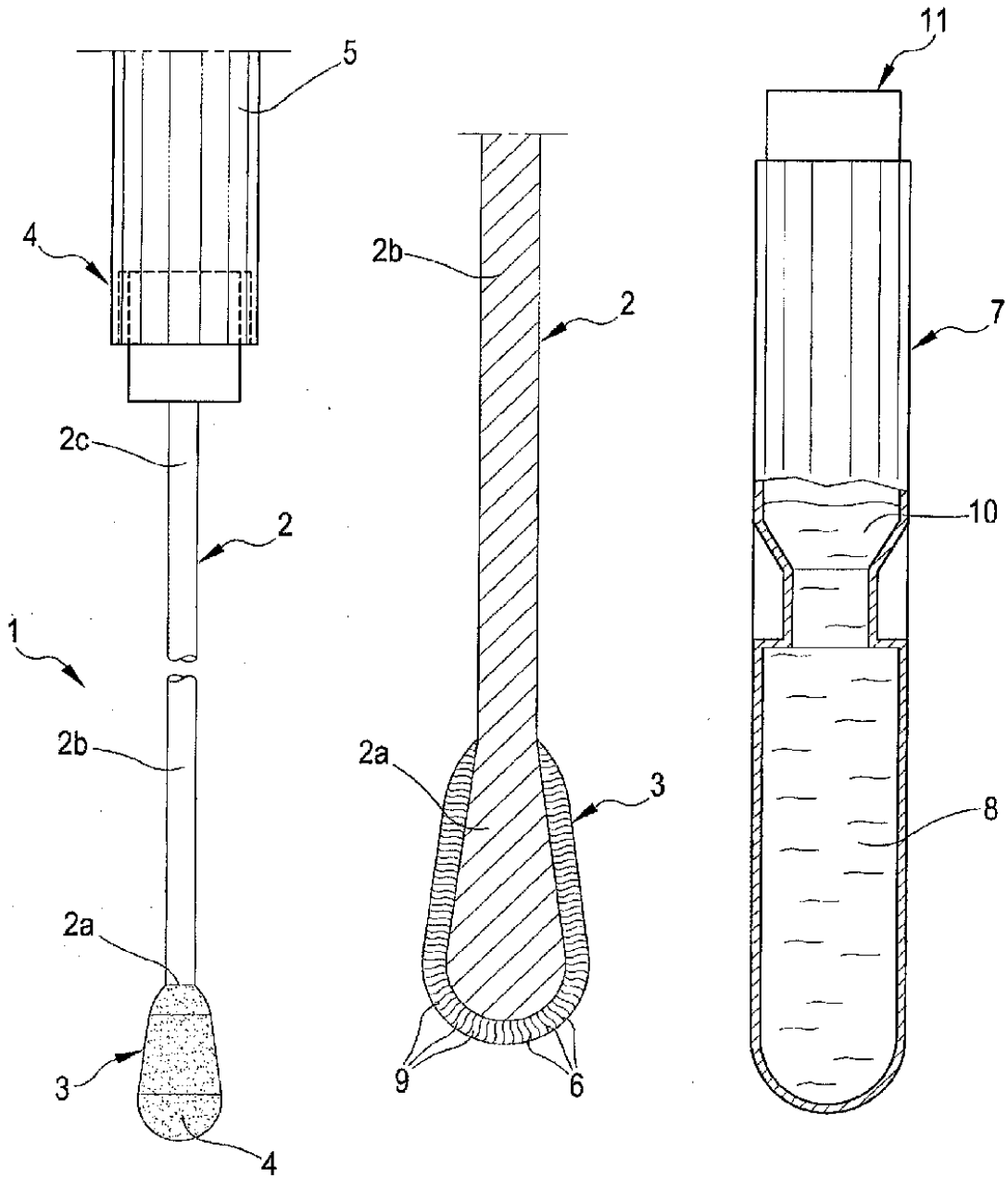


FIG.2

FIG.2a

FIG.3