

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 578 263**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2011 E 11736134 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2582843**

54 Título: **Dispositivo para una PCR directa usando un material polimérico como soporte de la muestra**

30 Prioridad:

18.06.2010 GB 201010237

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

22.07.2016

73 Titular/es:

**LGC LIMITED (100.0%)
Queens Road
Teddington, Middlesex TW11 0LY, GB**

72 Inventor/es:

**DEBENHAM, PAUL GERALD y
MOORE, DAVID JOHN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 578 263 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dispositivo para una PCR directa usando un material polimérico como soporte de la muestra

- 5 La presente invención se refiere a métodos y equipos para recoger muestras de ácidos nucleicos para su uso en reacciones de amplificación de ácido nucleico. La invención se refiere especialmente a métodos y equipos que son útiles para recoger muestras para análisis forenses, que se pueden usar, por ejemplo, en la escena de un crimen o de un accidente o en un lugar donde se ha producido una contaminación biológica, y que son adecuados para su uso con una intervención manual mínima.
- 10 El listado, o discusión, de un documento aparentemente publicado con antelación en esta memoria descriptiva no debe tomarse, necesariamente, como que el documento es parte del estado de la técnica o es conocimiento general común.
- 15 En la actualidad, la preparación de laboratorio para análisis de ADN de los mamíferos (incluyendo seres humanos) para el análisis de muestras sólidas biológicas requiere parte, o todo, de lo siguiente:
- La muestra se debe tratar de alguna forma, mediante alguna forma de humedecimiento o aplicación de una solución de tal forma que se extraigan las células de la matriz que está presente en, por ejemplo, sangre seca dentro de un tejido, o células cutáneas en un hisopo de algodón, etc. En otras palabras, la transferencia de la muestra se realiza mediante solubilización en un líquido.
- 20 La muestra debe tratarse de alguna forma para facilitar la separación del ADN de la matriz celular de proteínas, hidratos de carbono, otros ácidos nucleicos, etc. (es decir, necesidad de aislar el ADN).
- 25 El ADN separado debe purgarse de las proteínas de unión, etc. de forma que permita iniciar el proceso de análisis del ADN -por ejemplo, acceso de las ADN polimerasas para copiar el ADN en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o acceso de otras enzimas relativas a otros procesos de amplificación de ADN o enzimas de restricción que se unen, y escinden la secuencia de ADN (es decir, necesidad de limpiar el ADN).
- 30 La preparación debe purgar la muestra de inhibidores, ADNasas, etc. (es decir, necesidad de eliminar las sustancias químicas inhibitoras del análisis de ADN).
- 35 Para que tengan lugar cualquiera de las reacciones anteriores, las muestras secas deben solvotarse para disolver el material celular y ponerlo en solución (es decir, es un requisito que las células/ADN estén en solución).
- Los procesos anteriores requieren una manipulación cuidadosa de la muestra, medición de alícuotas de los reactivos de preparación, etc. todo ello suele necesitar normalmente un laboratorio y personal adecuado para llevarlo a cabo.
- 40 De este modo, la comprensión general es que las células de mamífero (incluyendo seres humanos) deben estar en solución para tratamiento y/o la manipulación preparativa, y se deben pretratar para prepararlas para el análisis del ADN.
- 45 El muestreo de soluciones celulares directamente para las reacciones de análisis de ADN es posible sin necesidad de etapas preparativas, aunque implica tipos limitados de muestras y/o tratamiento especializado para efectuar los análisis de ADN. Se ha establecido que la saliva puede colocarse directamente, o diluirse, en reacciones de la PCR y que se puede analizar el ADN genómico. Introducir la sangre directamente, o diluirse, en reacciones de la PCR ha demostrado requerir, en diferentes ocasiones, tampones y enzimas especializados para conseguir cualquier tipo de éxito reproducible. Los inhibidores de la PCR en soluciones celulares deben desactivarse, frecuentemente por dilución. Las células de tejidos necesitan recogerse de su entorno de cultivo y deben lavarse para eliminar los medios, etc. antes de introducirlas en la reacción de la PCR.
- 50 En otras palabras, las células en solución son adecuadas para su introducción directa en un equipo de análisis mediante PCR siempre que se haya aplicado la dilución o enzimología de polimerasa adecuadas para optimizar el análisis.
- 55 Las superficies y los materiales de vidrio se han definido hace mucho tiempo como una superficie hidrófila de unión a células, y el ADN, y también es una superficie adecuada para cebar o contener una reacción de PCR (por ejemplo, Nanassy et al Analytical Biochemistry 2007, vol 365 p240-245 muestran que el ADN genómico se recuperó eficazmente de un portaobjetos de vidrio sin tratar (adecuado para la PCR)).
- 60 El documento WO 03/057910 se refiere a un método para aislar el ADN usando un material con una superficie de sílice sin modificar, y la posterior amplificación en la presencia de la sílice sin modificar. Todos los ejemplos sugieren que se realiza una reacción de lisis en primer lugar para que el ADN esté disponible.
- 65

El documento WO 01/14590 describe una metodología que utiliza perlas magnéticas que contienen gel de sílice introducidas en una mezcla de ADN diana y separando a continuación el ADN unido a la matriz de sílice de la mezcla usando fuerzas magnéticas externas. Los ejemplos indican que el ADN está disponible para el gel de sílice mediante un procedimiento previo de lisis celular.

5 No se ha desarrollado ningún dispositivo de muestreo de vidrio específicamente para entrar en contacto con una muestra, tanto húmeda como seca, sin un tratamiento preparativo previo para transferir las células mediante el contacto directo desde la fuente a una reacción de PCR. Hasta la fecha, no se ha fabricado ningún dispositivo de muestreo que utilice la propiedad conocida del vidrio para recoger y transferir células/ADN mediante su aplicación a los mismos, por ejemplo, superficies secas/sólidas de forma que pueda transferirlas directamente a una reacción de amplificación de ADN/ARN.

15 Se ha investigado el uso de otras superficies sólidas para capturar células y ADN adecuados para el análisis de amplificación de ADN/ARN, y se sabe proporcionar cultivos microbianos en los que las colonias de bacterias se pueden tocar directamente (por ejemplo, con un palillo de dientes de madera) y transferirse las células bacterianas a las reacciones de la PCR sin ningún tratamiento (para plásmidos y genoma).

20 Las superficies pegajosas, por ejemplo, sellos de correos, pueden capturar células cuando se lamen. El material pegajoso no es adecuado para su introducción directa en la PCR y debe tratarse previamente para eliminar los materiales adherentes por disolución (por ejemplo, mediante pretratamiento de los sellos con xileno antes de realizar la extracción de ADN). El documento EP 1.972.688 proporciona un método para amplificar un ácido nucleico procedente de un microorganismo que implica una superficie sólida a pH bajo (3,00-6,00), lavar la superficie para eliminar los materiales no unidos y después usar la superficie para la PCR en etapas sucesivas dentro del mismo recipiente. Los documentos WO 2006/036243 y WO 2006/036246 enseñan el uso de materiales que se unen a soluciones celulares de tal manera que el ácido nucleico es adecuado para su posterior liberación para análisis con tratamiento posterior. Los materiales de soporte en fase sólida preferidos utilizan una porción de unión del ácido nucleico a amonio cuaternario.

30 Los documentos US 5.496.562, Los documentos US 5.807.527, US 6.27.226 y US 6.645.717 se refieren a una matriz de celulosa o de fibra de vidrio que se ha prehumedecido con sustancias químicas para lisar células de tal forma que, si la sangre o la saliva se ponen sobre la superficie, quedarán absorbidas y simultáneamente se conservarán mediante las sustancias químicas y se desecarán. El material que contiene ADN se debe pretratar para eliminar por lavado las sustancias químicas antes de usarlas en una reacción de PCR.

35 Las superficies de silicona (y Santoprene y otros elastómeros termoplásticos) se han considerado tradicionalmente como inertes para el proceso de capturar ADN y proporcionar superficies que retengan el ADN de manera natural en una forma adecuada para el análisis mediante la PCR. La silicona se suministra de muchas maneras, dependiendo de los grupos secundarios unidos a la estructura principal de silicio-oxígeno. Aunque se ha establecido que los grupos secundarios hidrófilos, tales como los grupos hidroxilo, crean polímeros que se unen al ADN, normalmente la silicona se constituye con grupos arilo o alquilo, creando una fuente hidrófoba que se considera biológicamente inerte.

45 El documento IE20040589 indica que la silicona se utiliza como un fluido transportador inerte. El documento JP2007244389 indica que la silicona se utiliza como una capa inerte en la que se recortan ranuras para permitir el flujo alrededor de la superficie de vidrio para la PCR, pero evitando las fugas (es decir, se supone que la silicona es inerte en el proceso). El documento JP2008012434 indica que la silicona es una matriz en la que se puede inmovilizar el ADN mediante el uso de una solución anfífilica con un disolvente orgánico para introducir el ADN en la estructura básica de la silicona en la que finalmente el ADN queda fijado al eliminar el disolvente. No se trata de un proceso de adsorción natural, porque los disolventes anfífilicos tienen partes hidrófilas e hidrófobas y, por tanto, se pueden utilizar para transportar las partes hidrófilas y/o se puede utilizar para transportar el ADN hidrófilo a las estructuras hidrófobas. A continuación, el disolvente se elimina para depositar el ADN, superando de esta forma la inhibición supuesta de la adsorción del ADN. Se ha descubierto que la presencia de moléculas de siloxano no polimerizadas dentro del PDMS (polidimetilsiloxano) mejora el uso del PDMS como sello en la impresión de soluciones de ADN en dispositivos de microchip/fluidicos (Thibault et al Langmuir 2007, 23, 10706-10714). El mecanismo no se comprende, pero la extracción con disolvente del siloxano sin polimerizar reduce la (supuesta) adsorción y transferencia del ADN en el proceso de estampado. No se había explorado con antelación un contacto por vía seca con una fuente de ADN.

60 Así, las anteriores solicitudes y publicaciones de patente parecen basarse en la premisa de que la silicona y los elastómeros termoplásticos son materiales inertes con respecto a la unión de células/ADN, pero dicha propiedad de superficie inerte se puede modificar para aumentar la adsorción del ADN tras el contacto líquido con soluciones de ADN.

65 Las superficies de plástico se han considerado históricamente neutras con respecto al proceso de capturar células y proporcionar una superficie para permitir el análisis de PCR. Los plásticos son, esencialmente, superficies hidrofóbicas y se considera que requieren un tratamiento para que se unan adecuadamente para unirse a las células

o al ADN. Como ejemplo, se puede considerar el tratamiento de las superficies de plástico para la adhesión celular para el cultivo de tejidos. Las superficies de policarbonato se suelen tratar con UV intensa, o con ozono para crear una superficie hidrófila. Véase Yanchao et al (2007) Anal. Chem. 79, 426-433 que describe diferentes tratamientos de poliestireno, policarbonato, poli(metacrilato de metilo) y polipropileno para conseguir la unión más adecuada. La unión de una sonda de ADN sobre superficies de plástico y dispositivos con canales para matrices de hibridación microfluídicos con oscilación de muestra se describen en Liu y Rauch, Analytical Biochemistry 2003, vol 317, p76-84. El documento EP 0 389 063 enseña que el poliestireno se puede usar para aislar ácido nucleico de materiales biológicos en la presencia de sustancias caótopas tales como sal de guanidinio, yoduro de sodio, yoduro de potasio, isotiocianato de sodio, etc. El polipropileno se considera como el material de elección para los recipientes de reacción para la PCR, ya que el material es muy inerte (véanse los estudios notificados en INSights vol 13 2002 por Anne van der Valk). Se estima que la unión para la totalidad de las superficies del tubo expuestas a 200 ng de ADN genómico humano es menor de 5 ng.

Por tanto, es que el plástico sin tratar no es una superficie adecuada para capturar células o ADN sin tratamiento previo.

El documento EP 1 675 511 describe un dispositivo de tipo frotis que se introduce en una cámara que, mediante la manipulación del dispositivo, pone el frotis en contacto con reactivos y posteriormente una tira reactiva, pero el dispositivo no se utiliza para el análisis de ácidos nucleicos. El documento WO 2005/047451 se refiere a una cuchara con un extremo desmontable, diseñada para recoger células de la boca e introducirlas en una solución estabilizada en un tubo. El ADN se recupera de las células para su análisis posterior. El documento 2008/0131876 describe un método para amplificar ácidos nucleicos a partir de una muestra de células poniéndola en contacto con una solución especial que modifica las células rápidamente para la PCR sin necesidad de extracción de ADN. El documento WO 2008/006501 se refiere a un dispositivo que suministra un frotis directamente a una cámara unida a un dispositivo de microfluidos para realizar la reacción de la PCR. El documento 1 049 801 menciona el uso de una membrana polimérica que se puede cargar para unirse al ADN, que se eluye posteriormente. Nikiforov & Rogers (1995) Anal. Biochem. 227, 201-209 se refiere al uso de placas de poliestireno de 96 pocillos para ensayos basados en la hibridación del ADN. Inouye & Hondo (1990) J. Clin. Microbiol. 28, 1469-1472 se refiere a la hibridación en microplacas de segmentos de ADN vírico amplificados.

De hecho, las muestras de escenas de delitos bien se recogen con frotis (por ejemplo, muestras de sangre o huellas dactilares) o se recortan del material (por ejemplo, una mancha de semen en la ropa interior) y el frotis o el material se introduce en un tampón de lisis celular del que se extrae, posteriormente, el ADN (véase, por ejemplo, Walsh et al (1991) Biotechniques 10, 506-513).

El documento WO 2005/032377 describe un kit de muestreo biológico que comprende un agente antimicrobiano y los usos del mismo.

El documento US 2008/0058676 describe un sistema de frotis de recogida segmentado.

El documento WO 2010/027283 describe un dispositivo para recogida de muestra adecuado para un bajo volumen de extracción.

El documento WO 2009/129397 describe un dispensador de alto rendimiento.

El documento US 2003/0059345 describe un dispositivo de muestreo de líquidos con dos pasadores.

Barbany et al (1999) Biomolecular Engineering 16, 105-111 describen aplicaciones en genética molecular de soportes de manguito recubiertos con estreptavidina.

El documento WO 99/34214 describe puntas en fase sólida y usos relacionados con las mismas.

El documento US 2002/0110812 describe un método de recogida de ácido nucleico de barrera, y el equipo.

El documento US 6.103.192 describe la inmovilización y el procesamiento de especímenes sobre materiales de matriz para la identificación de secuencias de ácido nucleico.

Barbara et al (2004) Forensic Science International 146S, S127-S128 describen la detección de STR a partir de fluido corporal recogido en dispositivos basados en el papel IsoCode.

El documento US 2004/0152085 describe una superficie para la recogida y/o la purificación de ácidos nucleicos.

Sigue existiendo necesidad en la técnica de métodos y dispositivos que sean útiles para recoger muestras que contienen ácidos nucleicos para el análisis forense, que se puedan utilizar en la escena de un delito, accidente, u otro evento, y que sea adecuado para su uso con una intervención manual mínima en un enfoque tipo "contacto y listo" o "recoger y listo".

Los autores proporcionan, entre otras cosas, métodos y dispositivos que necesitan solamente el contacto con la muestra (sólida o líquida) para capturar y presentar el ácido nucleico (normalmente, ADN de mamífero) en una forma adecuada para amplificación del ADN (PCR u otra) cuando posteriormente se introduce en reactivos de amplificación. La presencia del dispositivo, o una pieza del mismo, dentro de los reactivos, no interfiere con el proceso de amplificación, ni con el proceso de detección analítica posterior (por ejemplo, fluorescencia).

El trabajo descrito en el presente documento demuestra que la captura directa y el suministro de células de mamífero (incluyendo ser humano) para su análisis de amplificación de ácido nucleico se puede conseguir en un solo paso simplemente poniendo en contacto la transferencia ("contacto y listo" o "recoger y listo") mediante determinadas superficies poliméricas incluyendo plástico, silicona y vidrio, de forma que la hidratación, o la solvatación, de las células diana no sea necesario para su captura o transferencia a la reacción de amplificación de ácido nucleico, las ciertamente simples superficies convencionales de plástico y/o silicona son suficientes (normalmente sin modificación, aunque se pueden usar tratamientos que "esterilizan el ADN" del polímero, tal como irradiación UV o tratamiento con óxido de etileno gaseoso) para actuar o como parte de un dispositivo de muestreo para transferir las células desde una superficie celular seca o húmeda o una mancha, de tal forma que la propiedad de capturar las células en la superficie es tal que el ADN es adecuado para el análisis mediante la PCR y permanece unido y es reutilizable para introducirlo, si es necesario, en una segunda reacción de PCR, y que los dispositivos de muestreo poliméricos, o al menos una parte del mismo, se pueden dejar dentro de la reacción de amplificación sin ningún perjuicio para la reacción.

El trabajo descrito en el presente documento proporciona además dispositivos tales que las células sobre una superficie se pueden poner en contacto y transferirse no solamente a una sola reacción para análisis del ADN, sino también a múltiples reacciones discretas simultáneas, si es preciso.

Los autores establecen que, al contrario del dogma que los plásticos, siliconas y elastómeros termoplásticos deben tratarse especialmente para unir el ácido nucleico, de lo contrario, son inadecuados para capturar muestras de mamífero (incluyendo seres humanos) y cebar directamente las reacciones de amplificación, determinadas superficies de plástico y silicona pueden actuar como un dispositivo de muestreo adecuado para cebar una reacción de amplificación de ácido nucleico simplemente introduciendo la muestra directamente en contacto con la superficie, y depositando a continuación la superficie de contacto en la reacción de análisis del ADN. Estas superficies pueden estar sin tratar o se pueden tratar para "esterilizar el ADN" que contengan, de forma que no tengan asociado con el mismo ningún ácido nucleico detectable que pudiera interferir con una amplificación de ácidos nucleicos y la reacción de detección, tal como se detalla en lo sucesivo. Otras superficies naturales, tales como madera, látex y metales, se han sometido a ensayo como dispositivos de muestreo directo, y los autores descubrieron que no eran adecuados.

Los métodos y dispositivos descritos en el presente documento proporcionan portabilidad, facilidad de uso y análisis en un corto espacio de tiempo, y en el lugar donde se ha tomado la muestra de ácido nucleico.

La invención proporciona un equipo tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones.

Los autores proporcionan un método para preparar un recipiente de reacción que contiene una mezcla y un ácido nucleico que contiene material y está listo para llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico, comprendiendo el método

(a) proporcionar un recipiente de reacción que tiene una sola cámara y que contiene la mezcla de reacción para llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico y que dicho recipiente de reacción está precintado;

(b) proporcionar un dispositivo de muestreo;

(c) poner en contacto el dispositivo de muestreo con el material que contiene ácido nucleico de tal forma que, después de dicha puesta en contacto, el material que contiene ácido nucleico se adhiere a al menos parte del dispositivo de muestreo;

(d) desprecintar el recipiente de reacción;

(e) introducir el dispositivo de muestreo, o una parte del mismo al que se ha adherido el material que contiene ácido nucleico, dentro del recipiente de reacción de tal forma que el material que contiene ácido nucleico entra en contacto con la mezcla de reacción;

(f) volver a precintar el recipiente de reacción para que sea hermético, con el dispositivo de muestreo, o una parte del mismo al que se ha adherido el material que contiene ácido nucleico, aún presente en el recipiente de reacción.

El recipiente de reacción puede ser cualquier recipiente de reacción adecuado en el que llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico. Normalmente, el recipiente de reacción está hecho de plástico, en particular polipropileno. Convenientemente, el recipiente de reacción tiene un volumen de 50 µl a 3 ml, preferentemente de 100 µl a 1,5 ml. Normalmente, el recipiente tiene una sección transversal circular de 3 mm a 10 mm, normalmente de aproximadamente 5 mm.

Aunque el método se puede llevar a cabo usando un único recipiente de reacción, es conveniente, para una pluralidad de recipientes de reacción, que se reúnan o se soporten en un soporte común, y para que se preparen simultáneamente. Por tanto, normalmente, dos o tres o cuatro o seis u ocho o diez recipientes de reacción se reúnen para formar una matriz regular. Cada recipiente de reacción puede incluir la misma mezcla de reacción (por ejemplo, la misma reacción de la PCR para permitir la amplificación y la detección del mismo locus, o loci, genéticos), o pueden contener diferentes mezclas de reacción (por ejemplo, diferentes mezclas de reacción de la PCR para permitir la amplificación y la detección de diferentes locus, o loci, genéticos). Las matrices regulares de recipientes de reacción están convenientemente configuradas para encajar en un instrumento adecuado para llevar a cabo la reacción de amplificación de ácido nucleico y/o la detección de los productos. Los instrumentos adecuados incluyen los instrumentos termocicladores y los instrumentos de detección por fluorescencia. En algunas realizaciones, la matriz de recipientes de reacción puede incluir un recipiente de reacción que ya contiene un material que contiene ácido nucleico conocido predeterminado como control.

El material que contiene ácido nucleico se introduce en los recipientes de reacción utilizando el dispositivo de muestreo de tal manera que el dispositivo de muestreo, o una parte del mismo al que se ha adherido el material que contiene ácido nucleico, está presente en el recipiente de reacción. Normalmente, el material que contiene ácido nucleico queda retenido en el dispositivo de muestreo o parte del mismo, y este se sumerge en la mezcla de reacción. Durante la reacción de amplificación de ácido nucleico, las copias amplificadas del ADN se liberan en la solución de la mezcla de reacción.

Cuando existe una pluralidad de recipientes de reacción reunidos, como se ha descrito, normalmente el dispositivo de muestreo, o una parte del mismo al que se ha adherido el material que contiene ácido nucleico, se configura para permitir que el material que contiene ácido nucleico se distribuya entre la pluralidad de recipientes de reacción. Por tanto, por ejemplo, cuando existen N recipientes de reacción, el dispositivo de muestreo está configurado convenientemente de tal forma que permite que el material que contiene ácido nucleico se distribuya en el interior de cada uno de los N recipientes de reacción. Preferentemente, el material se distribuye de una forma sustancialmente uniforme entre los recipientes de reacción. Normalmente, N puede ser 2, 3, 4, 6 u 8. Preferentemente, N es 4. Preferentemente, cuando N es 4, los recipientes de reacción se sitúan en las esquinas de un cuadrado.

Se apreciará que el recipiente de reacción proporcionado en la etapa (a) está precintado. Normalmente, el precinto es hermético. Esto significa que la mezcla de reacción puede mantenerse exenta de contaminación hasta su uso. Durante el uso, el precinto se rompe antes de la etapa (e), pero se apreciará que las etapas (c) y (d) se pueden realizar en cualquier orden. El precinto puede ser cualquier precinto adecuado, y convenientemente, se puede retirar fácilmente. Un precinto típico para su uso en el recipiente de reacción es una lámina o película de plástico que se puede arrancar. Otros precintos, tales como los que están en forma de tapón con apertura a presión, también se contemplan para el recipiente de reacción proporcionado en la etapa (a). En la etapa (f), el reprecintado del recipiente de reacción evita la evaporación o el vertido durante los procedimientos analíticos posteriores. El material que contiene ácido nucleico suele permanecer en contacto con la mezcla de reacción.

El dispositivo de muestreo tiene varias características importantes. Tras el contacto con el material que contiene ácido nucleico, suficiente material se adhiere al dispositivo de muestreo para permitir la amplificación del ácido nucleico cuando el material, o la parte del mismo al que se ha adherido el material que contiene ácido nucleico, se introduce en el recipiente de reacción y se produce una reacción de amplificación de ácido nucleico. Convenientemente, el dispositivo de muestreo, o al menos la parte del mismo al que se ha adherido el material que contiene ácido nucleico, es por tanto capaz de capturar material celular, especialmente material celular de mamífero que está presente en una muestra secada seca tal como se describe con más detalle a continuación. Por "*adherido*" los autores incluyen el significado de que el material que contiene ácido nucleico queda unido al dispositivo de muestreo o una parte del mismo directamente sin ninguna necesidad de un material adhesivo independiente. Esto se consigue poniendo en contacto el dispositivo de muestreo o una parte del mismo con el material que contiene ácido nucleico, por ejemplo, frotando el dispositivo o parte del mismo sobre el material. El dispositivo de muestreo o parte del mismo suele ser no poroso.

El dispositivo de muestreo, o la parte del mismo al que se ha adherido el material que contiene ácido nucleico, permanece en el recipiente de reacción durante la reacción de amplificación de ácido nucleico y, por tanto, debe ser compatible con las condiciones de la reacción de amplificación de ácido nucleico.

Sorprendentemente, se ha descubierto que los siguientes polímeros, sin ningún tipo de derivatización química o pretratamiento, son capaces de recoger suficiente material que contiene ácido nucleico tras el contacto con una muestra, y no interfieren con una reacción de amplificación de ácido nucleico cuando está presente durante la reacción. Adicionalmente, sorprendentemente, se ha descubierto que, después de la reacción de amplificación de

ácido nucleico, sigue asociada una cantidad suficiente de material que contiene ácido nucleico a dichos polímeros de forma que se puede utilizar en otra reacción de amplificación de ácido nucleico. La muestra puede ser una muestra húmeda o una muestra seca. Una muestra húmeda se puede adherir al dispositivo o parte del mismo mediante adhesión y transferencia en medio líquido. Normalmente, cuando la muestra es una muestra seca, existe adhesión del material celular que contiene ácido nucleico. Preferentemente, la muestra es una muestra seca.

Los polímeros son vidrio, copolímero de olefina cíclica tal como Topas, un acrílico tal como poli(metacrilato de metilo) (PMMA), poliestireno cristalino, polipropileno, polietileno de alta densidad (HDPE), policarbonato, poliestireno de medio impacto, poli(cloruro de vinilo) (PVC), polímero de cristal líquido 30 %, transacrilonitrilo-butadieno-estireno (Trans ABS), copolímero de acetal, poliéster, polieterimida, polietileno, nailon, poliéter poliuretano, copolímero de bloques estireno-butadieno, copolímero aleatorio de polipropileno, etileno-acetato de vinilo, siloxano, tal como poli(metil dioxano siloxano) (PDMS), y elastómero termoplástico tal como Santoprene. Preferentemente, el polímero es uno al que un material seco que contiene ácido nucleico, tal como una muestra seca de material celular, puede adherirse tras el contacto entre el dispositivo o parte del mismo fabricado a partir del polímero y la muestra. Por tanto, es especialmente preferido que el dispositivo de muestreo, o al menos la parte del mismo al que se ha adherido el material que contiene ácido nucleico, esté fabricado de uno o más de estos polímeros. Es preferido que el polímero no esté en forma de una espuma, especialmente una espuma suelta. El polímero no es látex. El polímero puede ser cualquier polímero adecuado impregnado en vidrio, tal como cualquiera de los polímeros enumeradas anteriormente (salvo el vidrio) impregnado en vidrio. Normalmente, el polímero soporta una temperatura de 100 °C. Por ejemplo, no se descompone ni se deforma a dicha temperatura.

Es especialmente preferido si el polímero es cualquiera de PMMA, polipropileno, policarbonato y PDMS. El policarbonato es especialmente preferido.

Numerosos diseños del dispositivo de muestreo, algunos de los cuales se describe de forma más detallada a continuación, son adecuados para su uso en la invención. Se clasifican en dos categorías generales que incluyen, en primer lugar, aquellos en los que el dispositivo de muestreo, o una parte del mismo al que se ha adherido el material que contiene ácido nucleico, encaja en el recipiente de reacción (tras su desprecintado) y permite que el recipiente de reacción se vuelva a precintarse con un precinto diferente en la etapa (f). El precinto separado puede ser, por ejemplo, una lámina, una película de plástico o un tapón con apertura a presión. La segunda categoría, la preferida, es aquella en la que el dispositivo de muestreo, o una parte del mismo al que se ha adherido el material que contiene ácido nucleico, proporciona el precinto del recipiente de reacción en la etapa (f). Las realizaciones de esta categoría se describen de forma más detallada a continuación.

Convenientemente, el dispositivo de muestreo, o una parte del mismo al que se ha adherido el material que contiene ácido nucleico, se introduce directamente en el interior del recipiente de reacción sin ningún tratamiento adicional tras el muestreo.

La mezcla de reacción para llevar a cabo cualquier reacción de amplificación de ácido nucleico adecuada que incluye, aunque no de forma limitativa, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o métodos isotermos tales como la reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación isoterma mediada en bucle (LAMP), amplificación mediada con transcripción (TMA), amplificación mediada de la señal para tecnología de ARN (SMART), amplificación con desplazamiento de cadena (SDA), amplificación de círculo rodante (RCA), amplificación con desplazamiento isoterma múltiple (IMDA), amplificación dependiente de helicasa (HAD), amplificación isoterma de cebador único (SPIA), amplificación dependiente de helicasa circular (CDHA) y amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA). Se prefiere la PCR; sin embargo, puede observarse de los ejemplos que el tratamiento a temperatura elevada (casi 100 °C) no se requiere para que el ADN esté disponible para su amplificación, y tampoco los métodos de baja temperatura como LAMP, que es isoterma, son adecuados.

Por tanto, la mezcla de reacción contiene todos los ingredientes necesarios, salvo el ácido nucleico que se debe analizar, para llevar a cabo la reacción de amplificación de ácido nucleico.

Por tanto, por ejemplo, para una PCR, la mezcla de reacción contiene cebadores de PCR, desoxinucleótidos, una ADN polimerasa, iones Mg^{2+} y una solución tamponada a aproximadamente pH 7-8. Para otros métodos de amplificación del ácido nucleico, están presentes otras enzimas como ARNasa H o ligasa.

Se ha descubierto que no es necesario pretratar el material que contiene ácido nucleico antes de la reacción de amplificación de ácido nucleico. Además, puede que no sea necesario disponer ningún reactivo especial en la mezcla de reacción de amplificación de ácido nucleico, más allá de los necesarios para la reacción. Por tanto, se prefiere que la mezcla de reacción esté prácticamente exenta de agentes caótopos. De manera similar, se prefiere que la mezcla de reacción esté prácticamente exenta de agentes de lisis celular. Sin embargo, en algunas realizaciones, un detergente no iónico, tal como Tween-20, puede estar presente. Por "prácticamente exento" de dichos agentes, los inventores entienden que el agente está ausente, o que está presente a una concentración tan baja que no ejerce su efecto caótopo o de lisis celular, según el caso. Es especialmente preferido que la mezcla de reacción esté prácticamente exenta de cualquiera de urea, sales de guanidina (tal como clorhidrato de guanidina), detergentes, especialmente detergentes iónicos.

En una realización especialmente preferida, la mezcla de reacción también incluye reactivos para la detección del producto de ácido nucleico de la reacción de amplificación de ácido nucleico. Por tanto, normalmente, la mezcla de reacción también contiene sondas de ácido nucleico marcadas de forma detectable. Las sondas especialmente preferidas son sondas de oligonucleótidos marcadas de forma fluorescente que se pueden hibridar con el producto de la reacción de amplificación de ácido nucleico. Las sondas de oligonucleótidos adecuadas y los sistemas de detección por fluorescencia se describen, por ejemplo, en los documentos WO 2001/73118, WO 2007/010268, WO 2009/053679, que se han incorporado por referencia en el presente documento. Es especialmente preferido que se realice un análisis de repeticiones cortas en tándem t (STR), por ejemplo, en el ADN de huellas dactilares humanas. Se apreciará que es ventajoso que la detección se pueda llevar a cabo durante o después de la reacción de amplificación del ácido nucleico, en el recipiente de reacción precintado, ya que el desprecintado del recipiente tiene el potencial de introducir contaminación. Los resultados de la amplificación se pueden observar directamente en la reacción de amplificación, por ejemplo, mediante luz fluorescente, o mediante muestreo de la solución de la mezcla de reacción, dejando el dispositivo de muestreo en el recipiente, y analizando el ADN amplificado, por ejemplo, mediante electroforesis en gel.

El material que contiene ácido nucleico puede tener cualquier origen, pero preferentemente el origen son los eucariotas superiores, tales como plantas o mamíferos. Los eucariotas superiores incluyen animales, incluyendo vertebrados. Se prefiere el ácido nucleico de origen mamífero, tales como seres humanos. Se prefiere que el ácido nucleico sea ADN. Se prefiere que el ácido nucleico sea ADN genómico, pero el ácido nucleico vírico, que se ha derivado de una célula eucariota superior, está incluido en el término "originado en un eucariota superior". Normalmente, el ácido nucleico está presente en el interior de las células de mamífero, y el material que contiene ácido nucleico es material celular de mamífero. El material celular de mamífero, incluyendo seres humanos, incluye sangre, saliva, semen, células tales como las células de la piel y material celular que se ha depositado sobre una superficie sólida, por ejemplo, células de la piel que se pueden dejar como parte de una huella dactilar. El material que contiene ácido nucleico puede estar prácticamente exento de material que no sea ácido nucleico.

En muchas aplicaciones, el material que contiene ácido nucleico está prácticamente seco. Por "prácticamente seco", los autores entienden que la muestra no tiene signos visibles de humedad asociada. Por ejemplo, el material que contiene ácido nucleico pueden ser células tales como las células de la piel, sangre seca, semen seco, saliva seca u otros fluidos corporales secos. Sorprendentemente, se ha demostrado que es innecesario solvatar el material seco antes de tomar la muestra, y se ha descubierto que la muestra seca se puede introducir directamente en el recipiente de reacción sin tratamiento previo.

Aunque no se limita a este uso, se apreciará fácilmente que la invención tiene aplicaciones en la ciencia forense, especialmente en la escena de un delito. También se contemplan aplicaciones clínicas tales como la detección de enfermedades genéticas, y el análisis de "la fuente o la procedencia" de alimentos, materiales vegetales o animales, y otros. De manera similar, los métodos y equipos de la invención abarcan en su alcance el muestreo de ácidos nucleicos de, por ejemplo, un lugar contaminado por una enfermedad. Como ejemplos, se pueden considerar ubicaciones con una contaminación por patógenos virulentos (como por ejemplo, los de la gripe aviar, síndrome respiratorio severo agudo (SARS), denominado "Gripe porcina" y enfermedad de pie y boca). En dichas ubicaciones, puede ser extremadamente importante identificar rápidamente la cepa de la enfermedad que ha causado la contaminación.

Los autores proporcionan un método para amplificar el ácido nucleico, el método que comprende preparar un recipiente de reacción como se ha indicado anteriormente, y realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico en el recipiente de reacción. Una vez que el recipiente de reacción se ha preparado, y por tanto, que contiene la mezcla de reacción que contiene los reactivos para llevar a cabo la reacción de amplificación de ácido nucleico y contiene de esta forma el material que contiene ácido nucleico, la reacción de amplificación de ácido nucleico se lleva a cabo de la forma habitual, de acuerdo con el tipo de reacción. Por tanto, por ejemplo, la PCR se puede llevar a cabo en un equipo de termociclado adecuado.

Tal como se ha indicado anteriormente, sorprendentemente, se ha descubierto que es posible reutilizar el dispositivo de muestreo, o al menos la parte del mismo al que se ha adherido el material que contiene ácido nucleico, en una reacción de amplificación de ácido nucleico adicional, ya que suficiente material ha quedado retenido para al menos otra reacción de amplificación de ácido nucleico. Por tanto, los autores proporcionan un método para amplificar el ácido nucleico, comprendiendo el método llevar a cabo el método indicado anteriormente, retirando el dispositivo de muestreo (o la parte del mismo a la que se ha adherido el material que contiene ácido nucleico) e introducirlo en otro recipiente de reacción, y realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico en el recipiente de reacción adicional. En una realización del tercer aspecto de la invención, el dispositivo de muestreo se extrae y, si es necesario, se somete a lavado con una solución para eliminar los posibles restos de la primera mezcla de reacción antes de introducirlo en el recipiente de reacción adicional. Es posible que no sea necesario someter el dispositivo de muestreo a lavado si la sonda que detecta la nueva secuencia diana está marcada con un fluoróforo de color diferente, ya que el posible remanente de la primera reacción sería "invisible" en el análisis posterior.

65

En otra realización, la mezcla de reacción se extrae del recipiente de reacción después de una primera reacción de amplificación, el dispositivo de muestreo o parte del mismo se lava *in situ* en el recipiente de reacción, y a continuación se agrega una segunda mezcla de reacción al recipiente de reacción. En una realización adicional, el dispositivo de muestreo, o parte del mismo, puede contener material magnético, y la retención en el recipiente de reacción se puede lograr aplicando un campo magnético adecuado.

Normalmente, el recipiente de reacción adicional se prepara esencialmente como se ha descrito anteriormente. Aunque, sin embargo, en general, es posible que no sea necesario realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico adicional, la invención permite esto, y puede ser de uso particular cuando se lleva a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico corroborativa o independiente. Esto puede suceder algún tiempo después de realizar la primera reacción de amplificación de ácido nucleico.

Los autores proporcionan un método para amplificar ácido nucleico de un eucariota superior tal como una fuente de ácido nucleico de mamífero o planta, comprendiendo el método

(a) poner en contacto un dispositivo de muestreo con la fuente eucariota superior tal como ácido nucleico de mamífero o planta de tal forma que, tras dicho contacto, el material que contiene ácido nucleico de un eucariota superior tal como un mamífero o planta se adhiere a al menos una parte del dispositivo de muestreo, en el que el dispositivo de muestreo, o una parte del mismo al que se ha adherido el material que contiene ácido nucleico, está hecho de cualquiera de un material polimérico adecuado;

(b) introducir el dispositivo de muestreo o la parte del mismo a la que se ha adherido el material que contiene ácido nucleico en el interior de un recipiente de reacción que contiene una mezcla de reacción para realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico, sin ningún tratamiento previo del material que contiene ácido nucleico; y

(c) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico.

El material polimérico es uno al que se adhiere el material que contiene ácido nucleico después del contacto entre la fuente de ácido nucleico, por ejemplo, mediante frotación. El material polimérico es también uno que no impide ni interfiere sustancialmente con una reacción de amplificación de ácido nucleico cuando el material polimérico está presente en la mezcla de reacción. Que un polímero sea adecuado o no lo sea se puede determinar, por ejemplo, como se describe en los ejemplos. En particular, el protocolo descrito en el Ejemplo 2 se puede usar para determinar la idoneidad del polímero, o se puede utilizar el protocolo del Ejemplo 11, en donde el PMMA se ha sustituido por otro polímero, cuya idoneidad se está sometiendo a ensayo, y se utiliza la sonda D16.

Preferentemente, el material polimérico es cualquiera de vidrio, copolímero de olefina cíclica tal como Topas, un acrílico tal como PMMA, poliestireno cristalino, polipropileno, HDPE, policarbonato, poliestireno de medio impacto, PVC, polímero de cristal líquido 30 %, Trans ABS, copolímero de acetal, poliéster, polieterimida, polietileno, nailon, poliéter poliuretano, copolímero de bloques estireno-butadieno, copolímero aleatorio de polipropileno, etileno-acetato de vinilo siloxano tal como PDMS, y elastómero termoplástico, como Santoprene

Convenientemente, la fuente de ácido nucleico de un eucariota superior como un mamífero o planta está prácticamente seca como se ha descrito anteriormente. Convenientemente, el dispositivo de muestreo, o una parte del mismo al que se ha adherido el material que contiene ácido nucleico, permanece en el recipiente de reacción durante la etapa (c).

Los autores proporcionan un método para amplificar ácido nucleico de un eucariota superior tal como una fuente de ácido nucleico de mamífero o planta, comprendiendo el método

(a) poner en contacto un dispositivo de muestreo con la fuente eucariota superior tal como ácido nucleico de mamífero o planta de tal forma que, tras dicho contacto, el material que contiene ácido nucleico de un eucariota superior tal como un mamífero o planta se adhiere a al menos una parte del dispositivo de muestreo; en el que la fuente de ácido nucleico de un eucariota superior como un mamífero o planta está prácticamente seca;

(b) introducir el dispositivo de muestreo, o una parte del mismo al que se ha adherido el material que contiene ácido nucleico, en el interior de un recipiente de reacción que contiene una mezcla de reacción para llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico sin ningún tratamiento previo del material que contiene ácido nucleico; y

(c) realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico.

Convenientemente, el dispositivo de muestreo o la parte del mismo a la que se ha adherido el material que contiene ácido nucleico está hecho de cualquiera de vidrio, copolímero de olefina cíclica tal como Topas, un acrílico tal como PMMA, poliestireno cristalino, polipropileno, HDPE, policarbonato, poliestireno de medio impacto, PVC, polímero de cristal líquido 30 %, Trans ABS, copolímero de acetal, poliéster, polieterimida, polietileno, nailon, poliéter poliuretano,

copolímero de bloques estireno-butadieno, copolímero aleatorio de polipropileno, etileno-acetato de vinilo siloxano, tal como PDMS, y elastómero termoplástico tal como Santoprene.

5 Convenientemente, el dispositivo de muestreo, o una parte del mismo al que se ha adherido el material que contiene ácido nucleico, permanece en el recipiente de reacción durante la etapa (c).

Normalmente, la mezcla de reacción anterior está sustancialmente exenta de agentes caótopos y/o está sustancialmente exenta de agentes de lisis celular (véase la discusión anterior).

10 Los inventores proporcionan un método para preparar un soporte de datos que registra el genotipo asociado con el ácido nucleico procedente de un material que contiene ácido nucleico, comprendiendo el método llevar a cabo el método del segundo, cuarto y quinto aspectos de la invención, determinar el genotipo del ácido nucleico en el material que contiene ácido nucleico y registrar el genotipo en el soporte de datos. El genotipo puede estar relacionado con un SNP (polimorfismo de nucleótido único) o puede estar relacionado con una STR (repetición corta en tándem). El genotipo puede ser una "huella dactilar de ADN". El soporte de datos puede ser cualquier soporte de datos, pero normalmente será un soporte de datos electrónico tal como un disco de ordenador o una memoria flash. Se apreciará que el soporte de datos, y los datos contenidos en el mismo, se pueden utilizar para comparar el genotipo del ácido nucleico de la muestra analizada, con el genotipo de otras muestras, o con un genotipo guardado en una base de datos. Esto es especialmente útil en la detección de delitos y para las realizaciones relativas al cumplimiento legislativo de la invención.

25 Los inventores proporcionan el uso de un dispositivo de muestreo de ácido nucleico para obtener ácido nucleico de un eucariota superior, tal como un ácido nucleico de mamífero o planta, y a continuación introducir la fuente de ácido nucleico de un eucariota superior como un mamífero o planta en un recipiente de reacción que contiene una mezcla para realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico sin tratamiento previo, en el que la fuente de ácido nucleico de un eucariota superior como un mamífero o planta está prácticamente seca. Preferentemente, el ácido nucleico es adherente sobre el dispositivo de muestreo o parte del mismo, siendo el dispositivo de muestreo o la parte del mismo a la que se ha adherido el material que contiene ácido nucleico de cualquiera de vidrio, copolímero de olefina cíclica tal como Topas, un acrílico tal como PMMA, poliestireno cristalino, polipropileno, HDPE, 30 policarbonato, poliestireno de medio impacto, PVC, polímero de cristal líquido 30 %, Trans ABS, copolímero de acetal, poliéster, polieterimida, polietileno, nailon, poliéter poliuretano, copolímero de bloques estireno-butadieno, copolímero aleatorio de polipropileno, etileno-acetato de vinilo, siloxano tal como PDMS, y elastómero termoplástico tal como Santoprene. Convenientemente, el dispositivo de muestreo de ácido nucleico o la parte del mismo al que se adhiere el material que contiene ácido nucleico permanece en el recipiente de reacción durante la reacción de 35 amplificación de ácido nucleico.

Los inventores proporcionan un kit que comprende (a) un recipiente de reacción que contiene una mezcla de reacción para llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico, dicho recipiente de reacción está precintado y (b) un dispositivo de muestreo, a una parte del cual se puede adherir el material que contiene ácido nucleico tras el contacto con dicho material, en el que el dispositivo de muestreo, o una parte del mismo al que se ha adherido el material que contiene ácido nucleico, se puede introducir en el recipiente de reacción y se puede llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico en el recipiente, en presencia del dispositivo de muestreo, o una parte del mismo al que se ha adherido el material que contiene ácido nucleico. El recipiente de reacción, mezcla de reacción, dispositivo de muestreo, material que contiene ácido nucleico y demás pueden ser cualquiera de los 45 descritos con respecto a los aspectos anteriores. Las preferencias de estas características son las mismas en este aspecto.

Normalmente, el kit contiene una pluralidad de recipientes de reacción que están reunidos como se ha descrito anteriormente en el contexto del primer aspecto. Normalmente, el dispositivo de muestreo, o una parte del mismo al que se puede adherir el material que contiene ácido nucleico, está configurado para permitir que el material que contiene ácido nucleico se distribuya entre una pluralidad de recipientes de reacción como se ha detallado anteriormente en el contexto del primer aspecto.

Convenientemente, en algunas realizaciones, el dispositivo de muestreo, o una parte del mismo al que se puede adherir el material que contiene ácido nucleico, proporciona un precinto del recipiente de reacción una vez que el precinto original se ha eliminado. Preferentemente, el dispositivo de muestreo, o una parte del mismo al que se puede adherir el material que contiene ácido nucleico, está hecho de cualquiera de vidrio, copolímero de olefina cíclica tal como Topas, un acrílico tal como PMMA, poliestireno cristalino, polipropileno, HDPE, policarbonato, poliestireno de medio impacto, PVC, polímero de cristal líquido 30 %, Trans ABS, copolímero de acetal, poliéster, polieterimida, polietileno, nailon, poliéter poliuretano, copolímero de bloques estireno-butadieno, copolímero aleatorio de polipropileno, etileno-acetato de vinilo siloxano, tal como PDMS, y elastómero termoplástico, tal como Santoprene. Convenientemente, la mezcla de reacción presente en el recipiente de reacción es cualquier mezcla de 60 reacción como se ha descrito anteriormente con respecto a los anteriores aspectos de la invención.

De acuerdo con la invención, se proporciona un equipo de muestreo de ácido nucleico que comprende al menos una sonda para soportar una muestra de ácido nucleico; y un manipulador que se puede acoplar a la sonda para permitir la manipulación de la sonda, siendo la sonda separable del manipulador, como se define en la reivindicación 1.

5 Opcionalmente, el equipo incluye un receptáculo, que incluye una abertura que se puede precintar, para contener uno o más reactivos y una muestra de ácido nucleico, de forma que la operación del manipulador ocasiona o permite la inserción de la sonda a través de la abertura para ubicar la sonda en el receptáculo; e incluyendo la sonda un cierre que, tras la ubicación de la muestra en el receptáculo, cierra el receptáculo de nuevo contra la salida o entrada del material que contiene ácido nucleico.

10 Otros aspectos opcionales del equipo de la invención se definen en las reivindicaciones adjuntas. En particular, en una disposición opcional comprendida en el alcance de la invención, el equipo incluye un receptáculo que incluye una abertura que se puede precintar, para contener uno o más reactivos y una muestra de ácido nucleico, de forma que la operación del manipulador ocasiona o permite la inserción de la sonda a través de la abertura para ubicar la sonda en el receptáculo.

15 La invención se describirá más detalladamente con referencia a los siguientes ejemplos, realizaciones y figuras no limitantes. En las figuras:

20 La Figura 1 muestra las alturas de los picos obtenidos con el análisis mediante SGMPlus (Applied Biosystems) de una gama de "lechos" de plástico utilizados para transferir células de la boca y ADN de frotis bucales. Los lechos de plástico, analizados por triplicado, fueron 1) Topas, 2) Acrílico, 3) Poliestireno cristalino, 4) Polipropileno, 5) HDPE, 6) Policarbonato, 7) Poliestireno de medio impacto, 8) PVC, 9) Bloque de polietileno-polietilenglicol, 10) Poli(etileno-co-ácido acrílico), 11) Poli(alcohol vinílico-co-etileno), 12) Poli(etileno-co-vinilo-acetato) con injerto de ácido maleico, 13) Polímero de cristal líquido al 30 %, 14) Trans ABS, 15) Copolímero de olefina cíclica, Topas 16) Copolímero de acetal, 17) Poliéster, 18) Polietirimida, 19) Polietileno, 20) Nailon, 21) Poliéter poliuretano, 22) Copolímero de bloques estireno-butadieno, 23) Copolímero aleatorio de polipropileno y 24) Etileno-acetato de vinilo.

30 La Figura 2 muestra el número de picos generados mediante el análisis con SGMPlus (Applied Biosystems) de una gama de "lechos" de plástico utilizados para transferir células de la boca y ADN de frotis bucales. Los lechos de plástico, analizados por triplicado, fueron 1) Topas, 2) Acrílico, 3) Poliestireno cristalino, 4) Polipropileno, 5) HDPE, 6) Policarbonato, 7) Poliestireno de medio impacto, 8) PVC, 9) Bloque de polietileno-polietilenglicol, 10) Poli(etileno-co-ácido acrílico), 11) Poli(alcohol vinílico-co-etileno), 12) Poli(etileno-co-vinilo-acetato) con injerto de ácido maleico, 13) Polímero de cristal líquido al 30 %, 14) Trans ABS, 15) Copolímero de olefina cíclica, 16) Copolímero de acetal, 17) Poliéster, 18) Polietirimida, 19) Polietileno, 20) Nailon, 21) Poliéter poliuretano, 22) Copolímero de bloques estireno-butadieno, 23) Copolímero aleatorio de polipropileno y 24) Etileno-acetato de vinilo. Si todas las dianas se amplificaran correctamente, se generarían 21 productos de ADN.

40 La Figura 3 ilustra los datos de picos de fusión generados en el ensayo con D16S539 HyBeacon, A) Resultados de PMMA usando un método de frotado para muestrear sangre en tejido y saliva en vidrio por contacto. A) Resultados de PDMS usando un método de frotado para muestrear sangre en tejido, sangre en vidrio, saliva en tejido y saliva en vidrio. C) Resultados de Santoprene (8281-75MED) de nuevo usando una acción de frotación para muestrear sangre en tejido, sangre en vidrio, saliva en tejido y saliva en vidrio.

45 La Figura 4 muestra picos de fusión obtenidos en el ensayo con D16S539 HyBeacon, A) Resultados de PMMA en presencia de ADN extraído. A) Resultados de PDMS en presencia de ADN extraído. C) Resultados de Santoprene (8281-75MED) en presencia de ADN extraído. Los controles de ADN extraído se han representado con una traza más oscura.

50 La Figura 5 muestra picos de fusión obtenidos en el ensayo con D16S539, A) Resultados de PMMA en presencia de un frotis bucal expresado. B) Resultados de PDMS en presencia de un frotis bucal expresado. C) Resultados de Santoprene (8281-75MED) en presencia de un frotis bucal expresado. Los controles de frotis bucal expresado se han representado con una traza más oscura.

55 La Figura 6 muestra i) Picos de fusión obtenidos en el ensayo con D16S539. A) Resultados de PMMA usando un método de frotado para muestrear saliva en vidrio. B) Resultados de PDMS usados para muestrear saliva en vidrio. C) Resultados de Santoprene (8281-75MED) usados para muestrear saliva en vidrio.

60 La Figura 7 muestra picos de fusión obtenidos en el ensayo con D18S51 HyBeacon. Las superficies de muestreo se extrajeron del ensayo D16S539, se lavaron cuidadosamente, se introdujeron en las reacciones D18S51 y se amplificaron. A) Resultados de PMMA usando un método de frotado para muestrear saliva en vidrio. B) Resultados de PDMS usados para muestrear saliva en vidrio. C) Resultados de Santoprene (8281-75MED) frotado sobre saliva sobre vidrio.

65

La Figura 8 muestra A) Curvas de amplificación y B) picos de fusión obtenidos en un ensayo de amplificación isoterma mediada por bucle (LAMP) para analizar una sección del gen SLC6A4. Las muestras se obtuvieron frotando PDMS sobre una macha de saliva seca en vidrio.

5 La Figura 9 muestra la comparación de PDMS al que se le ha eliminado el siloxano no unido mediante una extracción Soxhlet con etanol.

10 Las Figuras 10a - 10d vistas laterales en elevación (Figuras 10a y 10d), planta (Figura 10b) y perspectiva (Figura 10c) de piezas de una primera realización de un equipo de muestreo de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

Las Figuras 11 a 16 muestran una vista en perspectiva de las piezas de otra realización de un equipo de acuerdo con la invención.

15 La Figura 17 muestra en una vista en perspectiva, una variante de la disposición de las Figuras 11 a 16.

Las Figuras 18 a 20 muestran una vista lateral en elevación y una vista en sección transversal de una realización adicional de la invención en la que las sondas de muestreo individuales se pueden extraer de un manipulador.

20 Las Figuras 21 a 24 ilustran otra disposición, en la que un conjunto de leva mecánica se puede usar para provocar la diseminación de las piezas de la punta inicialmente contiguas antes de que se extraigan del manipulador.

25 La Figura 25 muestra que se puede utilizar vidrio para obtener material que contiene ácido nucleico de una muestra y que no interfiere con una reacción de amplificación.

30 La Figura 26 muestra que la irradiación con UC para "esterilizar el ADN" de un polímero no tiene ningún efecto sobre la capacidad para obtener el material que contiene ácido nucleico tras el contacto con una muestra y para que tenga lugar la amplificación.

La Figura 27 es una comparación de PMMA con PMMA tratado con KOH en la reacción con D16. Los gráficos de línea muestran el promedio de picos de fusión tomados de 8 réplicas de análisis.

35 En esta memoria descriptiva, algunos términos se utilizan de forma indistinta para indicar la amplia aplicabilidad de los principios de la invención. La siguiente tabla de concordancias resume los términos que tienen significados equivalentes:

Término 1	Término 2 (equivalente)
Recipiente de reacción	Receptáculo
Material que contiene ácido	Muestra de ácido nucleico
Dispositivo de muestreo	Equipo de muestreo

40 Además, los términos "*precinto*" y "*elemento de precintado*" se utilizan indistintamente de una forma general en el presente documento, según permita el contexto.

Ejemplo 1: Materiales y métodos que pertenecen al resto de Ejemplos

Producción de perlas

45 Se obtuvieron gránulos de plástico de proveedores de plástico (Sovereign; Slough, Matrix Plastics; Slough, EuroPlaz; Southminster) para los siguientes plásticos: 1) Topas, 2) Acrílico, 3) Poliestireno cristalino, 4) Polipropileno, 5) HDPE, 6) Policarbonato, 7) Poliestireno de medio impacto, 8) PVC, 9) Bloque de polietileno-polietilenglicol, 10) Poli(etileno-co-ácido acrílico), 11) Poli(alcohol vinílico-co-etileno) y 12) Poli(etileno-co-vinilo-acetato) con injerto de ácido maleico, 13) Polímero de cristal líquido al 30 %, 14) Trans ABS, 15) Copolímero de olefina cíclica, 16) Copolímero de acetal, 17) Poliéster, 18) Polieterimida, 19) Polietileno, 20) Nailon, 21) Poliéter poliuretano, 22) Copolímero de bloques estireno-butadieno, 23) Copolímero aleatorio de polipropileno y 24) Etileno-acetato de vinilo. Estos se utilizaron sin modificar y, en experimentos posteriores, se cortaron con un escalpelo para producir fragmentos de plástico de tamaño similar que medían aproximadamente 1,5 mm³. Todos los plásticos se irradiaron con radiación UV a 257 nm para eliminar cualquier posible contaminación de ADN. En la Tabla 1 se proporciona una descripción somera de los plásticos.

Tabla 1. Resumen de las propiedades de los plásticos utilizados.

Plástico	Color	Dureza	Tamaño aproximado	Forma
Topas	Transparente	Muy duro	H =3 mm, r=1 mm	Cilindrico
Acrílico	Transparente	Muy duro	H =3 mm, r=2 mm	Cilindrico
Poliestireno cristalino	Transparente	Muy duro	H =3 mm, r=1 mm	Cilindrico
Polipropileno	Negro opaco	Duro	H =3 mm, r=1 mm	Cilindrico
HDPE	Blanco opaco	Muy duro	H= 2 mm, r=1,5 mm	Disco convexo
Policarbonato	Transparente	Muy duro	H =3 mm, r=1 mm	Cilindrico
Poliestireno de medio impacto	Blanco opaco	Muy duro	H =3 mm, r=1 mm	Cilindrico
PVC	Transparente	Dureza media a blanda, casi flexible.	H= 2 mm, r=1,5 mm	Disco convexo
Bloque de polietileno-polietilenglicol	Blanco semiopaco	Material cerúleo muy blando. (Disuelto en la mezcla de reacción)	Aproximadamente, trozo usado de aproximadamente 1,5	Forma irregular
Poli(etileno-co-ácido acrílico)	Transparente	Muy duro	H=2,5 mm, r= 1,6 mm	Ovoide
Poli(alcohol vinílico-co-etileno)	Transparente	Muy duro	H =3 mm, r=1 mm	Cilindrico
Poli(alcohol vinílico-co-etileno)	Transparente	Muy duro	H =3 mm, r=1 mm	Cilindrico
Polímero de cristal líquido 30 %	Crema opaco	Muy duro	H =4 mm, r=1 mm	Cilindrico
Trans ABS	Transparente	Muy duro	H =3 mm, r=1 mm	Cilindrico
Copolímero de olefina cíclica	Transparente	Muy duro	H =3 mm, r=1 mm	Cilindrico
Acetal Hostraform	Blanco opaco	Muy duro	H =2 mm, r=2 mm	Disco convexo
Poliéster	Blanco opaco	Muy duro	H =3 mm, r=1 mm	Cilindrico
Polieterimida	Amarillo	Muy duro	H =3 mm, r=1 mm	Cilindrico
Polietileno	Transparente	Muy duro	H =3 mm, r=1 mm	Cilindrico
Nailon	Blanco opaco	Muy duro	H =3 mm, r=1 mm	Cilindrico
Poliéter poliuretano	Transparente	Casi elastomérico	H =3 mm, r=1,5 mm	Cilindrico
Copolímero en bloque de estireno butadieno	Transparente	Muy duro	r=4 mm	Esférico
Copolímero de propileno aleatorio	Semitransparente	Muy duro	r=4 mm	Esférico
Etileno acetato de vinilo	Transparente	Dureza media	r=4 mm	Esférico Disco convexo

Métodos de muestreo

5

Se utilizaron diferentes métodos para evaluar la idoneidad de los diferentes plásticos para el análisis de muestras no purificadas:

10

1) Método de vortización; se tomó un rascado bucal reciente con un frotis Omni (Whatman Ltd). Las muestras de plástico tratado con UV se introdujeron en un tubo estéril de 6 ml bijou con la muestra del frotis, y se mezcló a alta velocidad durante 10 s con un vortizador para poner en contacto la muestra de plástico con el material que contiene ácido nucleico. A continuación, el plástico se transfirió a un recipiente de reacción usando pinzas estériles de punta fina.

- 2) Método de frotado; Las muestras de plástico tratado con UV se sujetaron entre las puntas limpias de unas pinzas de punta fina. Esto se usó para frotar una de las superficies del plástico contra una muestra (por ejemplo, una mancha de sangre seca sobre tela/plástico, una mancha de saliva sobre tela/plástico, etc.) para poner en contacto el plástico con el material que contiene ácido nucleico. A continuación, la superficie de plástico de muestreo se transfirió a un recipiente de reacción con la superficie frotada mirando hacia abajo en el interior de la mezcla de reacción. La superficie de plástico se dejó *in situ* en ambos métodos.

AmpfCSTR© SGMplus™ *sumario*

- 10 La amplificación e interrogación de las dianas de STR se llevó a cabo con un kit AmpfCSTR© SGMplus™ (Applied Biosystems). El kit AmpfCSTR© SGMplus™ contiene diez STR (D16S539, D18S51, D19S433, D2S1338, D21S11, D3S1358, D8S1179, FGA, TH01 y vWA) y la prueba de sexo Amelogenin. El kit AmpfCSTR© SGMplus™ se utilizó según se describe en el manual del usuario del kit pero usando la mitad del volumen de reacción. La mezcla de medio volumen de reacción utiliza la siguiente configuración de reacción por muestra; 10,5 µl de mezcla de reacción
- 15 AmpfCSTR PCR, 5,5 µl del conjunto de cebadores AmpfCSTR SGM, D.5 µl. Se añadieron 15 µl de mezcla de reacción y 10 µl de agua a cada muestra, para un volumen total de la mezcla de reacción de 25 µl.

- 20 La amplificación y la interrogación de las secuencias diana se llevó a cabo usando un instrumento Applied Biosystems 9700 (Applied Biosystems). Tras una desnaturalización inicial para activar la enzima hotstart (95 °C, 11 minutos), las dianas se amplificaron usando 28 ciclos que comprendían desnaturalización (95 °C 1 minuto), hibridación de cebadores (59 °C 1 minuto) y extensión de los productos (72 °C 1 minuto). Tras la amplificación, se realizó la adenilación de los productos (60 °C 45 minutos). Posteriormente, las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta que se necesitaron en otro proceso.

- 25 La amplificación y la interrogación de las secuencias diana se llevó a cabo usando un instrumento Applied Biosystems 3100 (Applied Biosystems). Para el análisis, 1 µl del producto amplificado se añadió a 8,9 µl de Hi-Di Formamide (Applied Biosystems) y 0,1 µl de ml Genescan 500 ROX de tamaño convencional. Las muestras se inyectaron en una matriz capilar de 36 cm a 3 kV durante 10 segundos. Las muestras se analizaron con Genemapper ID.

30 *Análisis STR con sondas HyBeacon*

- La amplificación e interrogación de las dianas STR se llevó a cabo según el método publicado por French *et al* 2008 (Ref 1), utilizando sondas de oligonucleótidos fluorescentes, oligonucleótidos de bloqueo no fluorescentes, y análisis de la curva de fusión.

- 40 Los volúmenes de la PCR fueron 20 µl que comprendían 1x tampón SpeedSTAR I (TaKaRa) o 1 unidad de tampón Phire (Finnzymes), 1 unidad de polimerasa SpeedSTAR (TaKaRa) o 1 unidad de polimerasa Phire (Finnzymes), BSA al 3 % (Roche), Tween-20 al 0,5 % (Sigma) y dNTP 1 mM (0,25 mM cada - GE Healthcare, Amersham, Reino Unido). Dependiendo del ensayo realizado (es decir, D16S539 o D18S51), se usó 1 mM de cebador directo, 0,1 mM de cebador inverso y 75 nm de sonda para el ensayo adecuado. Los ensayos D16S539 y D18S51 también contenían 1 µM y 375 nm de bloqueador no fluorescente, respectivamente. Se utilizó PCR asimétrica para generar un exceso de la hebra diana, de tal forma que la hibridación de la sonda se viera favorecida con respecto a la hibridación de las secuencias amplificadas (véase el documento WO 2007/010268 A2).

- 45 La amplificación e interrogación de secuencias diana se llevó a cabo con los instrumentos Rotor-Gene 6000 (Corbett Research) y CFX96 (Bio-Rad). Tras una desnaturalización inicial para activar la enzima hotstart (95 °C, 1 minuto), las dianas se amplificaron usando 50 ciclos que comprendían desnaturalización (95 °C 1 minuto), hibridación de cebadores (64 °C 4 segundos) y extensión de los productos (72 °C 4 segundos). Tras la amplificación, las reacciones se desnaturalizaron (95 °C 1 minuto) y enfriaron (20 °C 2 minutos) antes del análisis de la curva de fusión.

- 50 El análisis de la curva de fusión se realizó mediante calentamiento de fracciones de 20 °C a 70 °C, adquisición de fluorescencia en incrementos de 0,5 °C con tiempos de espera de 5 segundos a cada temperatura. Los picos de fusión se construyeron representando gráficamente la derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura (-dF/dT en el eje y) frente a la temperatura (eje x).

Análisis del gen SLC6A4 y lista de oligonucleótidos empleados

- 60 La amplificación y detección de las dianas génicas polimórficas SLC6A4 se llevó a cabo con el método de amplificación isotérmica mediada con bucle (LAMP) descrita por Masaoimi Iwasaki, Toshihiro Yonekawa, *et al* (2003)². Se usó el colorante fluorescente intercalante EvaGreen para detectar la amplificación de la diana en tiempo real y mediante el análisis de la curva de fusión.

- 65 Los volúmenes de la PCR fueron 25 µl, que comprende 1x Isothermal Mastermix (Genesys), 0,8 µM de cebadores internos, 0,2 µM de cebadores externos, 0,2 µM de cebadores de bucle.

La amplificación e interrogación de secuencias diana se llevó a cabo con un instrumento CFX96 (Bio-Rad). Las dianas se amplificaron por incubación de las muestras a 59 °C durante 30 minutos usando un instrumento CFX96 (Bio-Rad), que adquiere la fluorescencia cada 30 segundos. Tras la amplificación, las reacciones se desnaturalizaron (95 °C 3 minutos) antes del análisis de la curva de fusión.

El análisis de la curva de fusión se realizó mediante calentamiento de fracciones de 40 °C a 90 °C, adquisición de fluorescencia en el canal FAM en incrementos de 0,5 °C con tiempos de espera de 5 segundos a cada temperatura. Los picos de fusión se construyeron representando gráficamente la derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura (-dF/dT en el eje y) frente a la temperatura (eje x).

Generación de superficies de PDMS extraídas con Soxhlet y referencia al método

Las superficies de PDMS se limpiaron del siloxano no unido con etanol dentro de un equipo de extracción Soxhlet. El método usado estuvo basado aproximadamente en el descrito por *Thibault et al (2007)*³.

Para someter a ensayo el efecto del siloxano sin unir, aproximadamente 20 superficies de PDMS se introdujeron en un cartucho poroso dentro de un dispositivo Soxhlet de 100 ml. El dispositivo Soxhlet se introdujo en un matraz de 250 ml con 180 ml de etanol absoluto. El dispositivo Soxhlet se configuró para un reflujo aproximadamente 8 veces cada hora para un periodo de 12 horas. No se realizó ninguna pesada de materiales y reactivos, ya que el siloxano extraído no es interesante para el resto del experimento. Las superficies exentas de siloxano no unido se usaron como se ha descrito anteriormente.

Generación de superficies modificadas con KOH

Las superficies de PMMA se trataron con KOH mediante agitación de la superficie en KOH (hidróxido de potasio) 1 M durante 24 horas a 85 °C. Para analizar si se había producido modificación, las superficies se agitaron (las modificadas y las nativas) en verde malaquita al 0,1 % en agua. Tras incubar durante 10 minutos, el sobrenadante se retiró, y las perlas se lavaron intensamente con agua. Debido a los grupos carboxilo en la superficie de las perlas modificadas, los colorantes cargados positivamente se capturaron, mientras que las perlas nativas no capturaron nada de colorante. Las perlas modificadas correctamente se mostraban de color verde.

Ejemplo 2: Evaluación de materiales de plástico para la generación de dispositivos para frotis

Perlas de plástico de diferentes plásticos (tal como se indica en la figura 1) y tamaños se sometieron a vortización un corto plazo con frotis bucales (Omniswabs, Whatman) y a continuación se introdujeron en un kit comercial de la PCR diseñado para detectar 10 tipos de repeticiones cortas en tándem diferentes junto con una prueba de sexo de amelogenin (AmpfCSTR® SGMplus™; Applied Biosystems). La reacción utilizó las condiciones de ciclación recomendadas por el fabricante, en la mitad del volumen de reacción de 25 µl. Los productos de la PCR generados se separaron mediante electroforesis capilar usando un instrumento Applied Biosystems 3100. La Figura 1 demuestra que determinados plásticos (Topas, acrílico, poliestireno cristalino, polipropileno, HDPE, policarbonato, poliestireno de medio impacto, PVC, polímero de cristal líquido 30 %, Trans ABS, copolímero de olefina cíclica, copolímero de acetal, poliéster, polieterimida, polietileno, nailon, poliéter poliuretano, copolímero de bloques estireno-butadieno, copolímero aleatorio de polipropileno y etileno-acetato de vinilo) habían recogido, transferido y permitido correctamente que las células procedentes de los frotis bucales estuvieran disponibles para el análisis de ADN. En las aplicaciones convencionales de esta tecnología, una altura de pico superior a 25 urf se considera que refleja un producto de la PCR real por encima del fondo (Custodian Document; CUSTP-GS-003). Puede observarse que el contacto con una serie de plásticos permite niveles de detección significativos. La observación en este estudio de que algunos plásticos no funcionan (por ejemplo, bloque de polietileno-polietilenglicol, poli(etileno-co-ácido acrílico), poli(alcohol vinílico-co-etileno), poli(etileno-co-vinilo-acetato) con injerto de ácido maleico indica que los resultados positivos observados no eran debido a un artefacto de desgarro mecánico de las células desde el frotis hasta el plástico. Los datos proceden de tres muestras independientes obtenidas de un individuo. Todos los productos amplificados a partir de los materiales de plástico eran específicos de los donantes del frotis. Los fragmentos de ADN de hasta 350 pares de base y más se detectaron correctamente (determinado por el tipo de STR del donante), lo que sugiere que los materiales plásticos no inhiben la PCR cuando se dejan en el tubo de reacción.

La Figura 1 demuestra que una gama de materiales plásticos es adecuada para la adsorción de materiales biológicos y que varía eficazmente dependiendo del tipo de material.

Ejemplo 3: Evaluación de materiales de plástico para la generación de dispositivos para frotis

Condiciones experimentales análogas al Ejemplo 2. Este estudio examina si las reacciones de la PCR para 10 repeticiones cortas en tándem diferentes más el locus amelogenin se detectaron en una reacción multiplexada. Si todas las dianas se amplificaran correctamente, se generarían 21 productos de ADN. La Figura 2 demuestra que una gama de materiales plásticos es adecuada para la adsorción de materiales biológicos y que varía eficazmente dependiendo del tipo de material. Los más eficaces fueron Topas, acrílico, poliestireno cristalino, polipropileno, HDPE, policarbonato, poliestireno de medio impacto, PVC, polímero de cristal líquido 30 %, Trans ABS, copolímero

de olefina cíclica, copolímero de acetal, poliéster, polieterimida, polietileno, nailon, poliéter poliuretano, copolímero de bloques estireno-butadieno, copolímero aleatorio de polipropileno y etileno-acetato de vinilo. Los que se comportaron peor fueron el bloque de polietileno-poli(etilenglicol), el poli(etileno-co-ácido acrílico), el poli(alcohol vinílico-co-etileno) y el poli(etileno-co-vinilo-acetato) con injerto de ácido maleico.

5 **Ejemplo 4: Evaluación de plástico, siliconas, elastómeros termoplásticos (TPE) y vidrio como materiales para uso en un ensayo HyBeacon.**

10 Las superficies de PMMA (plástico acrílico), PDMS (silicona) y Santoprene (un TPE) de tamaño uniforme se frotaron sobre vidrio y tela manchados de sangre y saliva con unas pinzas limpias estériles. Como se ha descrito en la segunda parte de los datos de muestreo, las muestras se introdujeron posteriormente en reacciones de la PCR que contenían una amplificación PCR singlete para el loci de repeticiones cortas en tándem denominado D16S539 (D16S539). El ensayo (equivalente al descrito en French *et al* (2008)¹) es una reacción homogénea que contiene no solamente los cebadores de la PCR para dichos loci, también una sonda de oligonucleótido fluorescente distintiva (sonda D16S539 marcada con fluoresceína dT) y un oligonucleótido "bloqueante" competidor, que se ha descrito en detalle anteriormente. Tras la amplificación mediante PCR, la reacción se procesó a continuación a través de un intervalo de temperatura, conocido normalmente como 'curva de fusión' (véase la escala del eje x de la figura) y la velocidad de cambio de la fluorescencia se representa gráficamente para demostrar la disociación de la sonda unida de su diana. El resultado indica que las superficies de plástico, silicona y TPE proporcionan suficiente contacto celular para permitir que las muestras se introduzcan directamente en la reacción, no solamente para respaldar la amplificación mediante PCR correcta, pero también sin interferir con la posterior hibridación y análisis de fluorescencia. Solamente se esperaba que el análisis en el canal de fluorescencia D16S539 FAM mostrara una repetición D16S539 STR 'tipo' 11, tal como se observó.

25 Este experimento utiliza diferentes cebadores de la PCR y condiciones de ciclación de temperatura a las descritas en las Figuras 1 y 2, e incluyeron sondas y oligonucleótidos bloqueadores no presentes en dichos experimentos, demostrando de esta forma que la unión del ADN a las superficies de contacto de plásticos, siliconas y TPE no son específicas de la reacción de PCR, no inhiben la detección de fluorescencia ni los procedimientos de hibridación complejos que tienen lugar (por referencia a las muestras que solamente contenían ADN de control, como se indica), como se muestra en la Figura 3.

30 Perlas de vidrio de 1,5 mm se frotaron sobre hisopos bucales secos. Los resultados del ADN de control y de los frotis se muestran en la Figura 25. Los picos indicaron que 11 y 14 son los tipos de STR del ensayo de tipado D16S539.

35 **Ejemplo 5: Evaluación de plástico, silicona y elastómeros termoplásticos: efecto sobre la eficiencia de la amplificación.**

40 Superficies limpias de PMMA, PDMS y Santoprene se introdujeron en recipientes de reacción que contenían un ensayo D16S539 HyBeacon tal como se ha descrito en la sección de materiales y métodos anterior. 2 ng de ADN extraído se añadieron a cada reacción que contenía las superficies de muestreo. Se compararon con un ensayo D16S539 HyBeacon de control con un molde de 2 ng de ADN genómico extraído sin una superficie de muestreo presente. Solamente se esperaba que el análisis en el canal de fluorescencia D16S539 FAM mostrara una repetición STR 'tipo' 11, tal como se observó. No se observaron diferencias entre la reacción de control y la reacción mediada con PDMS y PMMA. Se produjo una reducción en la altura de pico observada con respecto al uso de Santoprene como medio de transferencia. Esto se puede deber a la opacidad del material, que bloquea la detección de fluorescencia. PMMA y PDMS no afectan a la eficacia del ensayo D16S539 HyBeacon, como se muestra en la Figura 4. Santoprene reduce la intensidad de la señal obtenida.

50 **Ejemplo 6: Evaluación de plástico, silicona y elastómeros termoplásticos: efecto sobre la eficiencia de la lisis celular en muestras biológicas no extraídas.**

55 Superficies limpias de PMMA, PDMS y Santoprene se introdujeron en recipientes de reacción que contenían un ensayo D16S539 HyBeacon tal como se ha descrito en la sección de materiales y métodos anterior. Los frotis bucales (Omniswabs, Whatman) se expresaron mediante vortización en 500 µl de agua como diluyente. 2 µl de los frotis expresados se compararon con 2 ng de ADN extraído sin una superficie de muestreo presente. Solamente se esperaba que el análisis en el canal de fluorescencia D16S539 FAM mostrara un 'tipo' 11, tal como se observó. Se observaron muy pocas diferencias entre la reacción de control y la reacción con PDMS y PMMA. Se produjo una reducción en la calidad de los productos generada usando la transferencia con Santoprene. Esto se puede deber a la opacidad del material. PMMA y PDMS no altera la amplificación del material celular no extraído en un ensayo D16S539 HyBeacon, como se muestra en la Figura 5. Santoprene reduce la intensidad de la señal obtenida. Esto se refuerza adicionalmente la idea asociada con superficies opacas.

65 **Ejemplo 7: Evaluación de la unión de material biológico al plástico, silicona y elastómero termoplástico para su uso en reacciones múltiples.**

Superficies limpias de PMMA, PDMS y Santoprene se frotaron sobre una mancha de saliva sobre un porta de vidrio limpio y no tocado anteriormente. Las muestras se analizaron con el ensayo D16S539 HyBeacon tal como se ha descrito en la sección de materiales y métodos anterior. Los resultados de estas se muestran en la Figura 6. Tras la amplificación, la mezcla de reactivos se extrajo del recipiente de reacción y se descartó, la superficie de la muestra se lavó suavemente a continuación por aspiración mediante pipeta con agua para cultivo de tejidos para eliminar todos los componentes residuales del ensayo D16S539 y los productos amplificados. Las superficies se dejaron secar, y a continuación se transfirieron a recipientes de reacción limpios. Las superficies limpias de las muestras se usaron a continuación como moldes del ensayo D18S51 HyBeacon, tal como se ha descrito en la sección de materiales y métodos anterior, para determinar si quedaba suficiente cantidad de material biológico sobre la superficie para facilitar el análisis de una segunda secuencia diana independiente. La diana D18S51 se encuentra en un cromosoma distinto a la diana D16S539, la sonda D18S51 no detectará las dianas D16S539 amplificadas, y los reactivos de D16S539 no amplificarán las dianas de D18S51. El ensayo D18S51 también utiliza una marca colorante diferente a la sonda D16S539, lo que garantiza que los dos ensayos son completamente independientes entre sí.

La Figura 7 muestra que las superficies transferidas tienen suficiente material biológico adsorbido sobre la superficie de muestreo para permitir la amplificación de la segunda secuencia diana. Solamente se esperaba que el análisis en el canal de fluorescencia D16S539 FAM mostrara un 'tipo' 11, tal como se observó, y solamente se esperaba que el análisis en el canal de fluorescencia D18S51 TAMRA mostrara un 'tipo' 19, tal como se observó. Los ensayos D16S539 y D18S51 proporcionaron Tms de picos de fusión con valores notablemente diferentes.

Ejemplo 8: Evaluación del efecto de la etapa inicial de desnaturalización a 95° de la amplificación sobre la promoción del material celular puesto a disposición para la amplificación

Una superficie de PDMS limpia se frotó sobre un porta de vidrio manchado con una muestra de saliva, tal como se ha descrito en la sección de materiales y métodos anterior. Las superficies de PDMS se analizaron por triplicado mediante un ensayo de amplificación isoterma mediada por bucle (LAMP, Eiken) diseñado para amplificar y detectar la secuencia diana SLC6A4. Este ensayo incubó los reactivos de amplificación a 59 °C durante 30 min de amplificación isoterma. El producto amplificado se detecta mediante un colorante intercalante. Las tres muestras de PDMS se compararon con una muestra extraída de ADN de control del mismo donante. Los picos de fusión de fluorescencia, mostrados en la Figura 8, indican una amplificación de la diana satisfactoria para las superficies de plástico.

Esto sugiere que la etapa de desnaturalización a 95 °C no es esencial para la amplificación del material celular unido a las superficies de PDMS.

Ejemplo 9: Evaluación del efecto de siloxano no unido del PDMS sobre la unión del material celular.

El artículo de Thibault *et al* (2007)³ menciona los siloxanos de cadena corta y el siloxano no polimerizado como posible mecanismo por el que el ADN se une a PDMS. Superficies limpias de PDMS se introdujeron en un dispositivo Soxhlet y se sometieron a reflujo con etanol durante un periodo de doce horas a una tasa de aproximadamente 8 lavados por hora. Las superficies de PDMS extraídas con el Soxhlet se sujetaron con pinzas estériles exentas de ADN y se frotaron a través de una mancha de saliva seca en un portaobjetos de vidrio no tocado previamente. Esto se llevó a cabo además de las muestras que se frotaron sobre una mancha de sangre en un portaobjetos de vidrio no tocado previamente. Se compararon con las superficies de PDMS originales. Todas las muestras se transfirieron a un microtubo de PCR y se amplificaron con un ensayo D16S539 HyBeacon. Todos los métodos son tal como se ha descrito en la sección de materiales y métodos anterior. Se esperaba que la muestra del donante produjera un alelo 11, como se muestra en la Figura 9. No se observó una diferencia apreciable en los resultados obtenidos entre las superficies de PDMS originales y no originales. Esto muestra que los siloxanos no unidos no son el único mecanismo por el cual el material biológico se adsorbe sobre la superficie de PDMS.

Ejemplo 10: Resumen de experimentos satisfactorios adicionales no incluidos en la ejemplificación anterior.

La Tabla 2 detalla otros experimentos realizados que no están cubiertos por las figuras anteriormente mostrados.

Material	Ensayo utilizado en el análisis	Matriz ensayada	Método de muestreo	Resultado
Acrílico	D16S539/D18S51 Duplex Hybeacon	Frotis bucal	Vórtice	Amplificación y detección satisfactorias
Polipropileno	D16S539/D18S51 Duplex Hybeacon	Frotis bucal	Vórtice	Amplificación y detección satisfactorias
Acrílico	D16S539 Hybeacon	Sangre seca sobre tela/vidrio	Frotado	Amplificación y detección satisfactorias
Polipropileno	D16S539 Hybeacon	Sangre seca sobre tela/vidrio	Frotado	Amplificación y detección satisfactorias

Material	Ensayo utilizado en el análisis	Matriz ensayada	Método de muestreo	Resultado
Espuma de celdilla cerrada hidrófoba	D16S539 Hybeacon	Sangre/saliva seca sobre tela/vidrio	Frotado	Algo de amplificación y detección satisfactorias a partir de muestras de saliva
Cepillo de nailon	D16S539 Hybeacon	Sangre/saliva seca sobre tela/vidrio	Frotado	Amplificación y detección satisfactorias
Espuma de celdilla cerrada hidrófoba	SGMplus	Sangre/saliva seca sobre tela/vidrio	Frotado	Amplificación mala
Cepillo de nailon	SGMplus	Sangre/saliva seca sobre tela/vidrio	Frotado	Amplificación mala con sangre, amplificación satisfactoria con saliva.
PDMS	SGMplus	Sangre/saliva seca sobre tela/vidrio	Frotado	Amplificación satisfactoria
Santoprene (TPE)	SGMplus	Sangre/saliva seca sobre tela/vidrio	Frotado	Amplificación satisfactoria
PDMS	D16S539 Hybeacon	Semen seco sobre tela	Frotado	Amplificación satisfactoria
Santoprene (TPE)	D16S539 Hybeacon	Semen seco sobre tela	Frotado	Amplificación satisfactoria
PDMS	D16S539 Hybeacon	Huella dactilar sobre vidrio	Frotado	Amplificación satisfactoria/bajo nivel y dependiente del donante
Santoprene (TPE)	D16S539 Hybeacon	Huella dactilar sobre vidrio	Frotado	Algo de amplificación satisfactoria
Fragmento de borrador de lápiz (caucho)	D16S539 Hybeacon	Sangre/saliva sobre vidrio	Frotado	No se amplificó
Látex	D16S539 Hybeacon	Sangre/saliva sobre Vidrio	Frotado	No se amplificó

Ejemplo 11: Sin efecto de la irradiación UV para la esterilización del ADN durante el muestreo y la posterior amplificación

5 Perlas de PMMA (plástico acrílico) de 1,64 mm con diferentes tratamientos con UV se frotaron sobre manchas de saliva sobre vidrio con un soporte limpio estéril, tal como se ha descrito en la segunda parte del método de muestreo del Ejemplo 1. Las muestras se introdujeron posteriormente en reacciones de la PCR que contenían una amplificación PCR singlete para el locus STR denominado D16 (D16S539). El ensayo (equivalente al descrito en French et al (2008) (Referencia 1)) es una reacción homogénea que contiene no solamente los cebadores de la PCR para dichos loci, también diferentes sondas de oligonucleótido fluorescente (sonda D16 marcada con FAM) y oligonucleótidos "bloqueantes" competidores. Tras la PCR, la reacción se procesó a través de un intervalo de temperatura (véase la escala del eje x del Figura 26) y la velocidad de cambio de la fluorescencia se representó gráficamente para indicar la presencia de un sondeo correcto. Los resultados indican que el tratamiento de PMMA con UV afecta muy poco a la capacidad del material para recoger material biológico.

15 La Figura 26 muestra picos de fusión promedio procedentes de 4 réplicas de PMMA (Cont promedio) no irradiada con UV, PMMA irradiada con UV durante 30 minutos (Promedio 30 min) y PMMA irradiada con UV durante más de 24 horas (Promedio 24 h), y se obtuvieron 2,5 ng de ADN (Pos).

20 **Ejemplo 12 Efecto de la modificación con KOH de las superficies de PMMA**

Superficies de PMMA modificadas con KOH y no modificadas se frotaron sobre manchas de saliva sobre vidrio con un soporte limpio estéril. Posteriormente, las muestras se introdujeron en reacciones de la PCR basadas en Phire que contenían el locus STR, D16S539. El ensayo (equivalente al descrito en French et al (2008) es una reacción homogénea que contiene no solamente los cebadores de la PCR para este locus, también una sonda de oligonucleótido fluorescente distintiva (sonda D16 marcada con FAM), y oligonucleótidos "bloqueantes" competidores. Tras la PCR, la reacción se procesó a través de un intervalo de temperatura (véase la escala del eje x de la Figura 27) y la velocidad de cambio de la fluorescencia se representó gráficamente para indicar la presencia de

un sondeo correcto. Los resultados indican que el tratamiento de PMMA con KOH produce una ligera reducción en la altura de los picos obtenidos.

Equipo de la invención

5 En referencia a las Figuras 10a - 10d una primera realización de un equipo de muestreo 11, 12, 13 para ácido de acuerdo con la invención incluye como componentes principales una serie de receptáculos 11 de los que uno de ellos es visible en la Figura 10d, una pluralidad de elementos de sonda 12 que corresponden en número al número de receptáculos 11 y un manipulador en forma de un mango convertible 13. El equipo de muestreo 11, 12, 13 de las Figuras 10a - 10d, y el resto de equipos de muestreo descritos más adelante, son adecuados y están previstos para aplicar los métodos y usos descritos y definidos en el presente documento.

10 El equipo de las Figuras 10a - 10d incluye una serie de (mostrados en la realización preferida) cuatro receptáculos alargados verticales huecos 11, cada uno de ellos abierto en su extremo superior para definir la correspondiente abertura 14.

15 Las aberturas 14 de los receptáculos se pueden precintarse de acuerdo con las disposiciones que se describen a continuación. La pluralidad de receptáculos 11 es preferentemente idéntica entre sí, y preferentemente está soportada en una línea ilustrada en un bastidor (no mostrado). El bastidor que soporta los receptáculos 11 tiene preferentemente un tamaño que se puede llevar fácilmente con la mano, guardarse en un maletín y, por lo general, es de funcionamiento manual.

20 En otra disposición comprendida en el alcance de la invención, los receptáculos 11 pueden estar dispuestos en un cuadrado u otro diseño poligonal, en una línea que no esté recta o con un diseño circular u oval.

25 Los receptáculos 11 se pueden fabricar con, o al menos estar revestidos en su superficie interior con, un polímero conocido por ser inerte al ácido nucleico y a los reactivos utilizados en las reacciones de amplificación anteriormente mencionadas de tal forma que los receptáculos 11 no afectan a ningún ácido nucleico contenido en su interior ni a ninguna reacción de amplificación. El bastidor está fabricado de un material ligero tal como un polímero, aleación de metal ligero o un material natural que no reaccione con el material de los receptáculos 11.

30 El bastidor puede estar hecho, alternativamente, del mismo material que los receptáculos y puede haberse formado simultáneamente con los mismos.

35 En realizaciones preferidas de la invención, por tanto, los receptáculos 11 pueden estar sujetos, o estar formados íntegramente, con el bastidor de tal forma que el bastidor y los receptáculos se utilicen y se descarten conjuntamente. Dicha disposición puede ofrecer ventajas, en algunas circunstancias, en lo que respecta a etiquetados de conjuntos de muestras, trazabilidad de las muestras y generación de pruebas de la eliminación o destrucción de las muestras al finalizar las actividades de investigación.

40 En otras realizaciones adicionales de la invención, y como se ilustra en la Figura 10d, se puede prescindir del bastidor, y los receptáculos 11 se pueden utilizar de una forma "individual".

45 El equipo de las Figuras 10a - 10d como se indica incluye una pluralidad de elementos de sonda 12a -12d alargados unidos y soportados por un mango alargado 13.

La Figura 10a muestra la configuración de los elementos de sonda 12 y el mango 13 al principio del uso del equipo de muestreo de ácido nucleico.

50 El mango 13 incluye cuatro (en la realización mostrada, aunque son posibles otras cantidades, comprendidas en el alcance de la invención) piezas de mango en la forma de cuadrantes alargados 13a, 13b, 13c, 13d.

55 Cada uno de los cuadrantes 13a -13d está unido como mínimo al cuadrante vecino a lo largo de una interfase que se extiende generalmente paralela a la dirección de elongación de la combinación 12,13 del mango de la sonda 1. Las articulaciones están definidas mediante caras contiguas 15 definidas de los cuadrantes formadas con combinaciones de parejas de un pivote de detención 15a y un rebaje 15b que permiten asegurar entre sí de forma separable los cuadrantes 13a-13d. Como resultado, cuando están ensamblados entre sí, los cuadrantes definen un mango cilíndrico 13 que se puede separar en cuatro diferentes piezas del mango 13a-13d de sección transversal en forma de segmento circular.

60 En otra disposición comprendida en el alcance de la invención, los segmentos del mango se pueden conectar en lo que se denominan "chamelas vivas", es decir, chanelas del material de los cuadrantes que son lo suficientemente finas como para ser flexibles y, opcionalmente, separable.

Una cara de cada uno de los cuadrantes 13a - 13d está curvada de forma convexa. En cada caso, esta cara se encuentra en el exterior del grupo unido de cuadrantes de tal forma que, cuando se conectan entre sí, definen colectivamente el mango de sección circular 13.

- 5 Sobresaliendo del extremo inferior de cada cuadrante 13a - 13d durante el uso hay un elemento de sonda 12a, 12b, 12c, 12d en la forma de una varilla rígida alargada ahusada.

10 Las varillas se extienden de manera que convergen unas hacia otras cuando los cuadrantes 13a-13d están unidos entre sí, y cada una tiene la misma longitud. Los extremos libres de las varillas finalizan muy cerca unos de otros cuando los cuadrantes adoptan la configuración visible en las Figuras 10a y 10b. En esta configuración, los extremos libres de los elementos 12a, 12b, 12c, 12d constituyen una sonda compuesta 12.

15 Cuando el mango está configurado de esta forma, la sonda compuesta 12 definida por los extremos libres de las varillas 12a, 12b, 12c, 12d pueden ponerse simultáneamente en contacto con una fuente de ácido nucleico. Esto se puede conseguir mediante una sencilla sujeción y manipulación manual del mango 13 definido por los cuadrantes 13a-13d. Los extremos libres de los elementos de sonda 12a, 12b, 12c, 12d pueden incluir, por ejemplo, almohadillas u otras proyecciones colindantes entre sí para definir una punta compuesta en forma de una superficie de encaje esencialmente continua para tocar el ácido nucleico.

20 El contacto da como resultado el revestimiento de los extremos libres de una forma aproximadamente uniforme con el material de ácido nucleico. Para mejorar la adherencia del ácido nucleico a los extremos libres de los elementos de sonda 12a-12d, estos pueden estar fabricados, revestidos o llevar absorbido cualesquiera de los materiales descritos en el presente documento como adecuados para lograr este objetivo.

25 La combinación 12,13 del mango de la sonda 1 se suministra en la combinación mostrada en las Figuras 10a y 10b. El usuario sujeta el mango 13 y lo utiliza como manipulador para poner en contacto la punta de la sonda 12 definida por los extremos libres con o dentro del material que contiene ácido nucleico, sin ningún riesgo significativo de que el ADN del usuario entre en contacto con los elementos de sonda. Por motivos de elección del material de los extremos libres de los elementos 12a - 12d, y de acuerdo con los principios de la invención tal como se describe o se define en el presente documento, esto da como resultado cantidades aproximadamente iguales de material que contiene ácido nucleico adherido a cada uno de los extremos libres.

35 Los receptáculos 11 opcionalmente soportados en un bastidor como se ha descrito anteriormente pueden suministrarse incluyendo, precintando las aberturas 14 de los anteriores, tapones resilientes deformables, precintos de lámina desprendibles o precintos similares que se pueden retirar para permitir el acceso a los interiores de los receptáculos 11.

40 Los receptáculos 11 incluyen, retenido en su interior por los tapones u otro tipo de precinto, los reactivos necesarios para realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico tal como pero no limitado a los tipos descritos en el presente documento. Tras el contacto del material de ácido nucleico con los extremos libres de las sondas, se libera el posible tampón o retenedor que protege los cuadrantes 13a - 13d en su configuración conectada, tal como se muestra en la Figura 10c. Como resultado, los cuadrantes, un ejemplo individual de los mismos se muestra en la Figura 10d, se pueden separar entre sí para presentar la configuración liberada que se muestra en la Figuras 10c y 10d.

45 Esta transformación se puede realizar mediante manipulación manual de los cuadrantes, sin necesidad de que el usuario toque las sondas. En consecuencia, la posibilidad de que el ADN del usuario entre en contacto con los extremos libres es prácticamente nula.

50 Cuando los cuadrantes 13a -13d adoptan la configuración separada de las Figuras 10c y 10d, los elementos de sonda 12 se separan entre sí.

55 Así, en términos generales, el equipo de la Figura 10 incluye una pluralidad de elementos de sonda 12a - 12d que se pueden desplazar unos con respecto a otros entre configuraciones contiguas y separadas entre sí, cada elemento de sonda 12a, 12b, 12c, 12d incluyendo una pieza de punta que, cuando los elementos de sonda adoptan esta configuración contigua, se combina con la otras piezas de punta para definir una punta compuesta que se utiliza para entrar en contacto con el material que contiene ácido nucleico.

60 Los cuadrantes del mango 13a-13d se pueden utilizar a continuación para manipular los respectivos elementos de sonda 12a-12d hacia las aberturas 14 de los respectivos receptáculos 11, tras retirada o abertura de cualquier precinto del tipo general anteriormente descrito.

Los elementos de sonda 12a - 12d pueden, en esta disposición, empujarse por las respectivas aberturas 14a - 14d hacia el interior de los receptáculos.

65

En su extremo más alejado del elemento de sonda unido se forma cada cuadrante 13a-13d incluyendo una pestaña 17 que se extiende de forma generalmente paralela a la dirección de elongación del cuadrante. Las pestañas 17 se pueden usar para facilitar la manipulación manual fina de los elementos de sonda 12a-12d hacia el espacio interior definido en cada receptáculo 11.

5 Cada uno de los elementos de sonda 12a-12d está asegurado a su cuadrante 13a-13d asociado del mango mediante un elemento de precintado 16 cilíndrico que, dependiendo de la construcción concreta de la combinación del mango del elemento de sonda 1, está formado íntegramente con ellos o está conectado a los mismos, por ejemplo, en forma de una arandela anular.

10 Cada una de las aberturas 14 tiene sección circular. El diámetro de cada elemento de precintado 16 es tal que, tras la inserción del elemento de sonda 12 unido en el interior de uno de los receptáculos 11, el elemento de precintado 16 precinta firmemente el receptáculo contra la entrada o la salida de líquidos, y en particular, de aquellos que contienen o transportan ácido nucleico. Como resultado, el ácido nucleico adherido al elemento de sonda 12 en cada caso se presenta, y se coloca, en contacto con los reactivos de su interior. Como resultado, las reacciones de amplificación de ácido nucleicos, por ejemplo, de los tipos descritos en el presente documento, tienen lugar.

15 Normalmente, los receptáculos 11 se fabricarían a partir de materiales transparentes o translúcidos, o incluirían una o más ventanas transparentes o traslúcidas. Como resultado, puede llevarse a cabo la valoración óptica del resultado de la reacción, por ejemplo mediante equipos ópticos. El bastidor 16 y/o los receptáculos 11, por tanto, se pueden conformar y dimensionar de forma adecuada para su uso con este tipo de equipos.

20 En referencia ahora a las Figuras 11 a 16, otra realización de un equipo de muestreo de ácido nucleico 21, 22, 23 de acuerdo con la invención se muestra en una vista en perspectiva.

25 En la Figura 11 cuatro receptáculos 21 a, 21 b, 21 c, 21d, se han formado como elementos troncocónicos que se extienden hacia abajo desde el lado inferior, durante el uso, de una hoja rígida 24 de un material polimérico que es inerte (es decir, que no tienen efectos) para el ácido nucleico. En la realización preferida de la invención, los receptáculos 21a - 21d se han formado moldeándolos simultáneamente con la hoja 24.

30 Los receptáculos 21a - 21d, tal como se ilustran, se forman adyacentes a las cuatro esquinas de una hoja 24 cuadrada, aunque son posibles otras cantidades y diseños para los receptáculos 21, y está comprendido en el alcance de la invención; y la hoja 24 no tiene que adoptar la forma esencialmente cuadrada mostrada.

35 Los receptáculos 21a - 21d se pueden suministrar en una forma inicialmente precintada mediante una membrana de precintado tal como una lámina que cierra las aberturas 27a - 27d formadas en los extremos más superiores, durante el uso, de los receptáculos 21a - 21d. De esta forma, los receptáculos pueden suministrarse ya precintados y conteniendo, por ejemplo, reactivos de la PCR o de otra amplificación de una forma que garantice la pureza de dichos reactivos hasta el uso deseado del equipo. En ese momento, cualquiera de las láminas presentes puede despegar la hoja 24 de tal forma que abra los orificios para la inserción en su interior de los elementos de sonda 22a, 22b, 22c, 22d descritos más adelante en el presente documento.

40 Los elementos de sonda 22a - 22d se forman como los conos o secciones cónicas respectivos de un material, tal como uno de los descritos en el presente documento, al que se puede adherir un ácido nucleico, de acuerdo con los principios de la invención. En una disposición alternativa comprendida en el alcance de la invención, sin embargo, los conos pueden estar recubiertos, o tener absorbido, dicho material con el fin de proporcionar a las piezas del equipo donde sea necesario una adherencia para el ácido nucleico. Además, se pueden proporcionar otras formar diferentes a conos o piezas de los mismos, aunque se cree que los conos seccionados mostrados son especialmente adecuados como elementos de sonda.

45 Los elementos de sonda 22a - 22d sobresalen de un lado de una hoja 28 adicional de, por ejemplo, material polimérico, especialmente un material que sea "inerte" para el ácido nucleico como se ha explicado anteriormente. De hecho, normalmente, la hoja 28 está fabricada del mismo material son las puntas de la sonda.

50 La hoja 28 es también esencialmente cuadrada, o puede estar conformada de una manera parecida a la de un trébol de cuatro hojas, de tal forma que cada una de las correspondientes bridas de forma esencialmente circular se extiende alrededor del extremo más ancho (superior) de los elementos de sonda 22a - 22d. Las bridas 28 u otras formaciones de tipo hoja adyacentes al extremo superior de cada elemento de sonda se reúnen entre sí para definir la forma de hoja descrita.

55 Tal como se muestra, los cuatro elementos de sonda se extienden desde el mismo lado de la hoja 28, esencialmente en la misma dirección cuando la hoja adopta una configuración no tensionada, como se muestra en las Figuras 11 a 16.

60 En el lado más alejado de los elementos de sonda 22a - 22d, la hoja 28 tal como se usa inicialmente se asegura de forma que se pueda liberar a un extremo del manipulador 23 alargado.

65

5 El manipulador 23 está dimensionado para sujetarse con la mano, y está formado principalmente a partir de un material rígido como cualquiera de una amplia gama de materiales de plástico o aleaciones metálicas. El uso de materiales naturales, o vidrio, como el material de construcción principal del manipulador 23 no se excluye, pero se cree que estos materiales no son tan convenientes para formar un mango como los plásticos y metales mencionados.

10 El manipulador 23 incluye un vástago 30 cilíndrico, hueco y alargado que se ensancha por un extremo en el cual la hoja 28 se asegura mediante una conexión separable 31. En el extremo opuesto, el vástago 29 termina en un mango 32 de sujeción que pueden adoptar varias formas posibles.

En la realización ilustrada, el mango incluye dos placas paralelas planas 32a, 32b que se extienden transversalmente en la dirección alargada del vástago 30 y están separadas entre sí en esta dirección alargada mediante un elemento de variada de refuerzo 32c.

15 El extremo superior del vástago 30 incluye, en sus lados opuestos, un par de bridas 26a, 26b dispuestas en los lados opuestos del vástago 30.

Cada brida 26a, 26b define una ranura orientada hacia dentro con el extremo abierto 26c, 26d. Las respectivas ranuras 26c, 26d se oponen entre sí en los lados opuestos del vástago 30, como se muestra en la Figura 11.

20 Extendiéndose desde lo que es durante el uso la parte inferior de la placa 32a, y firmemente fijada a la anterior, se encuentra un émbolo 29 alargado que encaja de forma deslizable en el interior hueco del vástago 30. El émbolo 29 se puede desplazar sujetando la placa plana superior 32b, entre una posición parcialmente expuesta, como se muestra en la Figura 11, y una posición adicional que está completamente alojada en el interior del vástago 30.

25 En la última posición, la placa plana superior 32b se puede girar de forma que hace que los extremos de la placa plana inferior paralelo 32a se introduzca en las ranuras opuestas definidas por las bridas 26a, 26b y evitando de esta forma que el émbolo 29 revierta a la posición parcialmente expuesta, salvo que la placa plana superior 32b se gire deliberadamente para retirar los extremos de la placa plana inferior 32a de las ranuras anteriormente mencionadas.

30 El objetivo de esta disposición se describe a continuación.

35 La hoja 28 se fija a la periferia final de la conexión 31. La conexión 31 incluye un interior hueco, en el que lo que es el extremo inferior durante el uso del émbolo 29 se extiende en una dirección paralela a la dirección de elongación de la varilla. El émbolo 29, en su movimiento entre las posiciones parcialmente expuesta y la posición retraída anteriormente descritas actúa como un activador, ocasionando el movimiento selectivo de los elementos de sonda 22a - 22d entre una configuración en la que sus puntas 33, alejadas de la hoja 28, están continuamente en contacto; y una configuración como la mostrada en las Figuras 11 a 16 en la que los elementos de sonda están separados entre sí por separadores correspondientes a los separadores de los receptáculos 21a - 21 d.

40 El émbolo 29 consigue este efecto porque la hoja 28 es flexible. El émbolo 29 está en el estado inicial del manipulador 23 fijado a la hoja 28. La barra se puede desplazar en el interior de la varilla hueca 30 como se ha descrito anteriormente. El movimiento de la barra hacia la posición retraída estira, de esta forma, la hoja 28 flexible parcialmente hacia el interior de la conexión 31. Esto, a su vez, estira las partes de la punta 33 una hacia la otra, de manera que se define una punta compuesta en la que las partes de la punta están en contacto una con otra y definen una única región para ponerse en contacto con el material que contiene ácido nucleico.

45 El movimiento de la barra a lo largo del interior de la varilla 30 se realiza normalmente se efectúa tirando de la placa 32b, aunque esto se puede conseguir de varias otras formas.

50 Por ejemplo, un pasador 30a, como se muestra en la Figura 17 conectado a la barra se puede mantener cautivo pero deslizable en una ranura 30b de forma que sobresalga sobre el exterior de la varilla 30. El usuario puede desplazar la barra haciendo girar el tapón giratorio 32", que está unido a la barra mediante una disposición que incluye un mecanismo de conversión de movimiento rotatorio en movimiento lineal. El pasador, durante el movimiento de la barra, se desliza a lo largo de la ranura que define de esta forma posiciones de detención finales fácilmente detectables para la barra. El movimiento de la barra, como se describe, estira la hoja 28 hacia el interior de la conexión 31, que en la Figura 17 tiene forma cónica.

55 En la Figura 17, que es una variante del dispositivo de las Figuras 11 a 16, el mando 32 tiene una forma esencialmente cilíndrica, y está formada por dos partes 32' (reunidas en el vástago 30) y 32" (alejado del vástago 30). La pieza del mango 32" se puede girar con respecto a la pieza 32' y está conectada a un mecanismo de bloqueo en el interior del mango 32 y la varilla 30. La rotación de la pieza 32" con respecto a la pieza 32' activa selectivamente un mecanismo de bloqueo con el fin de retener la barra en su posición retraída, como se muestra por la posición del pasador 30a en la ranura 30b.

65

Independientemente de la disposición del ajuste preciso adoptada, sin embargo, se prefiere que, tras liberar el émbolo 29, la resiliencia de la hoja haga que los elementos de sonda 22a - 22d reviertan a la configuración no tensionada, separada entre sí que se ilustra en las Figuras 11 a 16, donde el émbolo 29 se desplaza en dirección contraria dentro del vástago 30.

5 Además de lo anterior, se pueden proporcionar otros tipos de bloqueos, clips o retenedores con el fin de retener selectivamente los elementos de sonda 22a - 22d en su configuración contigua. Dichos bloqueos, etc. actuarían normalmente para retener el émbolo 29 en la posición correspondiente a la disposición de puntas contiguas descrita.

10 En su parte central, la hoja 28 incluye, extendiéndose generalmente en la misma dirección, aunque hasta una distancia menor, que los elementos de sonda, una pestaña de seguridad a prueba de manipulaciones en forma de un elemento 34 de forma circular (un "arpón"). El objetivo y funcionamiento de este componente se describe más adelante en el presente documento. Otras formas de fijar las sondas, que se le ocurrirán al experto en la materia de los receptáculos, están comprendidas en el alcance de la invención.

15 Los elementos de sonda 22a - 22d se pueden desprender, o liberar de cualquier otra forma, del manipulador 23. Esto se puede conseguir, por ejemplo, a través de la unión entre las bridas y el resto de la hoja 28, que puede estar definida por partes frangibles. En la disposición preferida ilustrada, la totalidad de la hoja 28 puede estar retenida temporalmente fijada sobre el manipulador 23 por un mecanismo de sujeción que se puede liberar de forma selectiva.

20 Durante el uso, el equipo de las Figuras 11 a 16 o 17, el émbolo 29 se desplaza inicialmente en el interior de la varilla 30, mediante la operación de un mecanismo de activación tal como se ha descrito anteriormente, y bloquearse (si existe un bloqueo) en su posición correspondiente al acercamiento de las partes de la punta, como se ha descrito anteriormente. Dicho movimiento del émbolo 29 puede ser ascendente o descendente con respecto al vástago 30, dependiendo de la disposición exacta seleccionada. En la realización de la Figura 11, el bloqueo del émbolo se consigue haciendo girar la placa plana superior 32b para hacer que los bordes de la placa plana inferior 32a se introduzcan en las ranuras 26c, 26d.

30 Este movimiento del émbolo 29 hace que las piezas de la punta 33a - 33d de los elementos de sonda 22a - 22d adopten su configuración contigua de forma que presenten, esencialmente, una sola muestra que tenga una superficie de contacto con el ácido nucleico.

35 Esta superficie puede, mediante manipulación del mango 32, insertarse, o frotar, el material que contiene ácido nucleico. A la vista de los materiales con los que están fabricadas al menos las partes de la punta 33a - 33d, esto da como resultado la adherencia del ácido nucleico, o el material que contiene ácido nucleico, de una forma esencialmente uniforme, a la punta compuesta definida por las partes de la punta 33a - 33d.

40 Durante este proceso, y por lo tanto la posterior operación del equipo, un operador sujeta el mango de sujeción 32. Esto permite al operador evitar el contacto con los elementos de sonda, que están separados del mango 32 por la longitud del vástago 30.

45 El frotado, u otro contacto, del material que contiene ácido nucleico con la punta compuesta da como resultado que queden adheridas a cada una de las partes de la punta 33 cantidades aproximadamente iguales de ácido nucleico.

50 Una vez que se ha producido esto, el émbolo 29 se libera (por ejemplo, liberando el bloqueo o haciendo girar la placa plana superior 32b como se ha descrito). La resiliencia de la hoja 28 hace que los elementos de sonda adopten la posición no tensionada, separada entre sí, en la que se pueden alinear con las aberturas 27a - 27d de los receptáculos 21a - 21d. Este movimiento se produce debido al émbolo 29 que se desplaza en dirección opuesta a la proporciona la configuración contigua de las puntas 33.

55 Tras la retirada de todas las láminas que cubren los receptáculos 21 (preferentemente mediante despegado), los elementos de sonda 22a - 22d se introducen en el interior de los receptáculos 21 de tal forma que el ácido nucleico soportado en los elementos de sonda queda expuesto a los reactivos de amplificación. Los receptáculos 21a - 21d son transparentes o translúcidos, de tal forma que los resultados de la reacción resultante se pueden evaluar con un equipo óptico.

60 La forma ahusada de los elementos de sonda 22a - 22d se puede seleccionar de tal forma que, tras la inserción en los receptáculos 21a - 21d, los elementos de sonda 22a - 22d precintan los receptáculos mediante un encaje de interferencia con las regiones superiores de las superficies de las paredes internas de los receptáculos.

65 Por supuesto, otras formas de precintar los receptáculos, que se le ocurrirán al experto en la materia, están comprendidas en el alcance de la invención. Es importante en primer lugar garantizar que se produce un precinto eficaz, ya que se espera que el equipo de la invención se utilice en, por ejemplo, un caso jurídico penal, en donde la integridad de las evidencias materiales es muy importante.

La hoja 24 en la que los receptáculos 21a - 21d se han moldeado o se han conformado de otra manera incluye opcionalmente una abertura central pasante. El objetivo de esta es recibir el (también opcional) miembro de retención 34 cónico circular durante o después de la inserción de los elementos de sonda 22a - 22d en los receptáculos 21a - 21d.

5 El miembro de detención 34 se extiende predominantemente sobre el mismo lado de la hoja 28 que los elementos de sonda 22a - 22d e incluye superficies en pendiente y rebajadas que le permiten quedar bloqueado, como un cierre de presión, en la abertura de la hoja 24 tras dicha inserción de los elementos de sonda 22a - 22d en los receptáculos.

10 El efecto global, por tanto, del elemento de detención 34 y la abertura es proporcionar una seguridad "*a prueba de manipulaciones*" de los elementos de sonda en los receptáculos 21 a - 21 d. Esta característica es de especial interés cuando el equipo de la invención debe actuar como evidencia en, por ejemplo, un caso jurídico penal, o una investigación pública acerca del brote de una enfermedad.

15 Como en el caso de la realización de la invención de la Figura 10a - 10d, en la realización de la invención de las Figuras 11 a 16, los receptáculos preferentemente son translúcidos o transparentes para facilitar la valoración de los resultados de la amplificación sin perturbar las condiciones del interior de los receptáculos. Los materiales de las partes internas de los receptáculos se seleccionan para que sean inertes para los reactivos previstos para transportar en su interior.

20 Todas las realizaciones de las Figuras 10 a 16 se caracterizan por la característica de que las sondas, de una forma u otra, conforman un precinto tras su inserción en los receptáculos opcionales. En consecuencia, los elementos de sonda pueden seguir conectados al manipulador mientras se producen las reacciones de amplificación del ADN.

25 En las realizaciones descritas a continuación, los elementos de sonda se separan del manipulador en los receptáculos, y se utilizan cierres separados para precintar el último.

30 Las Figuras 18 a 20 muestran en una vista en sección transversal y en elevación una realización adicional de la invención, que en cierta extensión se basa en que los elementos de sonda tienen cierto grado de deformabilidad elástica o "*memoria de forma*". Esta característica permite la transformación de los elementos de sonda entre las disposiciones convergente y mutuamente separadas que son características de las realizaciones anteriormente descritas.

35 En las Figuras 18 a 20, los elementos de sonda 52a - 52d se retienen cautivos en el interior de un manipulador, en la forma de un almacén alargado 53. Los elementos de sonda adoptan la forma de barras alargadas, que tienen la misma longitud. Cada una de las barras puede estar formada con lo que se denominan materiales aleados con memoria de forma e incluyen una pieza de punta 54 extraíble hecha de uno de los materiales explicados en el presente documento que sea adecuado para el muestreo de ácidos nucleicos. La Figura 20 muestra una de las piezas de punta 54 en una vista en perspectiva ampliada.

40 En los extremos alejados de las partes de punta, los elementos de sonda están fijados entre sí en un haz, para que se pueda encajar en el interior de una parte del mango 56 del almacén 53.

45 Un activador del elemento de sonda en forma de una parte de funda 57 cilíndrica hueca del almacén 53 se retiene cautiva de forma deslizable en la anterior para que se pueda desplazar a lo largo del haz de los elementos de sonda 52a - 52d. En la condición de suministro, la parte de funda 57 se superpone a los elementos de sonda 52a - 52d en la mayoría de su longitud. En su extremo más alejado de las partes de punta 54, la parte de funda 57 incluye un elemento de retención anular deformable de forma elástica en la forma de un anillo 51 que sobresale hacia el interior de la parte de funda 57 desde la pared cilíndrica de la misma. El anillo 51 es selectivamente capaz de "*encajar a presión*" en las correspondientes ranuras de detención anulares delantera 51a y posterior 51b formadas en la superficie exterior de la parte del mango 56 a la que están fijadas las barras. La parte de funda 57 se puede deslizar a lo largo de la parte del mango 56 para hacer que el anillo 51 encaje bien en la ranura 51a o en la ranura 51b según se desee. Esto, a su vez, provoca la retención liberable de la parte de funda 57 en cualquiera de las dos posiciones del mango 56.

50 Los elementos de sonda 52a - 52d se doblan de tal manera que, en su estado no tensionado, sus extremos libres que soportan las partes de punta 54 se expanden para proporcionar la separación mutua de las mismas. En esta configuración, los elementos de sonda 52a - 52d son adecuados para su inserción en receptáculos tales como los receptáculos 21a - 21d anteriormente descritos. La parte de funda 57 se puede retirar a lo largo del almacén 53 hacia la parte del mango 56 para conseguir este estado.

55 El desplazamiento de la parte de funda 57 en la dirección opuesta hacia las partes de la punta 54 de forma que quede cercana a las mismas hace que las partes dobladas de los elementos de sonda 52a - 52d se enderecen. Como resultado, las partes de la punta 54 convergen contra la deformabilidad elástica de los elementos de sonda

que se encuentran adyacentes entre sí y definen una punta compuesta que es adecuada para su unión al material que contiene ácido nucleico.

- 5 La punta compuesta resultante puede estar hecha de tal manera que se une a dicho material a través de la sujeción manual de la parte del mango 56. La parte de funda se puede operar manualmente según se desee para desplazarla entre su posición retirada y su posición proximal (donde la disposición de la detención anteriormente descrita causa la retención temporal de la parte de funda en uno u otro extremo de su intervalo de movimiento) y de esta forma convertir los elementos de sonda 52a - 52d entre las disposiciones convergente y divergente.
- 10 Las barras que definen los elementos de sonda 52a-52d son huecos, y sus extremos están abiertos. Como se ilustra en la Figura 20, cada parte de punta 54 está definida como un cilindro 54a que tienen esencialmente el mismo diámetro exterior que una de las barras, que sobresale de un extremo de un espárrago cilíndrico 54b de diámetro reducido.
- 15 Cada espárrago 54b es un encaje de fricción en el extremo abierto de una de las barras. La fricción que retiene las partes de la punta con respecto a las barras se puede superar fácilmente mediante un mecanismo de empuje que se describe a continuación.
- 20 El mecanismo de empuje se define en parte por un pulsador cilíndrico de 58 que sobresale de la parte del mango 56 en su extremo alejado de las partes de punta 54.
- El pulsador 58 se puede deslizar axialmente, por ejemplo, bajo la presión del pulgar contra un resorte 59 de restauración en un orificio cilíndrico alagado 61 formado en la parte del mango 56 anteriormente mencionada.
- 25 El pulsador 58 está conectado rígidamente en el interior del armazón 53 a cuatro barras de empuje 62 flexibles que se extienden a lo largo de los interiores huecos de las barras que definen los elementos de sonda 52a-52d para encajar los espárragos 54b de las partes de la punta 54.
- 30 Será evidente, por tanto, que tras la retirada de la parte de funda 57 causará la expansión de las partes de la punta 54, y tras la inserción de las partes de la punta 54 revestidas con ácido nucleico en los correspondientes receptáculos 21a-21d, la operación del pulsador 58 ocasiona la eyección de las partes de la punta al interior de los receptáculos.
- 35 Los receptáculos se pueden cerrar, por ejemplo, con cierres tales como, pero sin limitarse a tapones, tras la retirada de los elementos de sonda 52a-52d, con el resultado de que las partes de la punta 54a-54d quedan separadamente precintadas en el interior de los receptáculos en los que puede producirse a continuación la amplificación mediante PCR.
- 40 La liberación del pulsador 58 provoca la retirada de las barras impulsoras, de tal forma que las piezas de la punta 54 recientes se pueden conectar a continuación a los extremos abiertos de los elementos de sonda 52a-52d, si es necesario después de la limpieza. Como alternativa, la totalidad del conjunto puede ser desechable. El avance de la parte de funda 57 hasta la posición mostrada en, por ejemplo, la Figura 18 hace que las partes de la punta 54 converjan y, de nuevo, adopten su relación contigua mostrada, lista para realizar más operaciones de muestreo de ácido nucleico.
- 45 En referencia ahora las Figuras 21-24, se ilustra otra variante del equipo.
- 50 Como se ilustra mejor en las Figuras 21, 22 y 24, un mango 66 comprende durante el uso barriles cilíndricos superior 67 e inferior 68 que tienen ambos el mismo diámetro.
- El barril inferior 68 tiene sobresaliendo de su extremo libre una matriz de cuatro soportes móviles en la forma de placas 69a-69d esencialmente triangulares.
- 55 Los barriles 67, 68 pueden girar con respecto uno del otro, como denota la flecha de la Figura 21 para hacer que las placas 69a-69d se desplacen mediante una acción de leva que se describe a continuación. De esta forma, las placas 69a-69d se desplazan desde una posición inicial, mostrada en la Figura 21, en la que una pluralidad de partes de punta 71a, 71b, 71c, 71d se encuentran en una disposición contigua (muestreo de ácido nucleico) cerca del eje central longitudinal del equipo hasta una posterior posición de eyección de la punta, denotada en la Figura 24 por las líneas punteadas y que se muestra en la vista en perspectiva de la Figura 22. En esta última posición, las partes de la punta 71 se encuentran separadas desde el eje central y se ubican mediante eyección en el interior de los correspondientes receptáculos tales como los receptáculos 21 descritos a continuación.
- 60 Las placas 69a-69d, como se muestra en la Figura 23, que es una vista en sección que muestra partes del dispositivo mientras adoptan las correspondientes posiciones operativas en las dos mitades de la imagen, son esencialmente placas con forma de triángulo rectángulo cuyas hipotenusas, en la posición inicial de la Figura 21 convergen para definir una punta roma 72.
- 65

Cada placa triangular 69 se puede suspender de forma pivotable de arriba mediante un pasador 73 de pivote rotatorio. Cada pasador de pivote 73 conecta la parte inferior del barril superior 67 al borde adyacente 74, que no es una hipotenusa, de la placa 69 aproximadamente a mitad de camino de su longitud.

5 El apéndice 76 de la placa 69 descansa radialmente hacia afuera del pasador de pivote 73 se mantiene cautivo con respecto al barril inferior 68 mediante un resorte 77. Los barriles superior e inferior 67, 68 están cautivos uno respecto al otro, y se pueden desplazar axialmente uno con respecto al otro contra el movimiento de (en la práctica, cuatro) resortes de restauración 83 capturados entre los barriles inferior y superior 67, 68 adyacentes a la periferia exterior del dispositivo. Para adaptarse al desplazamiento axial de los barriles 67, 68, dos anillos retenedores 78 y 10 79 formados en el interior, y que se extienden alrededor del interior hueco del barril inferior 68 están separados axialmente entre sí y atrapan entre ellos, de forma móvil, una brida anular o parcialmente anular formada sobre la parte exterior del barril 67 alojado en el interior del barril inferior 68.

15 Esta disposición es tal que, durante la rotación de los barriles superior e inferior 67, 68 uno con respecto al otro, cada soporte (placa) 69 pivota alrededor de un eje vertical definido por su pasador de pivote 73.

20 Esto provoca que el borde 82 en expansión vertical, que no es una hipotenusa, de cada placa 69 simultáneamente cambie desde la posición adyacente central mostrada en las Figuras 21, 24 y la mitad izquierda de la Figura 23 a la posición de eyección, separada del eje del dispositivo, mostrada en la Figura 22, y la mitad derecha de la Figura 23.

En la proximidad de cada borde 82, cada soporte 69 está hueco, y define un orificio alargado 84 que se extiende desde la parte superior del soporte a la parte inferior.

25 Una respectiva parte de punta 71 que tiene esencialmente el mismo diseño que las partes de la punta 54 anteriormente descritas se mantiene cautiva en el extremo inferior, como se muestra para cada orificio 84 cuando su espárrago se ha empujado al interior del orificio.

30 Una barra de empuje 86 que tiene un tapón en forma de domo 87 sobresale del extremo superior del orificio 84 y se extiende a lo largo de una altura justo por encima del final del espárrago de la parte de la punta 54. La separación entre el extremo más inferior de la barra de empuje 86 y el espárrago de la parte de la punta 54 es ligeramente inferior a la separación entre el lado inferior del tapón en forma de domo 87 y el borde 74 de cada placa 69.

35 El desplazamiento de las placas 69 de las posiciones de la Figura 22 alinea cada tapón 87 de las barras de empuje 86 con el correspondiente elemento presor 88 sobresale hacia abajo desde la parte inferior del barril superior 67.

40 La compresión de los barriles 67, 68 juntos contra las fuerzas de los resortes de restauración 83 hace que los elementos presores 88 encajen los tapones 87. Esto impulsa las barras de empuje hacia abajo para encajar los espárragos y así expulsar las partes de la punta 71 de las placas 69 respectivamente al interior de los receptáculos que pueden estar precintados, por ejemplo, usando tapones u otros cierres.

Referencias

45 1 French DJ, Howard RL, Gale N, Brown T, McDowell DG, Debenham PG. (2008) Interrogation of short tandem repeats using fluorescent probes and melting curve analysis: a step towards rapid DNA identity screening. *Forensic Sci Int Genet.* 4: 333-9.

50 2 Masaomi Iwasaki, Toshihiro Yonekawa, et al (2003) Validation of the Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Single Nucleotide Polymorphism Genotyping with Whole Blood. *Genome Letters*, Vol. 2, No. 3, 119-126.

3 Christophe Thibault, Childe rick Se'verac, Anne-Francöise Mingotaud, Christophe Vieu, Monique Mauzac (2007) Poly(dimethylsiloxane) Contamination in Microcontact Printing and Its Influence on Patterning Oligonucleotides *Langmuir*, 23(21), 10706-10714.

REIVINDICACIONES

1. Un equipo de muestreo de ácido nucleico que comprende una sonda para soportar una muestra de ácido nucleico; y un manipulador que se puede acoplar a la sonda para permitir la manipulación de la sonda, siendo la sonda separable del manipulador en donde la sonda incluye una pluralidad de elementos de sonda que se pueden desplazar unos con respecto a otros entre configuraciones contiguas y mutuamente separadas, incluyendo cada elemento de sonda una pieza de punta que, cuando los elementos de sonda adoptan su configuración contigua, se combina con la otras piezas de punta para definir una punta compuesta que puede entrar en contacto con el material que contiene ácido nucleico con el fin de trasportar una muestra del mismo.
2. Un equipo de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la punta compuesta de la configuración contigua comprende una pluralidad de contactos de ácido nucleico fijados respectivamente, y correspondiendo en número, a las partes de la punta de tal forma que, tras el contacto entre el ácido nucleico y la punta compuesta, cada uno de los contactos de ácido nucleico capta esencialmente la misma cantidad de ácido nucleico.
3. Un equipo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 en el que el manipulador incluye un activador del elemento de sonda para ocasionar el movimiento selectivo de los elementos de sonda entre las configuraciones contiguas y mutuamente separadas.
4. Un equipo de acuerdo con la reivindicación 2 en el que el manipulador incluye un vástago alargado y el activador del elemento de sonda se puede desplazar a lo largo del vástago para ocasionar un movimiento selectivo de los elementos de sonda entre las configuraciones contiguas y mutuamente separadas; opcionalmente en donde el vástago es hueco y el activador del elemento de sonda se encuentra sustancialmente en el interior y se puede desplazar en el interior del vástago; opcionalmente en donde en el vástago incluye una abertura pasante formada en su interior, y el activador del elemento de sonda se puede poner en contacto a través de la abertura pasante con el fin de desplazarlo en el interior del vástago.
5. Un equipo de acuerdo con la reivindicación 3 en el que el manipulador incluye un elemento giratorio que está conectado operativamente al activador del elemento de sonda de tal forma que la rotación del elemento giratorio hace que el activador del elemento de sonda desplace los elementos de sonda entre las configuraciones contiguas y mutuamente separadas.
6. Un equipo de acuerdo con la reivindicación 3 o cualquier reivindicación anterior dependiente de la misma, en el que cada elemento de sonda incluye un elemento alargado deformable elásticamente que tiene dicha parte de punta en un extremo; en donde los miembros alargados están dispuestos en un haz que se extiende a lo largo uno del otro, con sus partes de punta en el mismo extremo del haz; en donde cada elemento de sonda está doblado de tal forma que las partes de la punta tienden a divergir entre sí; y en donde el activador del elemento de sonda incluye una parte de funda que rodea el haz y que se puede desplazar a lo largo de los elementos del haz, en donde la parte de la funda, cuando está próxima a las partes de la punta, hace que las partes de la punta converjan en oposición a la deformabilidad elástica de los elementos de sonda para definir la punta compuesta y la parte de la funda, cuando está separada de las partes de la punta a lo largo del haz, permite que las partes de la punta diverjan entre sí como resultado de su forma doblada y su deformabilidad elástica; opcionalmente en donde el aparato incluye uno o más retenedores liberables para retener la parte de funda en una ubicación predeterminada.
7. Un equipo de acuerdo con la reivindicación 3 o cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5 dependientes de la anterior, que incluye una hoja deformable elástica que soporta una pluralidad de elementos de sonda definiendo cada uno de ellos un extremo libre que incluye dicha parte de punta, en donde la hoja se puede transformar entre una configuración en la que las partes de la punta divergen entre sí y una configuración deformada en la que los elementos de sonda están contiguos de forma que las partes de la punta definan la punta compuesta.
8. Un equipo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que incluye además un receptáculo, que incluye una abertura que se puede precintar, para contener uno o más reactivos y una muestra de ácido nucleico; operación del manipulador que ocasiona o permite la inserción de la sonda a través de la abertura para ubicar la muestra en el receptáculo.
9. Un equipo de acuerdo con la reivindicación 8 cuya sonda incluye un cierre que tras la ubicación de la muestra en el receptáculo cierra el receptáculo contra la salida o la entrada de material que contiene ácido nucleico.
10. Un equipo de acuerdo con la reivindicación 9 en el que el cierre es, o incluye, un elemento de precintado a prueba de líquidos que está fijado o integrado en la sonda; o en el que el equipo incluye un cierre que está fijado o integrado en una pluralidad de las sondas.
11. Un equipo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 en el que el cierre y el manipulador son separables selectivamente entre sí.

- 5 12. Un equipo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en el que el manipulador incluye una fuente que retiene una pluralidad de las sondas de una forma que las aisle del ambiente circundante; y un mecanismo de dispensación para presentar las sondas secuencialmente de forma que se expongan en al menos una parte para unión con el ácido nucleico; opcionalmente en donde la fuente es, o incluye, una cámara que contiene una o más sondas, incluyendo la cámara una abertura de la cámara a través de la cual dicha sonda puede sobresalir durante el funcionamiento del mecanismo de dispensación; opcionalmente en donde una sonda que sobresale cierra la abertura de la cámara durante la dispensación.
- 10 13. Un equipo de acuerdo con la reivindicación 1 o cualquier reivindicación anterior dependiente de la misma, en el que el manipulador incluye uno o más eyectores para expulsar al menos una de dichas sondas del manipulador durante su separación de la sonda, pudiendo accionarse el eyector, o cada eyector, desde una ubicación, en el manipulador, que está alejada de la sonda a expulsar.
- 15 14. Un equipo de acuerdo con la reivindicación 13 que incluye una pluralidad de las sondas y un eyector común para expulsar más de una sonda del manipulador; o en donde el equipo incluye una pluralidad de las sondas y una pluralidad de eyectores correspondientes, pudiendo accionarse dicho eyector respectivo para expulsar cada una de dichas sondas.
- 20 15. Un equipo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en el que la sonda o cada sonda incluyen, o se pueden configurar, para definir una punta que se puede usar para poner en contacto con ácido nucleico con el fin de introducir una muestra del mismo en un receptáculo durante el funcionamiento del manipulador.
- 25 16. Un equipo de acuerdo con la reivindicación 15 en el que al menos la punta está hecha de, o incluye, un material polimérico al que se puede adherir ADN o material que contiene ácido nucleico de un eucariota superior, opcionalmente donde el material polimérico se selecciona de la lista que comprende policarbonato, vidrio, copolímero de olefina cíclica tal como Topas, un acrílico tal como PMMA, poliestireno cristalino, polipropileno, HDPE, poliestireno de medio impacto, PVC, polímero de cristal líquido 30 %, Trans ABS, copolímero de acetal, poliéster, polieterimida, polietileno, nailon, poliéter poliuretano, copolímero de bloques estireno-butadieno, copolímero aleatorio de polipropileno, etileno-acetato de vinilo siloxano tal como PDMS y elastómero termoplástico tal como Santoprene.
- 30 17. El equipo de cualquier reivindicación anterior en el que el dispositivo de muestreo o parte del mismo al que se adhiere material que contiene el ácido nucleico se ha tratado para eliminar el ADN mediante esterilización, o la sonda para soportar dicha muestra de ácido nucleico se ha tratado para eliminar el ADN mediante esterilización.

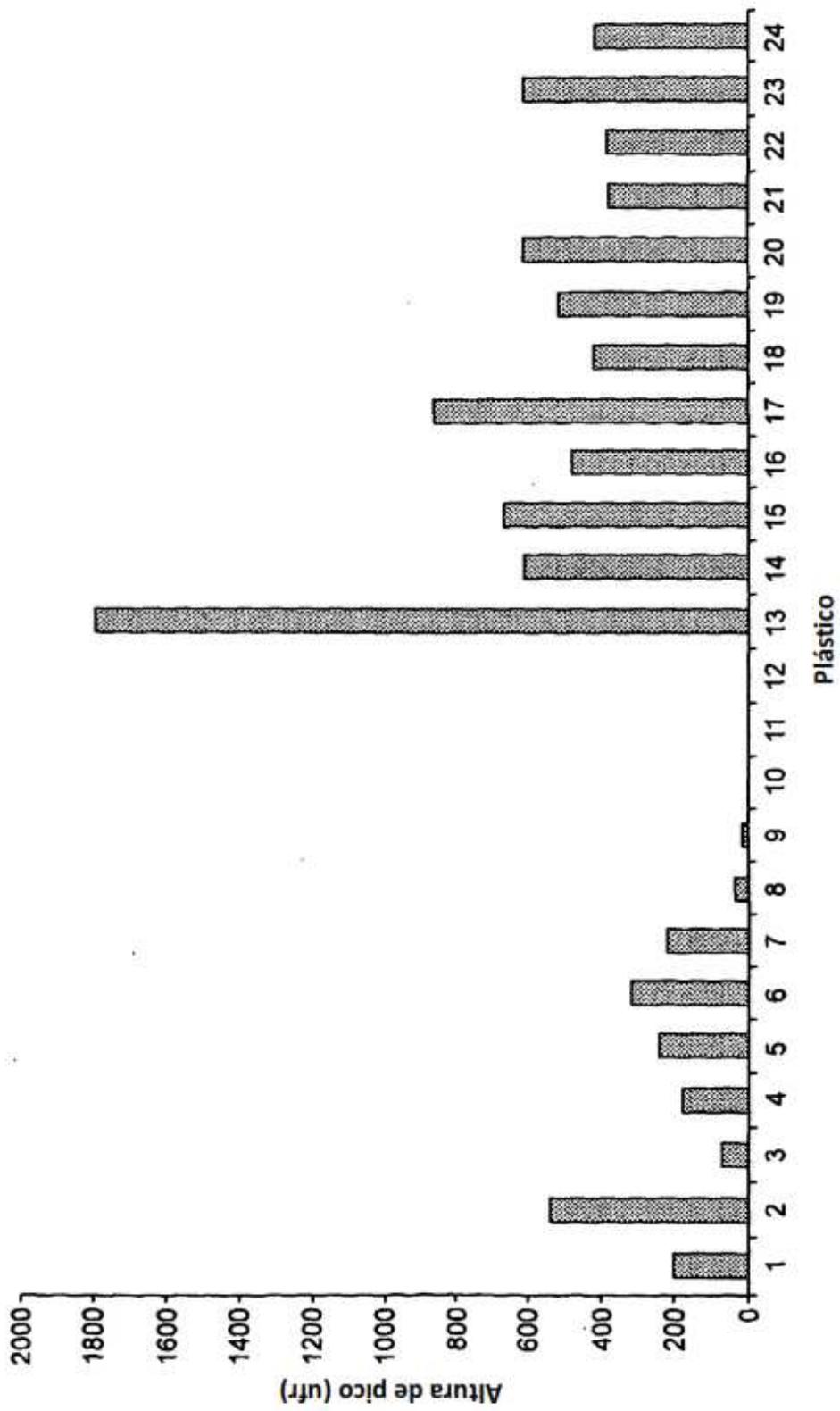
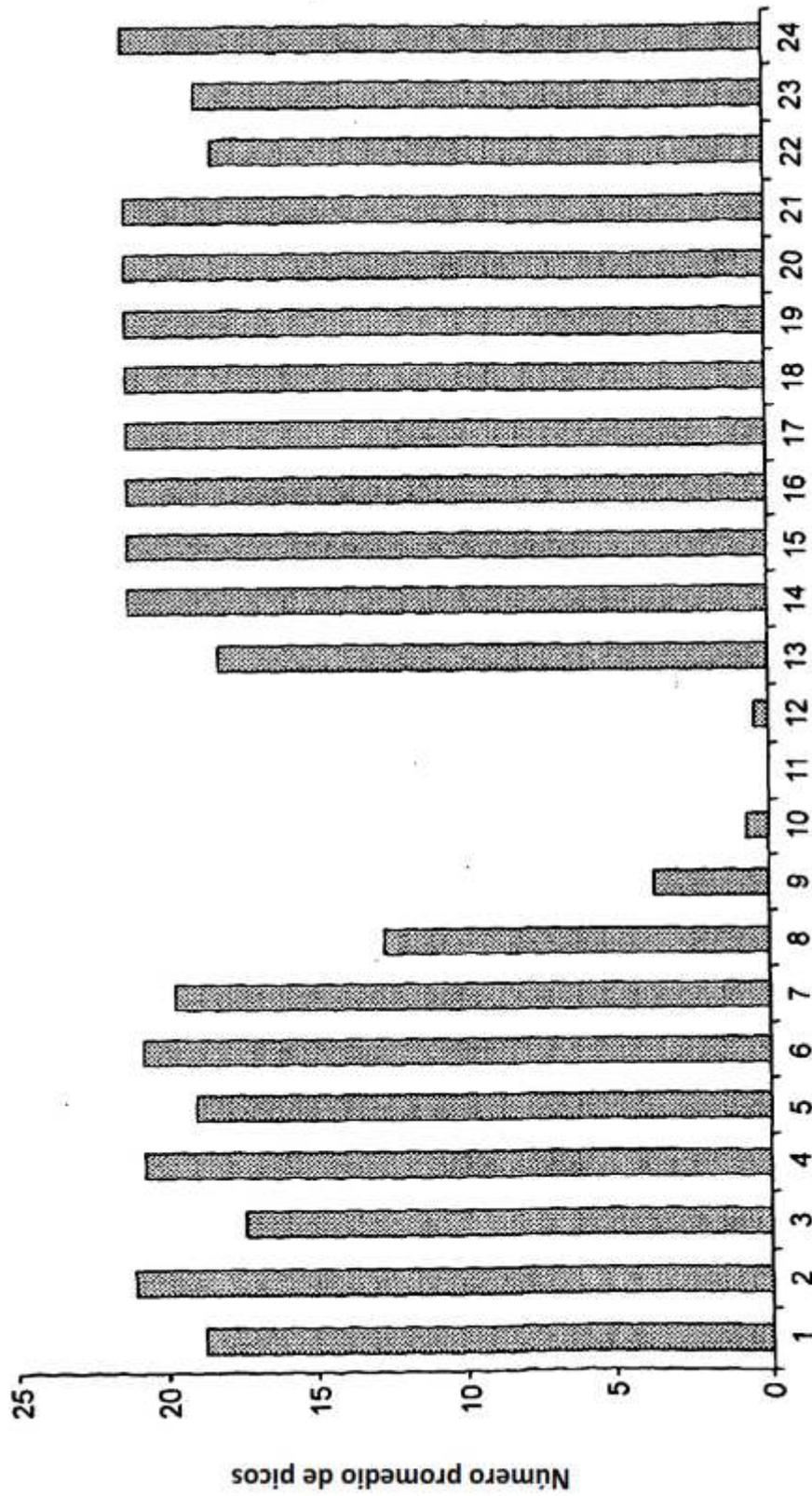


FIG. 1



Plástico
FIG. 2

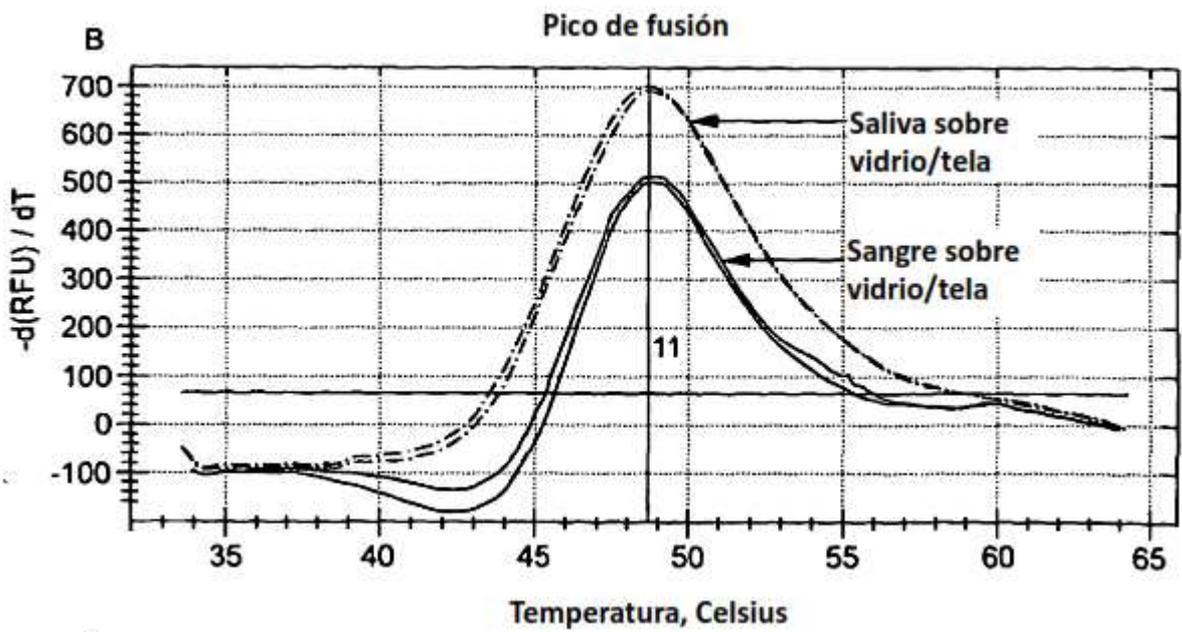
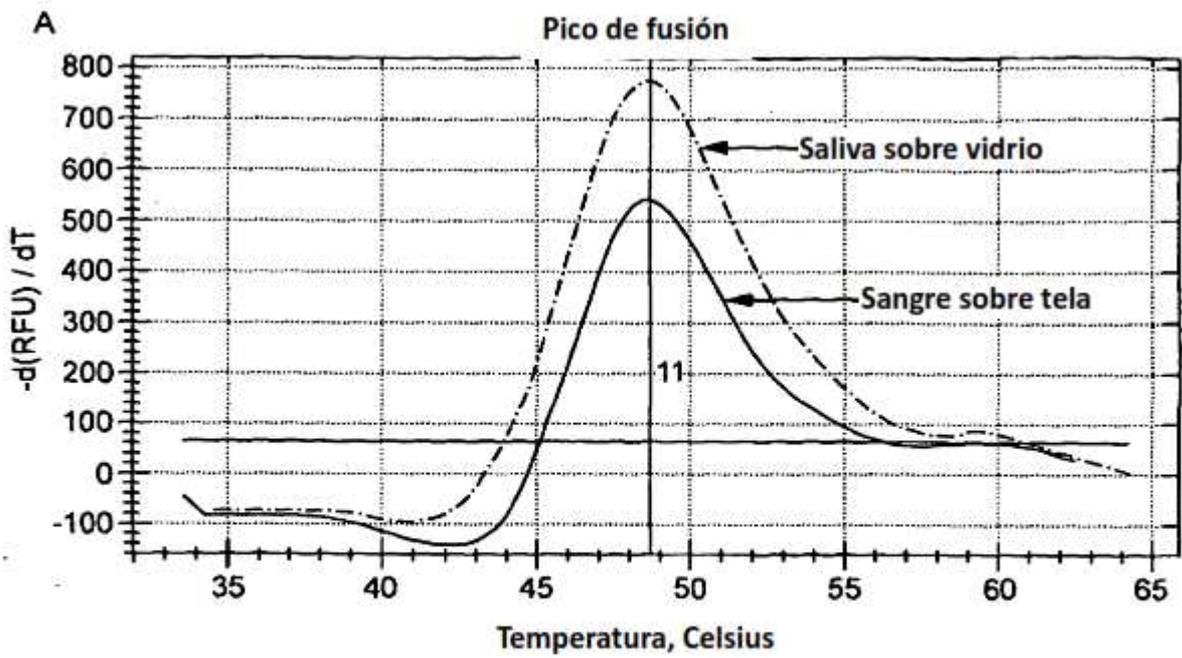


FIG. 3

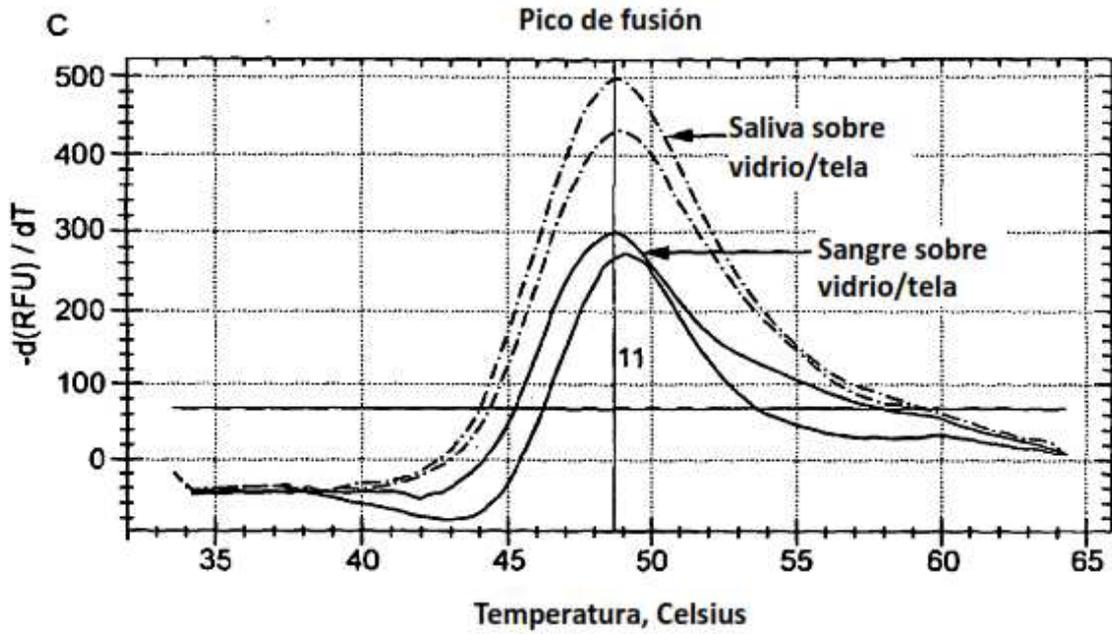


FIG. 3 Cont'd

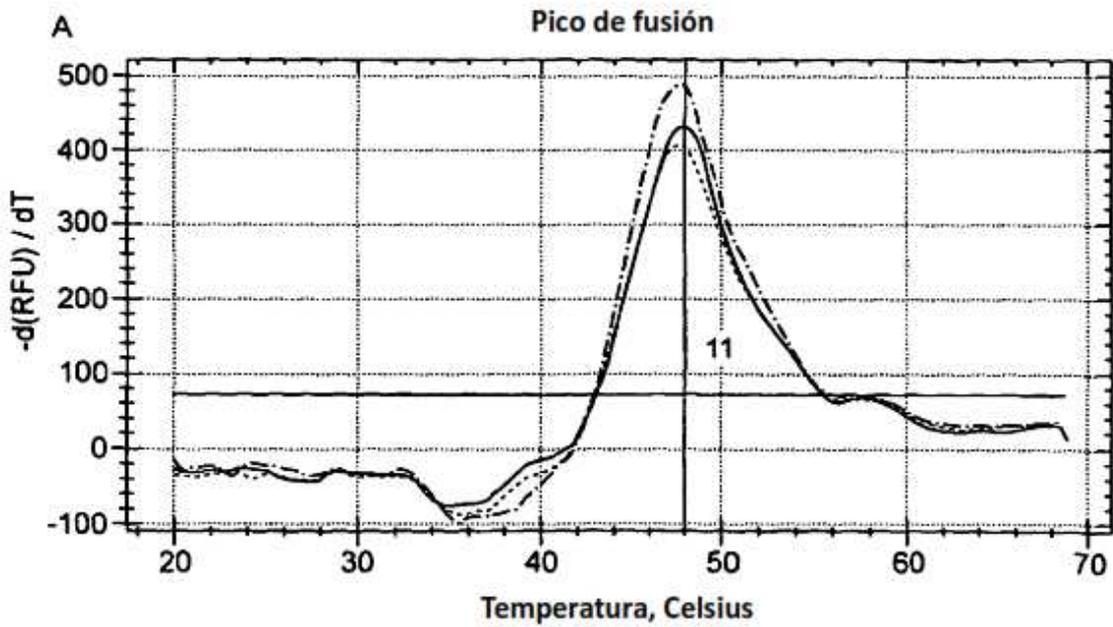


FIG. 4

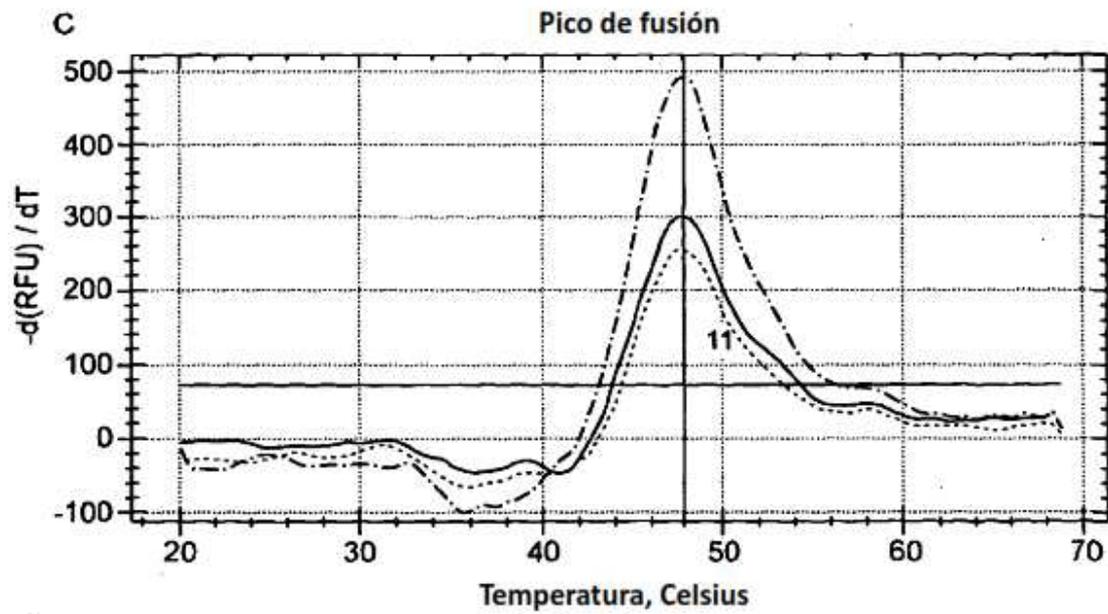
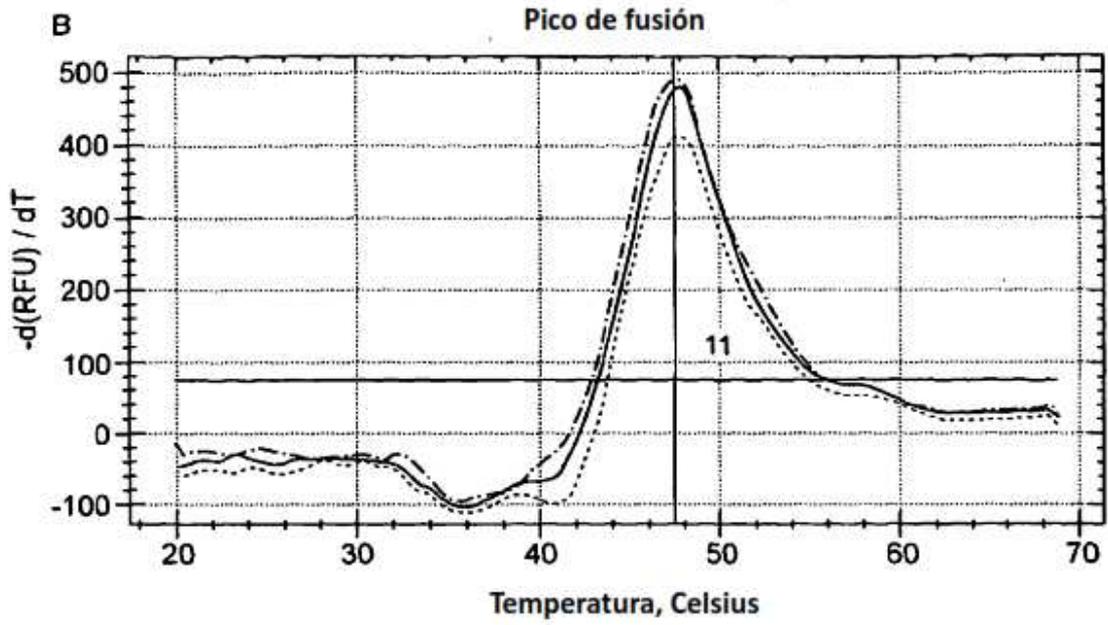


FIG. 4 Continuación

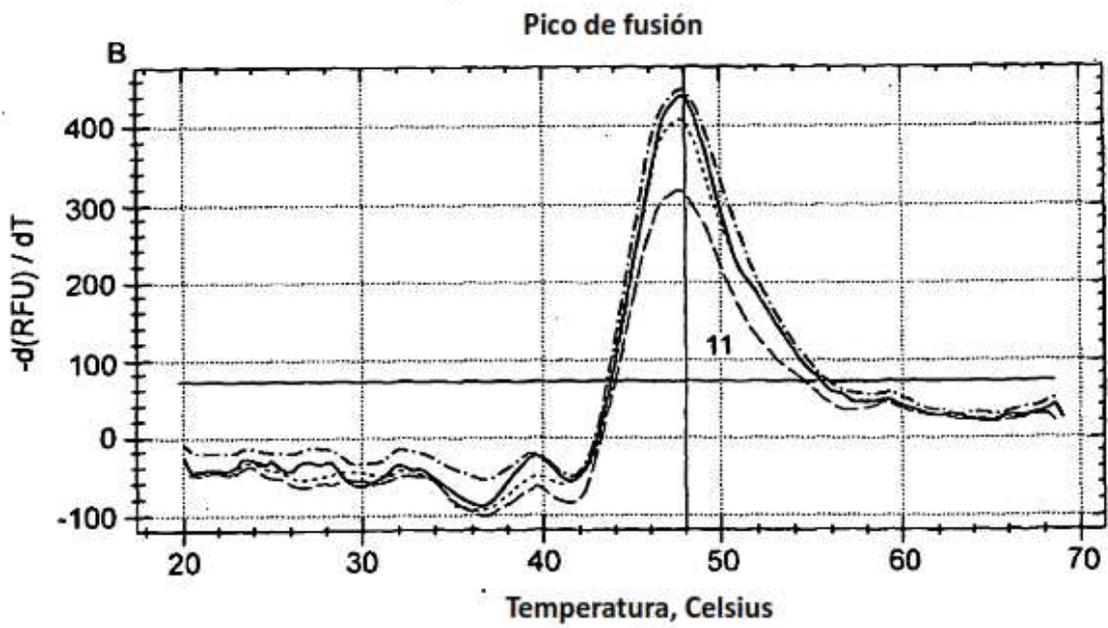
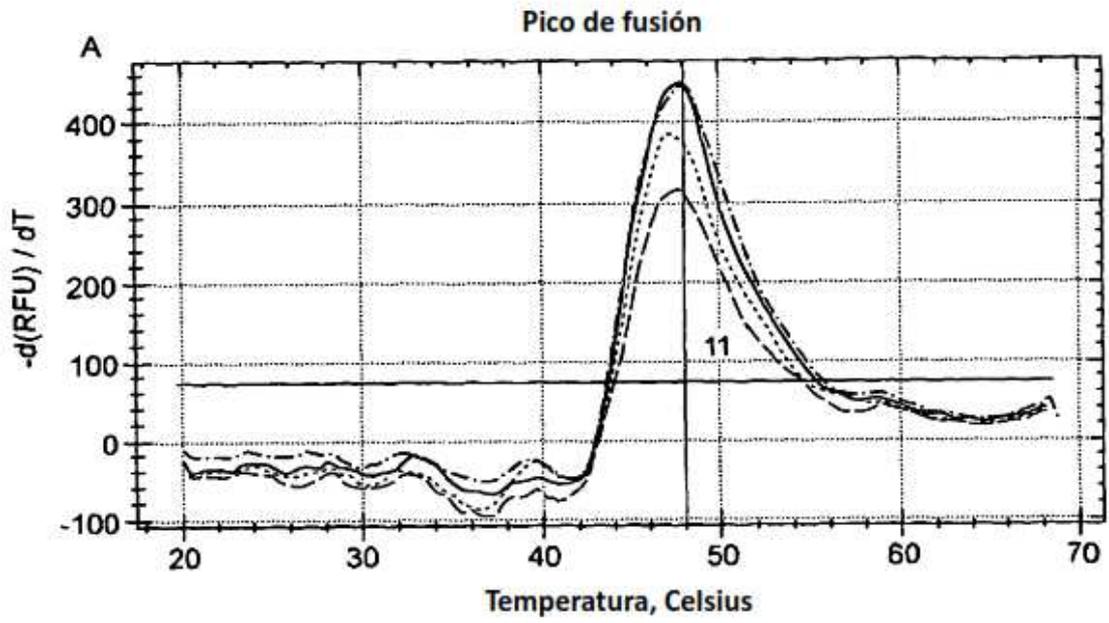


FIG. 5

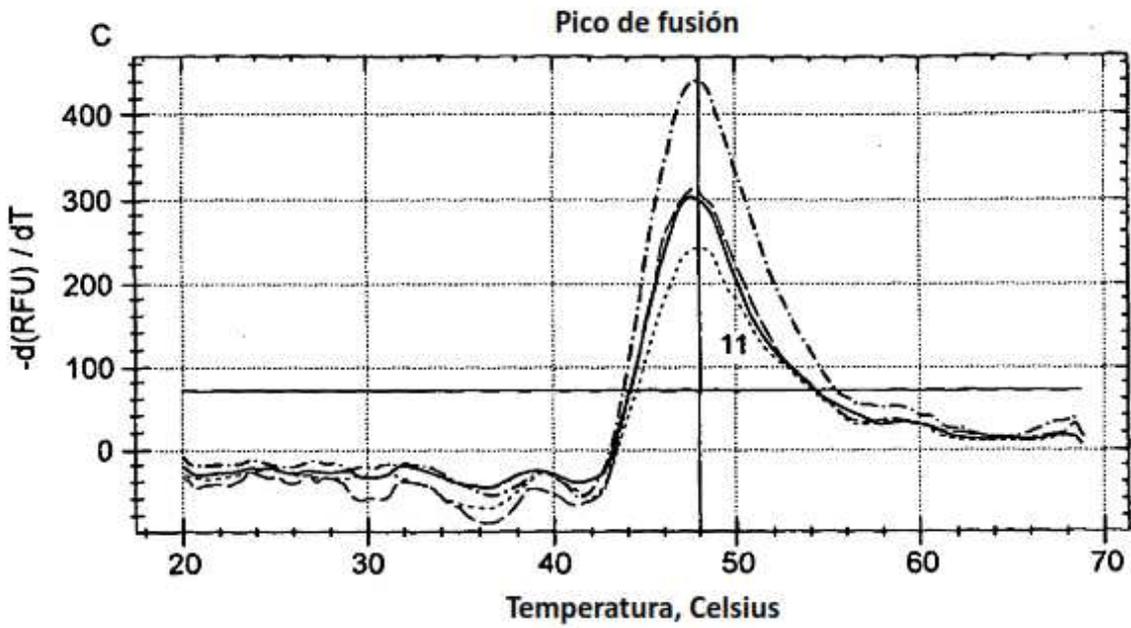


FIG. 5 Continuación

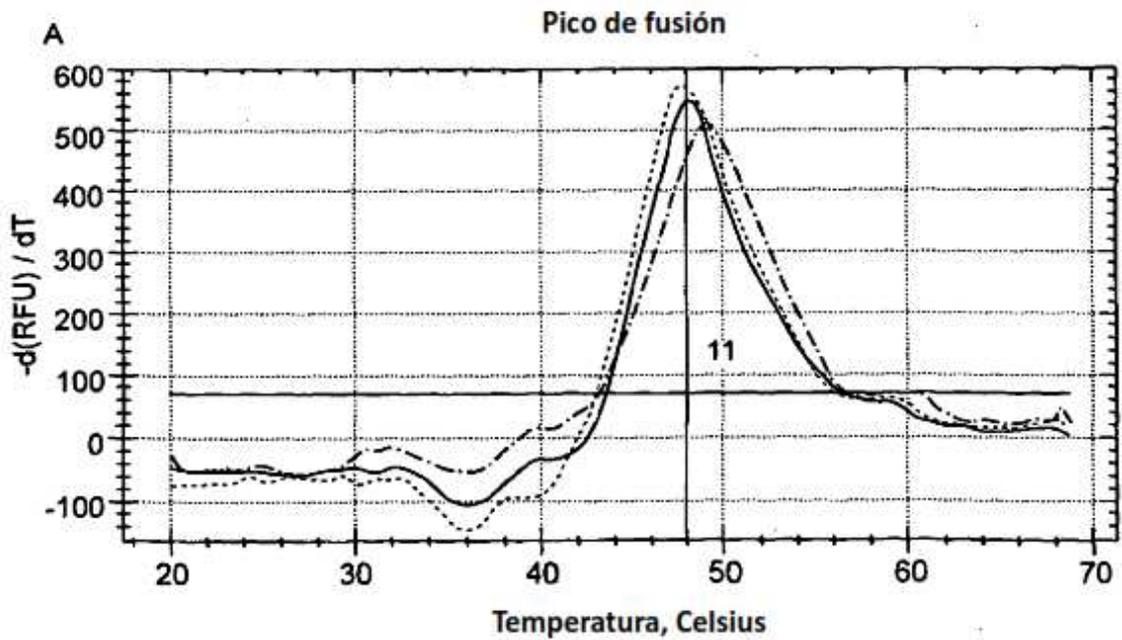


FIG. 6

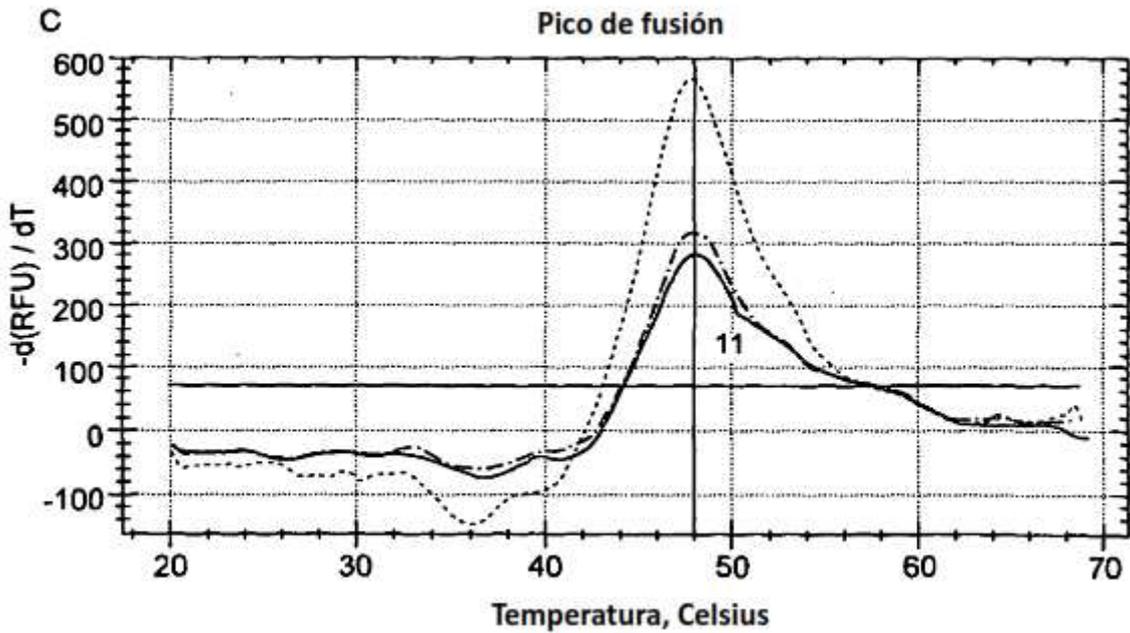
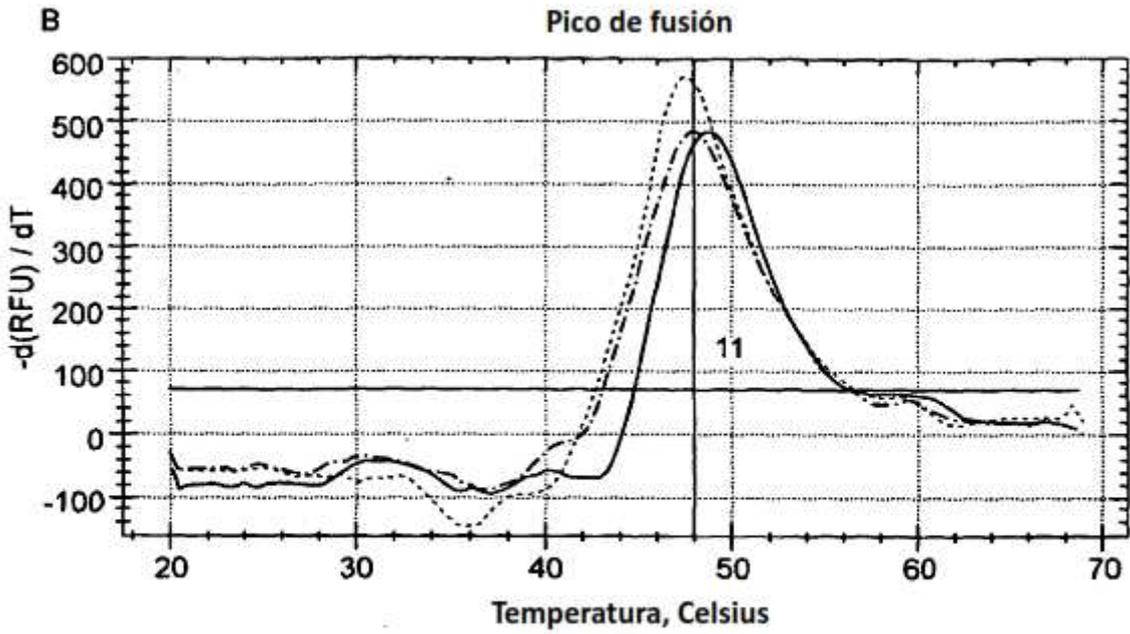


FIG. 6 Continuación

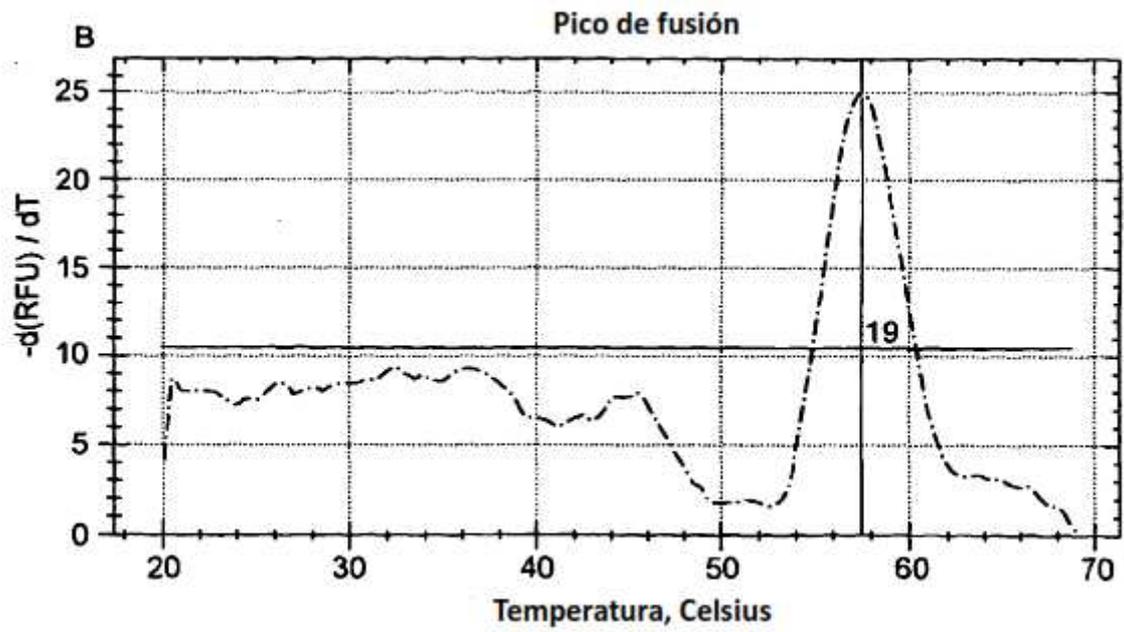
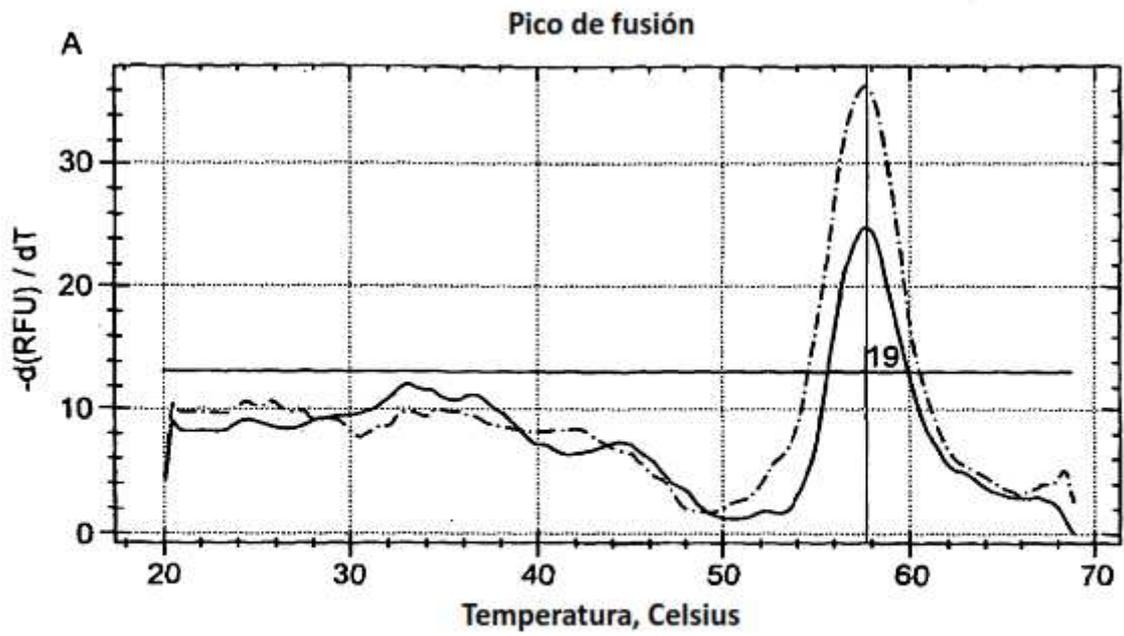


FIG. 7

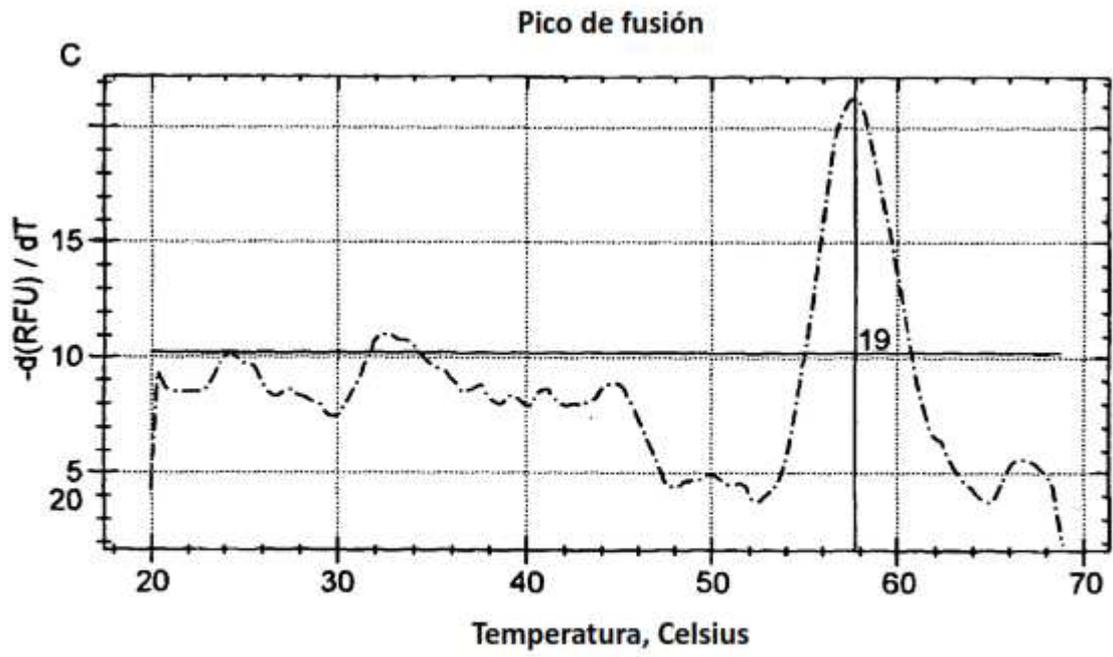


FIG. 7 Continuación

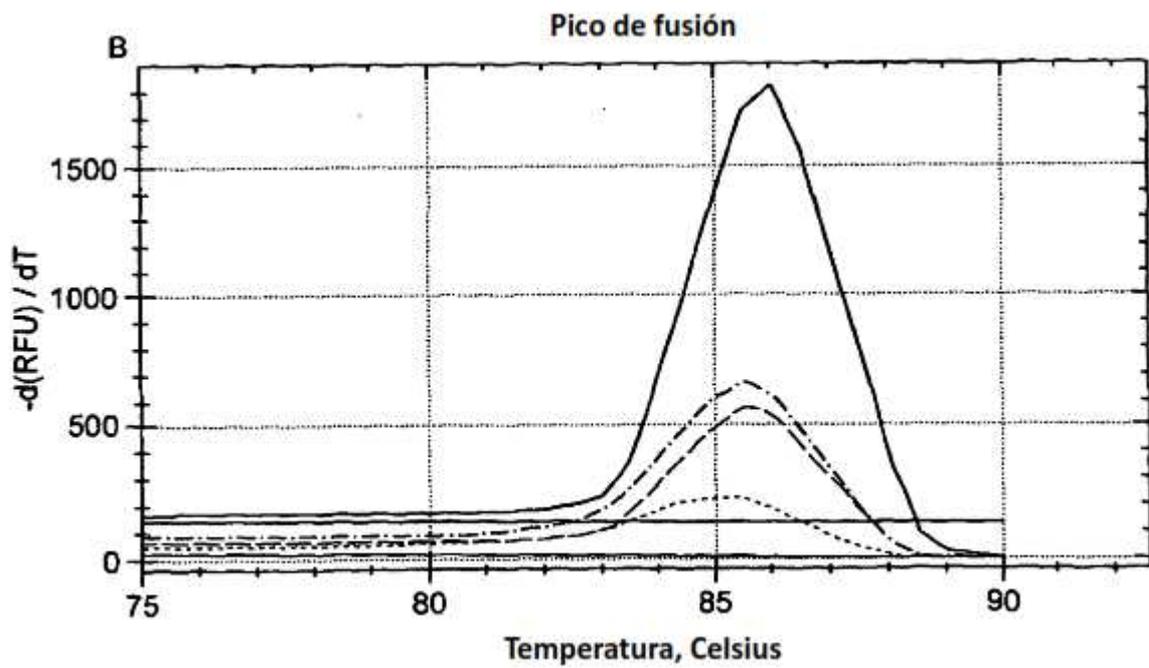
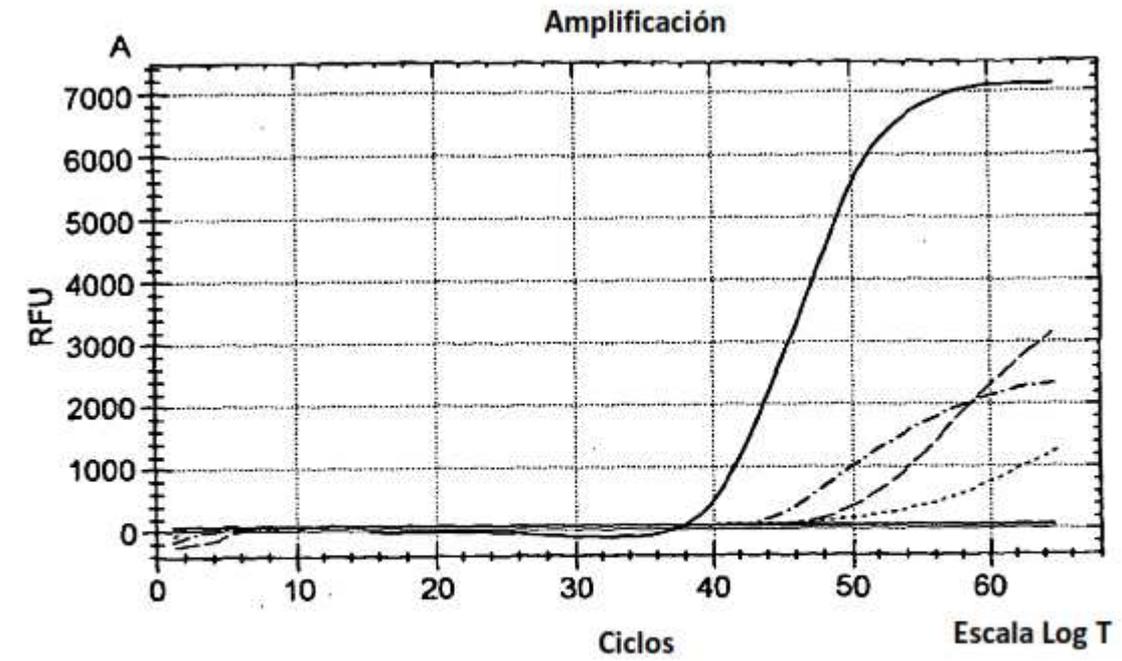


FIG. 8

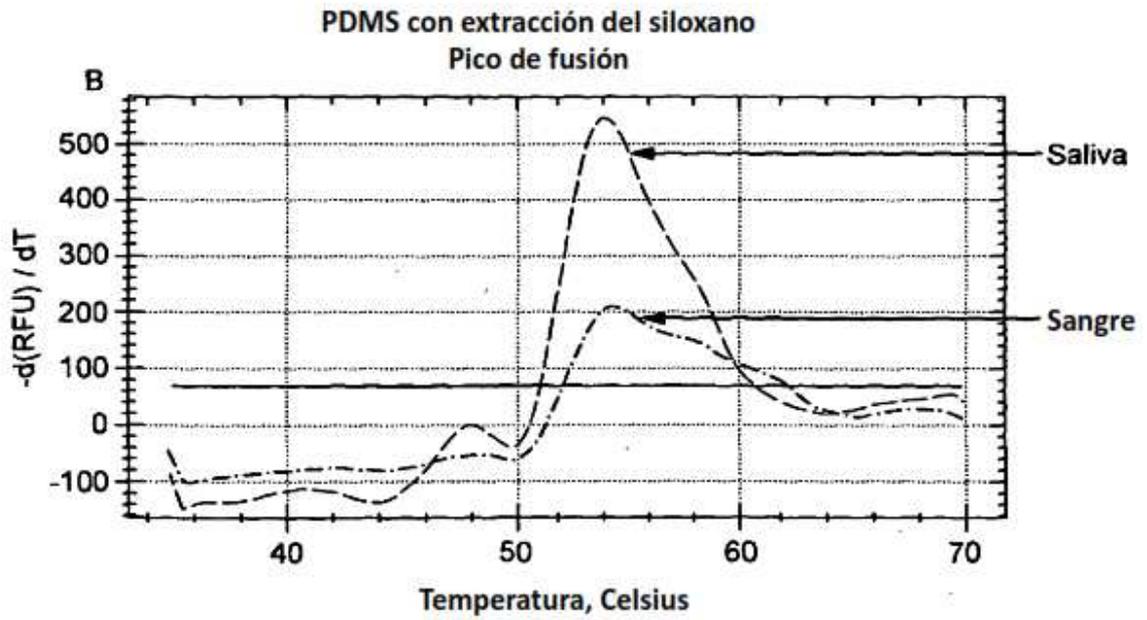
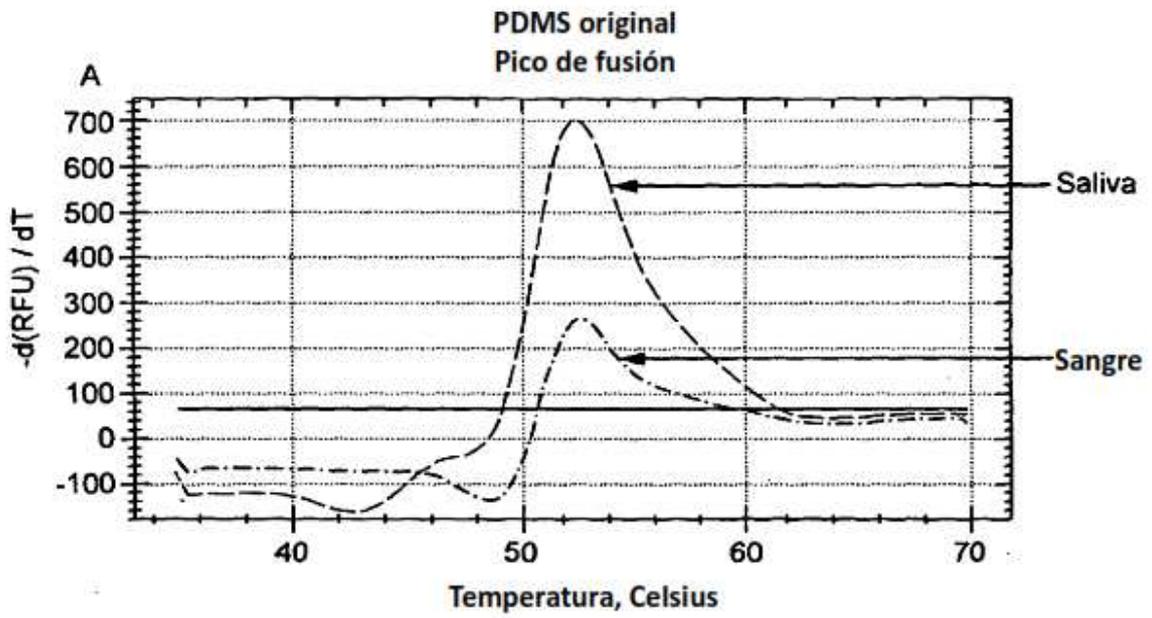


FIG. 9

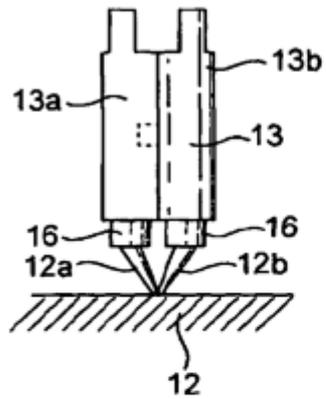


FIG. 10a

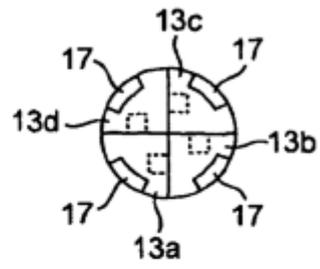


FIG. 10b

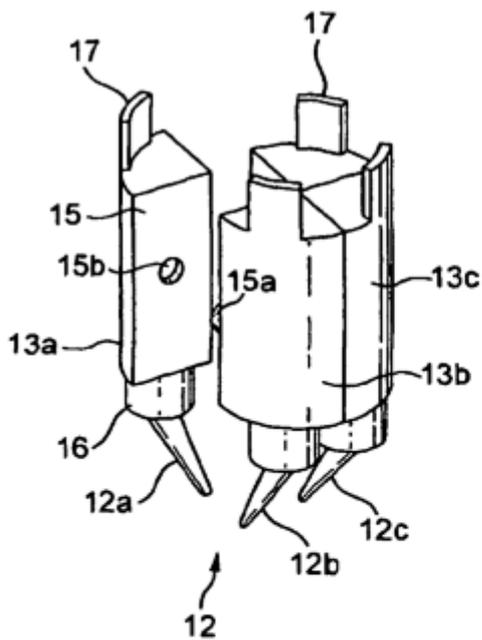


FIG. 10c

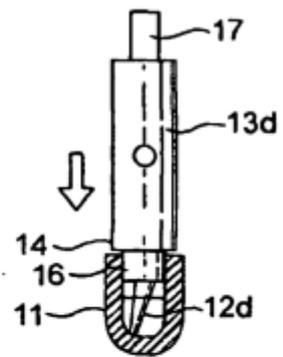


FIG. 10d

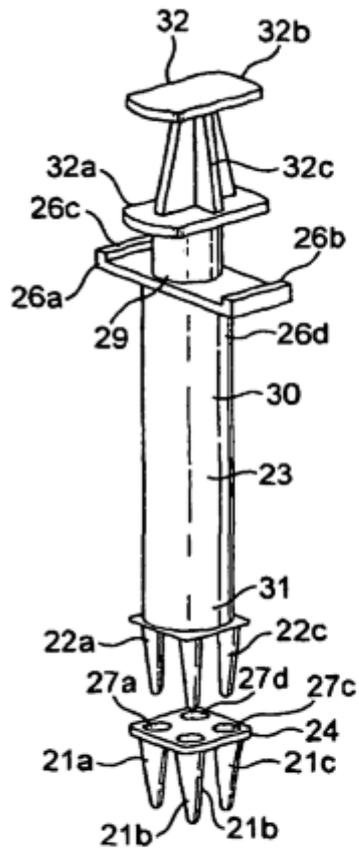


FIG. 11



FIG. 12

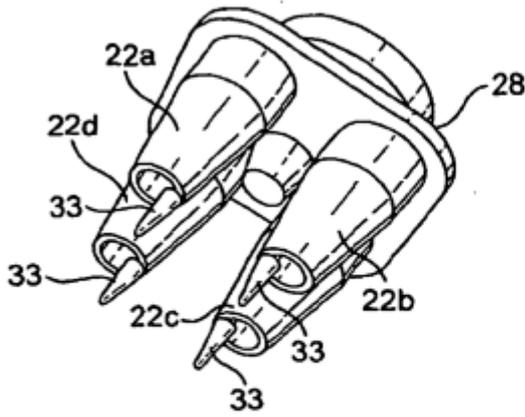


FIG. 13

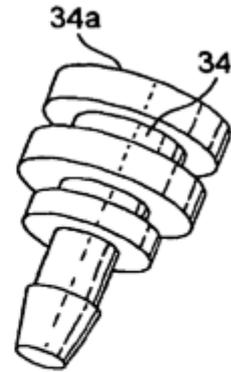


FIG. 14

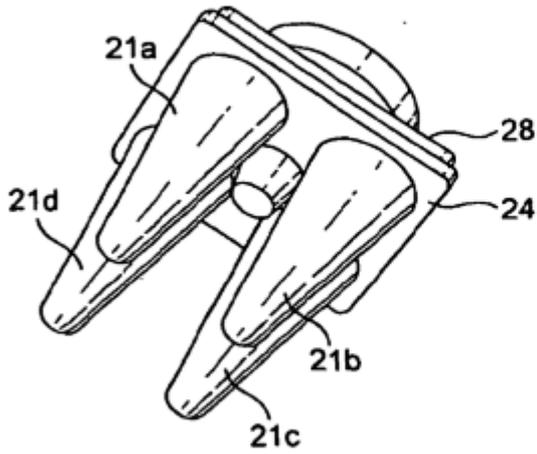


FIG. 15

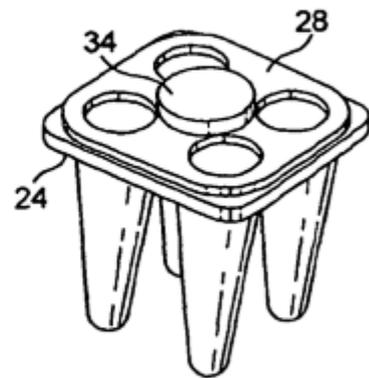
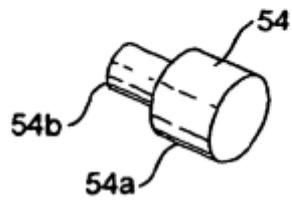
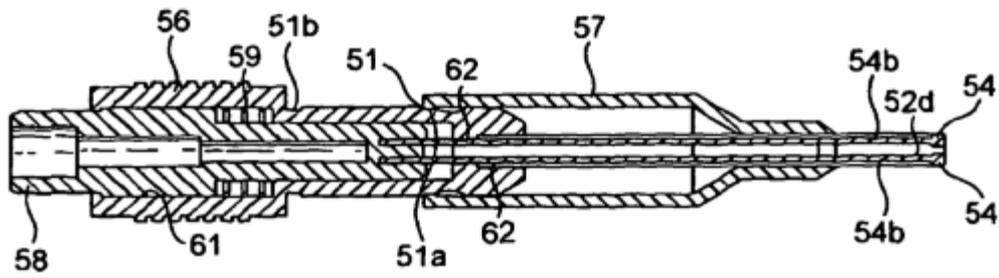
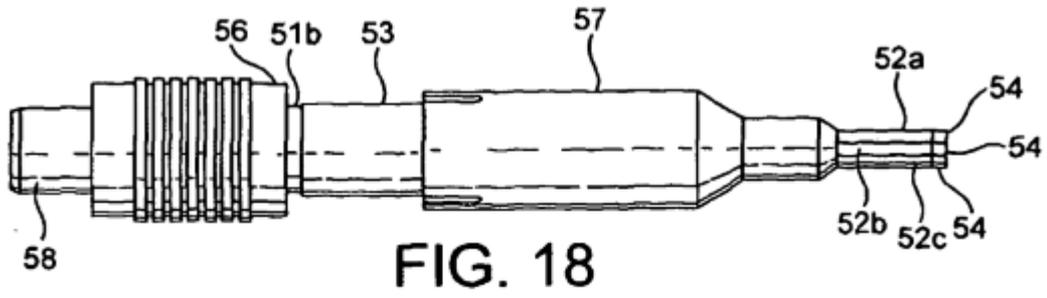


FIG. 16



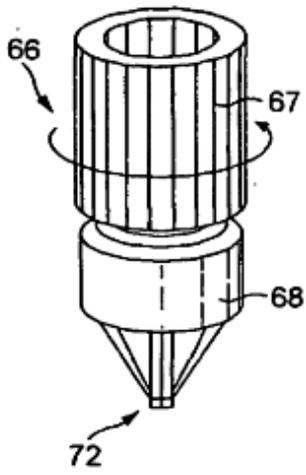


FIG. 21

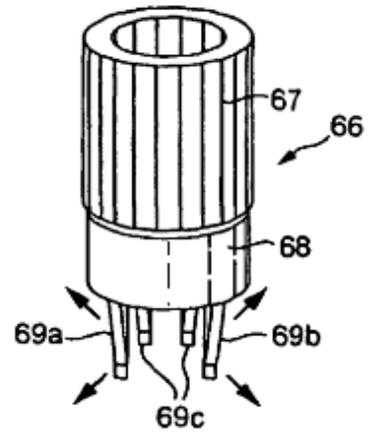


FIG. 22

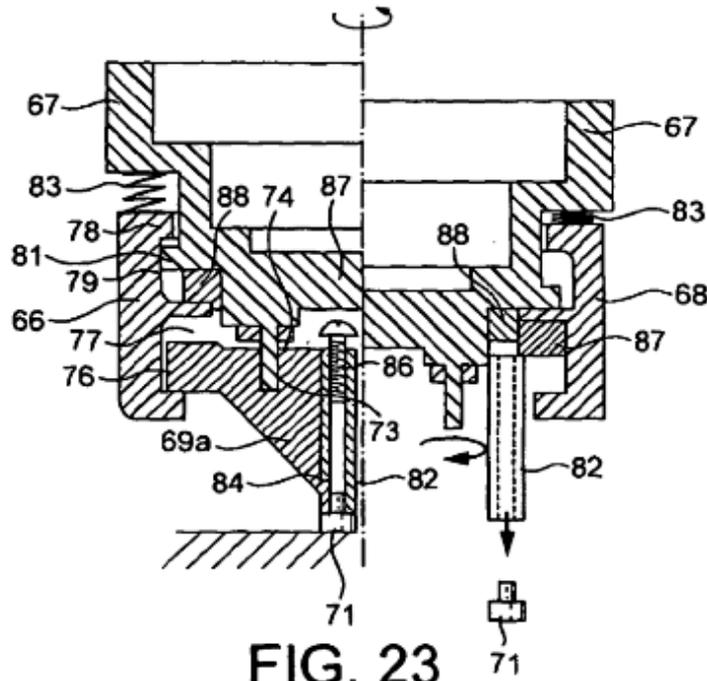


FIG. 23

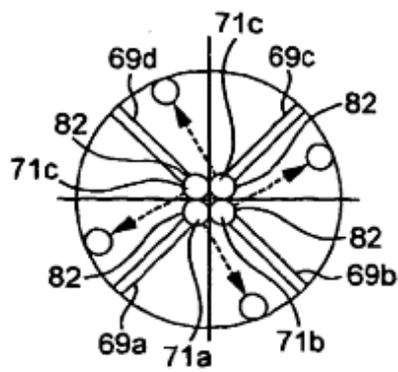


FIG. 24

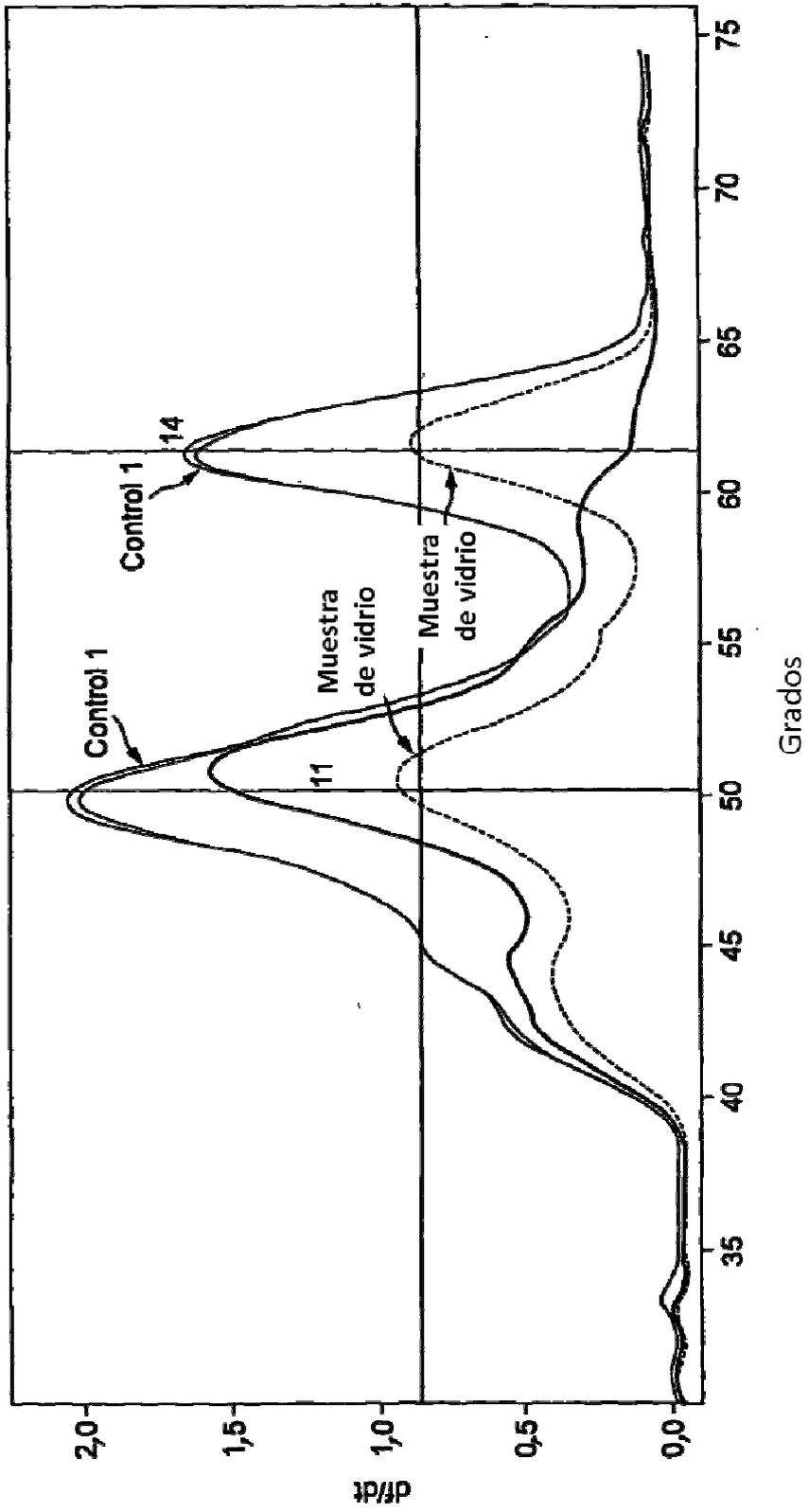
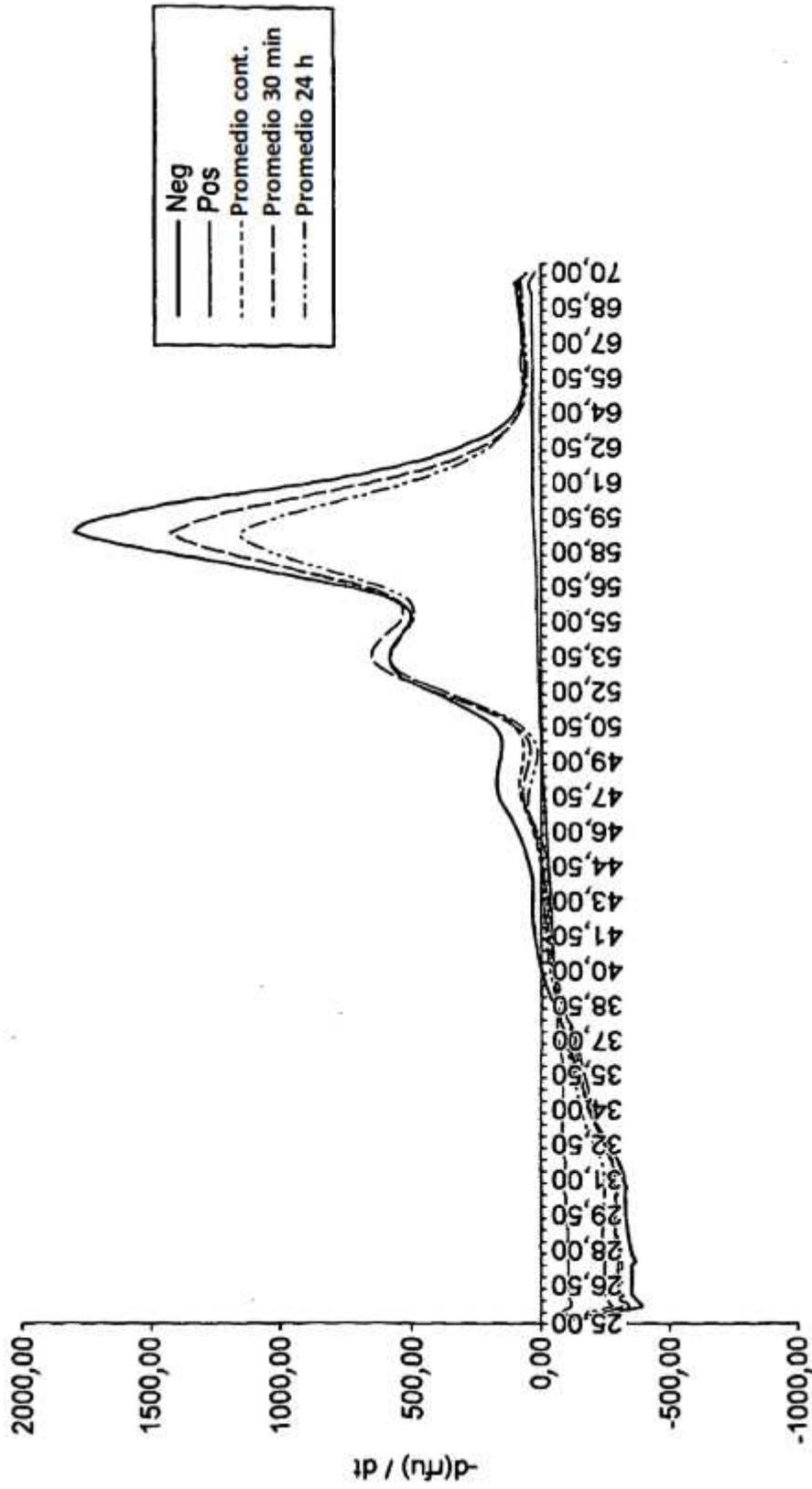


FIG. 25



Temperatura
FIG. 26

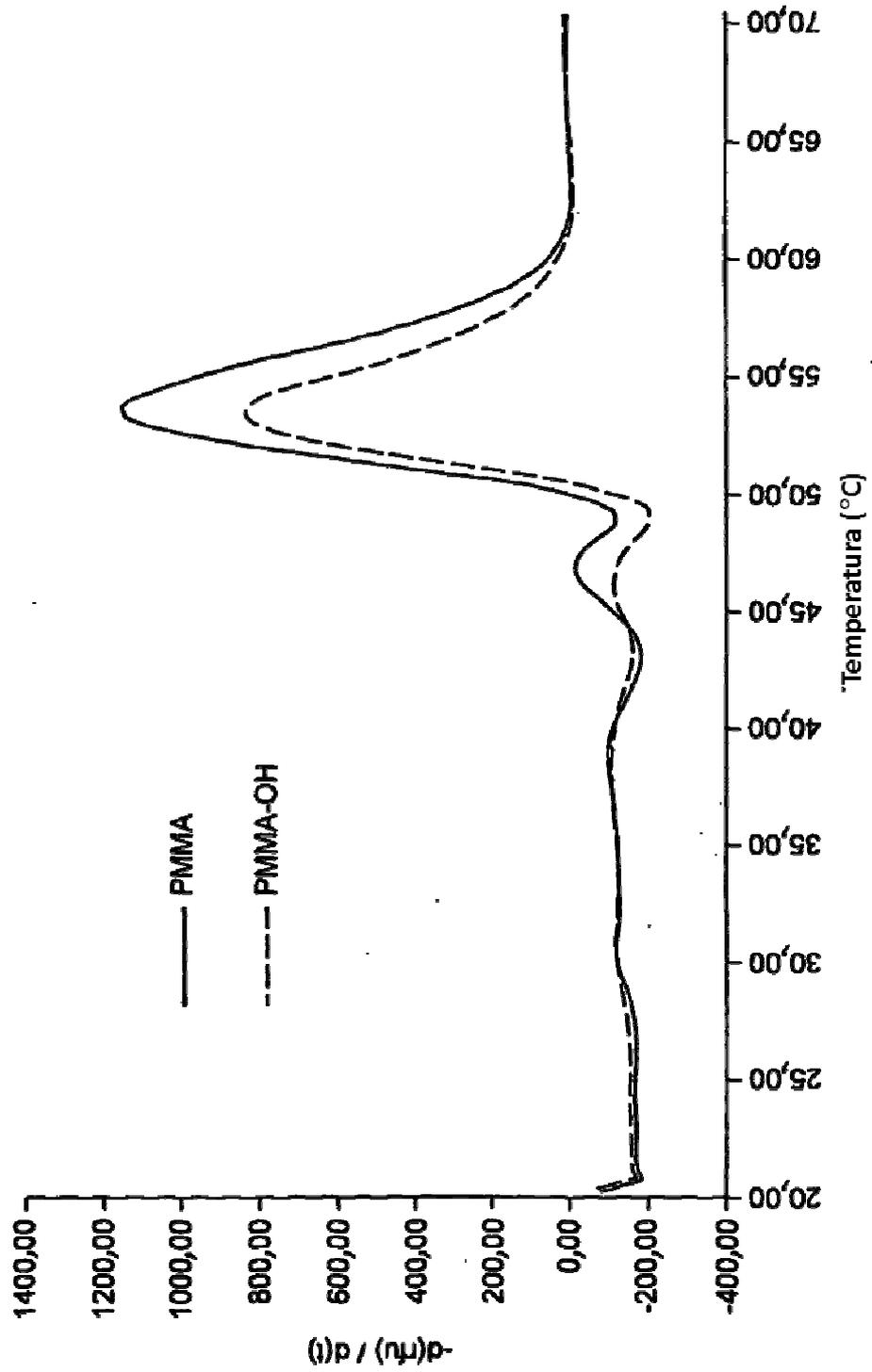


FIG. 27