

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 096**

51 Int. Cl.:

A61B 10/00 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

C12M 1/30 (2006.01)

G01N 1/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.01.2012 PCT/IB2012/050018**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.07.2012 WO12093350**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.01.2012 E 12703153 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2661229**

54 Título: **Un proceso para realizar un dispositivo de recolección y transferencia de muestras para biología molecular**

30 Prioridad:

05.01.2011 IT MI20110004

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

26.09.2017

73 Titular/es:

**COPAN ITALIA S.P.A. (100.0%)
Via Perotti, 10
25125 Brescia, IT**

72 Inventor/es:

TRIVA, DANIELE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 634 096 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

Un proceso para realizar un dispositivo de recolección y transferencia de muestras para biología molecular

5 La presente invención se refiere a un proceso para realizar un dispositivo de recolección y transferencia de muestras para biología molecular.

10 La invención se refiere también a un dispositivo de recolección y transferencia de muestras para biología molecular, que se realice usando el proceso y a un método de recolección y transferencia de muestras para biología molecular usando el dispositivo.

15 La invención puede aplicarse, por ejemplo, a la recolección y transferencia de muestras para biología molecular, tales como ADN, ARN y células que contengan ADN y ARN. La invención puede aplicarse adicionalmente a la recolección y transferencia de otros tipos de analitos o muestras biológicas o muestras de origen biológico. La técnica anterior incluye diversos tipos de dispositivo de recolección y transferencia de analitos, tales como sustancias orgánicas o biológicas, por ejemplo, para someter posteriormente las mismas a exámenes de laboratorio de tipo analítico o de diagnóstico. La técnica anterior describe especialmente el uso de dispositivos colectores convencionales, que comprenden un cuerpo de soporte alargado y una fibra alargada, generalmente de algodón, enrollada alrededor de un extremo del cuerpo, hasta definir una porción de recolección destinada a absorber internamente las muestras a recolectar.

25 Estos dispositivos presentan diversos inconvenientes, entre los que se encuentra el hecho de que las muestras biológicas tienden a quedar retenidas dentro de la porción de recolección, y por lo tanto son difíciles de extraer de la porción de recolección cuando sea necesario. Por lo tanto, la cantidad de muestra que puede recuperarse de la muestra inicialmente disponible a menudo es muy limitada, lo que da lugar a numerosos inconvenientes. Como en algunos casos la cantidad real de sustancia recolección puede ser bastante limitada en primer lugar, es de fundamental importancia poder recolectar el mayor porcentaje posible de la sustancia inicialmente recolección. Para superar este inconveniente se han proporcionado dispositivos, conocidos convencionalmente como hisopos flocados, que comprenden un cuerpo de soporte alargado y una pluralidad de fibras flocadas en un extremo del cuerpo de soporte, de modo que definan una porción de recolección para los analitos o muestras biológicas. La floculación de las fibras sobre el cuerpo puede lograrse mediante floculación en un campo magnético, y pueden adherirse al cuerpo de soporte con un pegamento apropiado o incluso sin el uso de adhesivos. Las fibras pueden disponerse de manera ordenada y sustancialmente perpendiculares al cuerpo de soporte, de manera que definan una configuración óptima para la recolección, el transporte y la liberación selectiva de las muestras recolectadas. Este tipo de dispositivo se conoce, por ejemplo, a partir de la patente EP 1608268 B1, perteneciente a los presentes solicitantes. Gracias a la disposición ordenada de las fibras en paralelo al cuerpo de soporte, estos dispositivos pueden absorber cantidades de analitos o muestras que son al menos equivalentes a los dispositivos convencionales, como los descritos anteriormente, pero presentan la gran ventaja de que permiten la liberación, de cantidades mucho mayores de analitos o muestras desde la porción recolección, en el momento apropiado, pudiendo recuperarse fácilmente hasta un 80 % o incluso más de la muestra original. Los solicitantes han observado que, aunque los dispositivos flocados anteriormente descritos pueden usarse también ventajosamente para la recolección y transferencia de muestras para biología molecular, tales como ADN, ARN y células que contengan estas muestras, las cantidades de ADN y ARN liberadas por el dispositivo y que pueden utilizarse en la práctica para realizar operaciones de biología molecular, tales como polimerización o amplificación, a veces son insatisfactorias o insuficientes, con las consecuentes dificultades en este caso a la hora de llevar a cabo los procesos sobre las muestras.

50 A partir del documento de patente US2007/0208274 se conoce adicionalmente un sistema de recolección de muestras, que incluye un vial y un bastón de recolección con un mango alargado y una almohadilla absorbente. A partir del documento de patente WO2008/131033 se conoce adicionalmente un colector, destinado en particular a ensayos de abuso de drogas, que incluye un elemento colector que recibe una muestra de fluido corporal y que puede ser una almohadilla absorbente, tratada con un tensioactivo. A partir del documento de patente WO2009/136892 se conoce adicionalmente un sistema de micromatriz, que incluye una micromatriz formada sobre una superficie plana y una cámara de incubación, formada alrededor de la micromatriz.

55 El objetivo principal de la presente invención es resolver uno o más de los problemas observados en la técnica anterior. Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método y un dispositivo de recolección y transferencia de muestras para biología molecular, que permitan extraer del dispositivo de recolección una mayor cantidad de muestras para biología molecular, a utilizar en operaciones de biología molecular, con respecto a los dispositivos conocidos. Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un método y un dispositivo de recolección y transferencia de muestras para biología molecular, que permitan extraer del dispositivo de recolección el mayor porcentaje posible de ADN o ARN recolectado inicialmente por el dispositivo, de la mejor forma y en las mejores condiciones para todos los usos posteriores. Un objetivo adicional de la invención es proporcionar un método y un dispositivo de recolección y transferencia de muestras para biología molecular, que permita conservar eficazmente la integridad de las muestras de ADN o ARN recolectadas con el dispositivo. Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un método y un dispositivo de recolección y transferencia de muestras para

biología molecular, que permitan reducir el número de ciclos necesarios para realizar las reacciones de polimerización o las reacciones en cadena de la polimerasa, sobre las muestras de ADN o ARN liberadas por el dispositivo. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método y un dispositivo de recolección y transferencia de muestras para biología molecular, que sean sencillos y económicas de realizar. Estos objetivos y otros objetivos adicionales, que se deducirán de manera más plena a partir de la siguiente descripción, se consiguen sustancialmente mediante un método y un dispositivo de recolección y transferencia de muestras para biología molecular, y mediante un proceso de realización de un dispositivo de recolección y transferencia de muestras para biología molecular, de acuerdo con lo expuesto en una o más de las reivindicaciones adjuntas, por sí solas o combinadas, o en cualquier combinación con uno o más de los aspectos adicionales descritos más adelante en el presente documento. En un aspecto adicional, la invención se refiere además a un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de proceso adjuntas, o con los aspectos adicionales indicados en el presente documento, que comprende adicionalmente al menos una etapa de producción del cuerpo de soporte del dispositivo, que tenga al menos la primera porción, y la etapa de aplicación de la pluralidad de fibras sobre la primera porción, por floculación.

En un aspecto adicional, la invención se refiere además a un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de proceso adjuntas, o con los aspectos adicionales indicados en el presente documento, en los que el tensioactivo sea cloruro catiónico o de benzalconio (BAC, o cloruro de alquildimetilbenzilamonio, o ADBAC), y en los que las fibras estén fabricadas con nailon. En un aspecto adicional, la invención se refiere adicionalmente a un dispositivo de recolección y transferencia de muestras para biología molecular, realizado con un proceso de realización de un dispositivo de recolección y transferencia de muestras para biología molecular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones adjuntas. En un aspecto adicional, la invención se refiere además a un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de método adjuntas, o con los aspectos adicionales indicados en el presente documento, en los que una etapa de predisposición de la solución comprende etapas en las que se predispone una cantidad predeterminada de tensioactivos, preferentemente catiónicos; se disuelve la cantidad predeterminada de tensioactivos en agua, con el fin de obtener la solución, y/o una etapa en la que se forma la solución de manera que sea sustancialmente homogénea. En un aspecto adicional, la invención se refiere además a un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de método adjuntas, o a los aspectos adicionales indicados en el presente documento, que comprende además una etapa en la que se seca al menos la porción de recolección que proporciona la muestra y/o que comprende adicionalmente etapas en las que se inserta la porción de recolección en un recipiente hermético, durante la etapa de secado o independientemente de la etapa de secado. En un aspecto adicional, la invención se refiere además a un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de método adjuntas, o con los aspectos adicionales indicados en el presente documento, que comprende adicionalmente una etapa de liberación de al menos el 80 % de la muestra recolección desde la porción de recolección, o al menos el 86 %, o al menos el 90 %, o al menos el 95 %, por ejemplo, por dilución en un medio líquido, suspensión en un tampón o en una solución tampón. En un aspecto preferido adicional de la misma, la invención se refiere además al uso de un tensioactivo o un tensioactivo catiónico para pretratar las fibras aplicadas, o a aplicar por floculación, sobre un cuerpo de soporte de un dispositivo de recolección y transferencia de muestras para biología molecular, con el fin de aumentar la cantidad de ADN o ARN que podrá liberarse desde el dispositivo de recolección, y que podrá utilizarse en operaciones de biología molecular, con respecto a una cantidad que podrá liberarse y utilizarse en operaciones de biología molecular obtenida a partir de fibras del dispositivo que no se hayan tratado previamente. En un aspecto preferido adicional de la misma, la invención se refiere además al uso de un tensioactivo catiónico, en particular cloruro de benzalconio, para pretratar fibras de nailon aplicadas, o a aplicar por floculación, sobre un cuerpo de soporte de un dispositivo de recolección y transferencia de muestras para biología molecular, con el fin de aumentar el porcentaje de ADN o ARN que podrá utilizarse en operaciones de biología molecular, con respecto a la cantidad que podrá liberarse desde el dispositivo de recolección y transferencia. En un aspecto adicional, la invención se refiere además al uso de un tensioactivo catiónico para producir fibras a aplicar por floculación sobre un cuerpo de soporte de un dispositivo de recolección y transferencia de muestras para biología molecular, en el que el tensioactivo catiónico se añade a materiales con los que se realizan las fibras durante la producción de las mismas. A continuación, se proporciona una descripción detallada, a modo de ejemplo no limitativo, de una o más realizaciones preferidas de la invención, con ayuda de las figuras de los dibujos, en las que:

- la figura 1 es una vista lateral de un dispositivo de acuerdo con una realización del presente ejemplo;
- la figura 2 es una vista de un detalle del dispositivo de la figura 1, relativa a una porción de recolección;
- la figura 3 es un recipiente de acuerdo con una realización de la presente invención.

A continuación, se ofrece una descripción de un dispositivo 1 de recolección y transferencia de muestras para biología molecular, de acuerdo con una o más realizaciones de la invención. En el presente texto, el término "biología molecular" pretende referirse a técnicas que permitan la detección, análisis, manipulación, amplificación (PCR) y copia (clonación) de ácidos nucleicos (ADN y ARN).

La expresión "ADN o ARN que puede/podrá utilizarse para operaciones de biología molecular" quiere decir que el ADN o ARN será integral, no estará dañado o será inutilizable y que, en cualquier caso, estará en condiciones suficientemente buenas para la realización de diversas operaciones de biología molecular, por ejemplo, reacciones de polimerización. Con referencia a las figuras adjuntas de los dibujos, 1 denota en su totalidad un dispositivo de

recolección y transferencia de muestras para biología molecular. El dispositivo 1 comprende un cuerpo de soporte 2, que puede tener una conformación alargada y/o una conformación sustancialmente de tipo barra. El cuerpo de soporte 2 puede tener cualquier sección, incluyendo una que varíe a lo largo de su extensión longitudinal. El cuerpo de soporte está provisto de una primera porción 2a, por ejemplo, una porción terminal, que defina una porción de recolección 3 de muestras, una segunda porción central 2b, sustancialmente en forma de varilla, y una tercera porción terminal 2c, que un operario puede agarrar manualmente o que puede conectarse a un elemento 4 de agarre adicional, tal como una tapa 5 para tubos de ensayo o similares.

La porción de recolección 3 de muestras puede estar conformada como un hisopo. La porción de recolección 3 está flocada, lo cual se logra mediante la floculación de una pluralidad de fibras 6 sobre el primer extremo 2a del cuerpo. Las fibras 6 flocadas sobre el primer extremo pueden estar fabricadas con un material hidrófilo o no hidrófilo, pero la porción de recolección 3 será hidrófila, en cualquier caso, debido al efecto capilar gracias a las características de las fibras 6 y la distribución de las mismas sobre el cuerpo de soporte 2. Las fibras flocadas 6 están preferentemente fabricadas con nailon. En otras palabras, la porción de recolección 3 puede presentar una capa continua de fibras 6, fabricadas con un material sustancialmente adsorbente o no adsorbente, para con la muestra, pero conformada con una pluralidad ordenada de intersticios capilares 9 en los que pueda retenerse por imbibición una cantidad predeterminada de la muestra, por ejemplo una muestra líquida, y desde los cuales pueda liberarse cuantitativamente la muestra en el momento apropiado, por ejemplo frotando la porción de recolección 3 sobre una superficie de liberación especial. En la patente EP1.608.268, de los presentes solicitantes, se ilustra un ejemplo de este tipo de hisopo flocado. Como se describe en la patente mencionada anteriormente, la deposición por floculación produce, en el extremo implicado del dispositivo 1 de recolección, una capa continua y homogénea de una pluralidad de fibras 6 que presentan una disposición ordenada, sustancialmente perpendiculares en cada punto de la primera porción 2a del cuerpo de soporte 2, y cada una de las cuales es sustancialmente paralela a las fibras 6 adyacentes. Entre las fibras 6 está definida una correspondiente pluralidad ordenada de intersticios capilares 9, y entre los mismos se recoge una cantidad predeterminada de la muestra a recolectar y retener, posiblemente por imbibición debido al efecto capilar. La capa flocada puede liberar después la muestra recolección, de manera efectiva, por ejemplo, al frotarla sobre una superficie especial o por dilución de la muestra en un diluyente apropiado. La porción de recolección 3 flocada puede estar configurada y dimensionada de modo que recoja una cantidad apropiada de muestra, o para que recoja una cantidad de muestra comprendida entre 5 y 1000 microlitros, entre 10 microlitros y 500 microlitros, entre 50 y 200 microlitros, o entre 80 y 120 microlitros, por ejemplo. Las fibras 6 pueden estar dispuestas sobre el cuerpo de soporte 2 de manera sustancialmente ordenada, y de tal manera que formen una capa sustancialmente continua sobre la porción de recolección 3 y/o que puedan disponerse sobre la porción de recolección 3 de tal manera que definan una pluralidad de intersticios capilares 9, destinados a absorber la muestra líquida por acción capilar. Las fibras 6 pueden presentar un recuento de hilos comprendido entre 1 y 10 Dtex, o preferentemente entre 1,7 y 3,3 Dtex, y/o las fibras 6 pueden presentar una longitud comprendida entre 0,6 y 3 mm. Las fibras 6 pueden disponerse por floculación de las mismas sobre la porción de recolección 3 del cuerpo de soporte 2, con una densidad superficial comprendida por ejemplo entre 50 y 500 fibras por mm^2 , o entre 100 y 200 fibras por mm^2 de la superficie de la primera porción 2a del cuerpo de soporte 2. La capa de fibras puede definir una capacidad de absorbancia de al menos $0,5 \mu\text{l}$ por mm^2 , o de al menos $0,6 \mu\text{l}$ por mm^2 , o de al menos $0,7 \mu\text{l}$ por mm^2 , o de al menos $0,75 \mu\text{l}$ por mm^2 de la superficie del cuerpo de soporte 2, por ejemplo. Las fibras 6 pueden estar fabricadas con un material sustancialmente no hidrófilo o no adsorbente con respecto a la muestra, y/o con un material sustancialmente hidrófilo o adsorbente con respecto a la muestra, y/o con un material seleccionado entre: poliamida, nailon, rayón, poliéster, fibra de carbono, alginato, fibra natural, o una mezcla de los materiales citados. Las fibras están preferentemente fabricadas con nailon. El cuerpo de soporte 2 puede presentar una extensión longitudinal comprendida entre 2 cm y 20 cm, o entre 3 cm y 18 cm, o entre 6 cm y 16 cm, y/o un espesor o un diámetro de una sección perpendicular al eje central de la misma que esté comprendido entre 0,5 mm y 5 mm, o entre 1 mm y 3 mm, o entre 1,5 y 2,5 mm. La porción de recolección 3 puede presentar una extensión longitudinal comprendida entre 8 cm y 0,5 cm o entre 5 cm y 1 cm y/o un diámetro o espesor, incluyendo las fibras 6, entre 10 mm y 1 mm o entre 8 mm y 2 mm o entre 5 mm y 2,5 mm. La porción de recolección 3 puede presentar cualquier forma adecuada para el tipo de muestra a recolectar, o adecuada para el asiento de recolección, por ejemplo, redondeada o con uno o más bordes afilados. El cuerpo de soporte 2 puede estar provisto de una porción central debilitada, destinada a facilitar la rotura selectiva del propio cuerpo por un punto intermedio entre el primer extremo y el segundo extremo, para facilitar por ejemplo la inserción de la porción de recolección 3 en un recipiente 7 para su transporte. El dispositivo 1 de recolección puede comprender una pluralidad de cuerpos de soporte 2, cada uno provisto de una porción de recolección 3 que tenga esté conformada o tenga una forma diferente y específicamente configurada para recolectar una muestra en un asiento específico, o para recolectar una cantidad específica de muestra. En la presente invención, las fibras 6 se tratan con un tensioactivo previamente a su uso para recolectar la muestra y, por ejemplo, durante la etapa de producción del dispositivo 1. El tensioactivo puede ser catiónico, aniónico, no iónico, o anfótero. En la presente invención, el tensioactivo es preferentemente catiónico. En la invención, el uso de un tensioactivo catiónico, por ejemplo y en particular cloruro de benzalconio, permite alcanzar los objetivos anteriormente descritos de manera sorprendentemente y particularmente significativa. En la invención, el uso de un tensioactivo catiónico, por ejemplo y en particular cloruro de benzalconio, permite alcanzar los objetivos anteriormente descritos de manera sorprendentemente y particularmente significativa si se usa con fibras de nailon. En la invención, el tensioactivo catiónico es preferentemente cloruro de benzalconio (BAC, o cloruro de alquildimetilbencilamonio, o ADBAC). El tensioactivo catiónico puede ser una sal que tenga una parte positiva, constituida por al menos una cadena de átomos de carbono con un grupo de amonio cuaternario, y/o puede ser una

sal de amonio cuaternario o puede comprender una mezcla de sales de amonio. El tensioactivo catiónico puede ser una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio, en la que el grupo alquilo varíe de octilo (C₈H₁₇-) a octadecilo (C₁₈H₃₇-). En una realización alternativa, el tensioactivo catiónico podría ser bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB, o bromuro de hexadeciltrimetilamonio). En realizaciones alternativas adicionales, el tensioactivo catiónico puede ser, por ejemplo, cloruro de bencetonio, cloruro de cetalconio, bromuro de laurtrimonio, bromuro de miristrimetilamonio, cetrimida, bromuro de cetrimonio, cloruro de cetilpiridinio o cloruro de estearalconio. El dispositivo 1 de recolección puede comprender adicionalmente un recipiente 7 para el transporte de la muestra, que tenga un asiento interno 10 de contención y una abertura 11 de acceso. El recipiente 7 puede ser un tubo de ensayo, para el transporte de muestras de material biológico o de origen biológico. El dispositivo 1 de recolección puede comprender adicionalmente una tapa 5 de cierre, que puede montarse de forma desmontable en la abertura de acceso para cerrar selectivamente el recipiente 7. El dispositivo 1 de recolección puede comprender adicionalmente al menos un elemento de secado o de deshumidificación, por ejemplo, una bolsa que contenga gel de silicio, alojada en el recipiente 7 o en otra posición útil. El recipiente 7 y/o el tapón 5 de cierre y/o el cuerpo de soporte 2 pueden estar fabricadas con un material plástico, por ejemplo, poliestirol, o poliestireno o polipropileno, y/o con un material adecuado para su uso con la muestra específica a recolectar, adecuado o en general para su uso con materiales biológicos o materiales de origen biológico. El recipiente 7 y/o el tapón 5 de cierre y/o el cuerpo de soporte 2 pueden esterilizarse. El dispositivo 1 de recolección puede comprender adicionalmente un embalaje sellado (no ilustrado en las figuras, dado que es de tipo conocido) en el que puedan alojarse el cuerpo de soporte 2 y/o el recipiente 7 y la tapa 5 de cierre, antes de su uso para recolectar una muestra. El cuerpo de soporte 2, el embalaje, el recipiente 7 y la tapa 5 pueden ser estériles. La invención se refiere adicionalmente a un proceso de realización de un dispositivo 1 de recolección y transferencia de muestras para biología molecular, del tipo descrito anteriormente. El proceso puede comprender, por ejemplo, las etapas siguientes, en sí mismas de tipo conocido y por lo tanto no descritas con mayor detalle: realizar el cuerpo de soporte 2, por ejemplo por extrusión de un material plástico; aplicar un pegamento adecuado a la primera porción 2a del cuerpo 2; aplicar las fibras 6 a la primera porción 2a, por medio de floculación en un campo electromagnético; secar el pegamento en un horno apropiado, de tipo convencional, con el fin de polimerizar el pegamento al menos parcialmente. En la presente invención, el proceso comprende adicionalmente la etapa de pretratamiento de la pluralidad de fibras 6 con un tensioactivo catiónico, del tipo descrito anteriormente. El proceso puede comprender adicionalmente una etapa de secado de las fibras, por ejemplo, en un horno, al menos tras la etapa de pretratamiento de las fibras. La etapa de pretratamiento de la pluralidad de fibras 6 con un tensioactivo catiónico puede llevarse a cabo tras la aplicación de las fibras sobre el cuerpo de soporte 2, por floculación, y puede hacerse sumergiendo directamente la porción de recolección en una solución que contenga el tensioactivo catiónico. Alternativamente, la etapa de pretratamiento de la pluralidad de fibras 6 con el agente tensioactivo catiónico anteriormente mencionado puede llevarse a cabo antes de la aplicación de las fibras 6 sobre el cuerpo, por floculación, tratando así las fibras 6 antes de la floculación de las mismas. En una alternativa adicional, el agente tensioactivo catiónico puede añadirse a las fibras 6 durante la producción de las fibras 6, añadiendo una cantidad predeterminada de tensioactivo catiónico a los materiales de tipo conocido con los que se fabriquen las fibras. El proceso puede comprender adicionalmente la etapa de predisposición de una solución acuosa que comprenda en la solución un porcentaje, un valor de concentración, o una cantidad del tensioactivo, preferentemente catiónico, de un 0,1 % a un 15 % o de un 0,2 % a un 10 % o de un 0,5 % a un 5 % o de un 0,8 % a un 1,5 % o de un 0,4 % a un 1,2 % en volumen o en peso. Por ejemplo, una concentración preferida es de entre 0,4 gramos de cloruro de benzalconio por cada 100 ml de solución y 1,2 gramos por cada 100 ml de solución. Puede aplicarse la misma concentración preferida a otros tensioactivos catiónicos. La etapa de predisposición de la solución puede comprender etapas de predisposición de una cantidad predeterminada de tensioactivo catiónico; de disolución de la cantidad predeterminada de tensioactivo catiónico en agua o en una solución acuosa, con el fin de obtener la solución, y/o la etapa de formación de una solución sustancialmente homogénea. La etapa de tratamiento de la pluralidad de fibras 6 con un tensioactivo catiónico puede llevarse a cabo por imbibición de las fibras en la solución. La imbibición de las fibras 6 en la solución puede llevarse a cabo tras la aplicación de las fibras sobre la porción de recolección del cuerpo, por floculación, o antes de la aplicación de las fibras sobre la porción de recolección del cuerpo por floculación. La invención se refiere adicionalmente a un método de recolección y transferencia de muestras para biología molecular, por medio de un dispositivo 1 del tipo descrito anteriormente. El método comprende al menos la etapa de recolección de una muestra para biología molecular en al menos una porción de recolección 3 flocada del dispositivo 1 de recolección, en el que la pluralidad de fibras 6 están previamente tratadas con un tensioactivo catiónico del tipo descrito anteriormente. El método puede usarse para recolectar y transferir muestras de ADN o ARN, y/o células que comprendan muestras de ADN o ARN. El método puede comprender también la etapa de conservación de la muestra sobre la porción de recolección 3, durante un periodo de tiempo predeterminado. El método puede comprender también la etapa de deshidratación o secado de al menos la porción de recolección 3, provista de la muestra recolección. La etapa de secado puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante secado en un horno de ventilación forzada, o mediante otro método de tipo conocido y que sea adecuado para el tratamiento de la muestra.

El método puede comprender adicionalmente etapas de inserción de la porción de recolección 3 en un recipiente de vacío (de tipo conocido y por lo tanto no ilustrado en las figuras), y de generación de un vacío sustancial en el recipiente de vacío. La etapa de generación de un vacío puede llevarse a cabo durante la etapa de secado, o en otro momento por separado de la etapa de secado. El método puede comprender adicionalmente una etapa de rehidratación de la muestra contenida en la porción de recolección 3, por ejemplo, con al menos una solución hidratante, con el fin de obtener una cantidad predeterminada de muestra rehidratada en la porción de recolección 3.

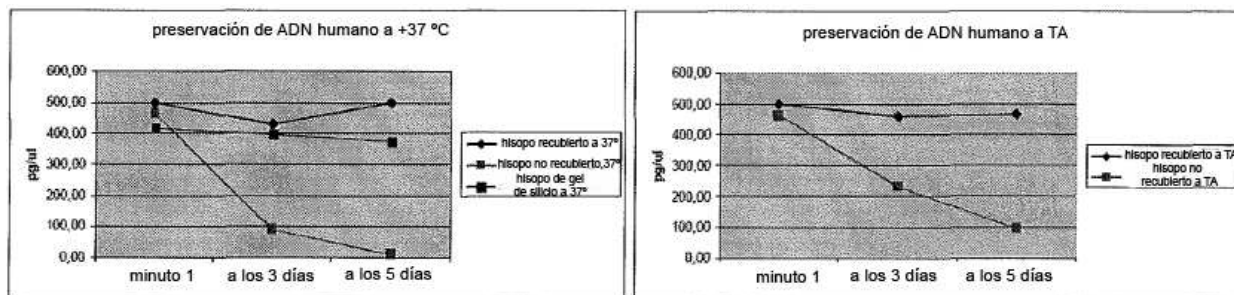
El proceso puede comprender adicionalmente etapas de inserción de la porción de recolección 3, que contiene la muestra, en un recipiente 7 tal como por ejemplo un tubo de ensayo, el cierre del recipiente 7 con una tapa 5 o cubierta de cierre, y la transferencia del recipiente 7 que comprende la porción de recolección 3, y/o la etapa de predisposición en el recipiente 7 de una cantidad predeterminada de una sustancia 8, destinada a licuar y/o a conservar la muestra, y/o una etapa en la que se bascule, sacuda o haga girar el recipiente 7 que comprende la porción de recolección 3 con la muestra, a una velocidad predeterminada destinada a licuar la muestra. El método puede comprender adicionalmente una etapa de liberación de la muestra para biología molecular, desde la porción de recolección, con el fin de permitir efectuar operaciones de biología molecular en la muestra. El método puede comprender, en particular, una etapa de liberación de al menos un 80 % de la cantidad de la muestra recolección para biología molecular, o de al menos un 85 %, o de al menos un 90 %, por dilución en un medio líquido o en un tampón de dilución con el fin de permitir efectuar operaciones adicionales sobre la muestra. La liberación puede facilitarse mediante operaciones de frotamiento convencionales. La invención se refiere adicionalmente al uso de un tensioactivo catiónico, del tipo indicado anteriormente, para pretratar las fibras 6 aplicadas, o a aplicar por floculación, sobre un cuerpo de soporte 2 de un dispositivo de recolección y transferencia de muestras para biología molecular. En lo sucesivo se describirán los resultados de los ensayos efectuados mediante el tratamiento de un hisopo flocado, que tiene fibras de nailon flocadas, tratado con una solución con una concentración de aproximadamente 1 gramo de cloruro de benzalconio por cada 100 ml de líquido. Para simular la recolección de ADN en la escena de un crimen, se utilizaron 100 µl de agua desmineralizada estéril para rehumedecer manchas de saliva (que se habían secado previamente sobre una superficie dura, para reproducir la recolección de ADN en la escena de un crimen), cada una de las cuales se recolectó con un hisopo individual. Se calcularon las concentraciones medias y los porcentajes del ADN recuperado. Se analizaron diferentes tipos de hisopos: hisopos de fibras de nailon flocados no recubiertos (sin tratar) e hisopos de fibras de nailon flocados recubiertos (tratados). Durante las pruebas, también se estudió la optimización de la preservación del ADN en el hisopo en condiciones ambientales críticas. En particular, el ensayo valoró la correcta conservación de la muestra en el hisopo una vez recolectada, por ejemplo, de la escena de un crimen, hasta su llegada al laboratorio forense. Se realizaron dos ensayos:

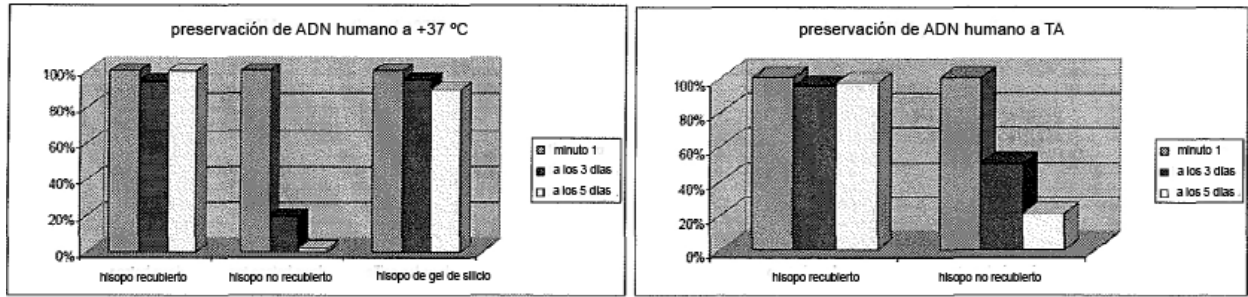
1) Con el fin de verificar la capacidad de los hisopos flocados recubiertos para mantener el ADN recolectado en la escena del crimen, se inculó saliva en los hisopos y se extrajo el ADN, y se cuantificó el PCR a tiempo real (porcentaje de recuperación) en el minuto 1 y tras 1 semana, a temperatura ambiente.

La siguiente tabla muestra el porcentaje de recuperación de ADN de los hisopos recubiertos, en diferentes momentos (en el minuto 1, después de 24 horas, después de 48 horas, y después de 1 semana):

| Hisopo recubierto: momento del ensayo | Concentración de ADN (ng/ul) | Porcentaje de recuperación de ADN (%) |
|---------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|
| minuto 1 | 1,70 (ng/ul) | 100 |
| a las 24 horas | 1,68 (ng/ul) | 99 |
| a las 48 horas | 1,69 (ng/ul) | 100 |
| después de 1 semana | 1,67 (ng/ul) | 98 |

2) Se efectuó otro ensayo para simular una recolección en la escena de un crimen en presencia de una gran cantidad de contaminantes ambientales, y para simular el transporte de un hisopo en condiciones críticas de temperatura (por ejemplo, en verano o en zonas muy calientes), en las que las temperaturas cambian y el crecimiento excesivo de contaminantes podría ser un problema real para la conservación del ADN humano en el hisopo, mediante la inoculación en cada hisopo de 100 µl de una mezcla de 0,5 McF de agentes contaminantes ambientales y saliva humana. Se extrajo el ADN de cada hisopo, y se cuantificó el PCR a tiempo real en el minuto 1, al cabo de 3 días a temperatura ambiente (TA) y a + 37 °C, al cabo de 5 días a temperatura ambiente y a + 37 °C. Los siguientes gráficos representan la tendencia de la preservación del ADN humano en los hisopos, a las 2 temperaturas diferentes de ensayo:





En lo referente al número de ciclos necesarios para el PCR a tiempo real los hisopos recubiertos requirieron, en las diferentes condiciones de ensayo, un número de ciclos que fueron desde un mínimo de aproximadamente 27,27 (en el minuto 1) hasta un máximo de aproximadamente 27,27 (después de 5 días a 37 °C), mientras que los hisopos no recubiertos requirieron un número de ciclos que fueron desde un mínimo de 27,38 (en el minuto 1) hasta un máximo de aproximadamente 33,33 (después de 5 días a 37 °C). El anterior ensayo demuestra que los hisopos recubiertos pueden conservar aproximadamente el 100 % del ADN recolectado incluso después de 5 días, no solo a temperatura ambiente (estado óptimo) sino también con una temperatura de incubación crítica (+ 37 °C), sin la necesidad de secar el hisopo usando dispositivos de gel de sílice, y pueden mejorar hasta 100 veces la sensibilidad del ensayo en comparación con un hisopo no recubierto. La presente invención proporciona una o más de las siguientes ventajas. En primer lugar, y siendo las más importante de todas, la invención permite un proceso y un dispositivo realizado de acuerdo con el proceso, y un método para utilizar el dispositivo, que obvian los problemas observados en la técnica anterior. La invención permite adicionalmente extraer del dispositivo de recolección una cantidad relevante de muestras (en relación con la cantidad recolectada) para biología molecular, tal como ADN o ARN, y, en particular, permite conservar las muestras con mayor cuidado y en mejores condiciones integrales con respecto a la técnica anterior; así, se permite cualquier posible uso posterior en laboratorio. La invención permite un aumento del porcentaje de ADN o ARN a utilizar en operaciones de biología molecular que impliquen la recolección y la transferencia, con respecto a la técnica anterior. Esto es posible gracias a la capacidad del tratamiento para conservar la integridad de las células humanas y para evitar la lisis de las mismas, manteniendo también consecuentemente la integridad de los ácidos nucleicos. Además de lo anterior, la presente invención también puede usarse ventajosamente para recolectar otras muestras biológicas o químicas a analizar. La invención permite adicionalmente recolectar, transferir, y preparar para su análisis y para operaciones adicionales, una gran cantidad de muestra biológica con respecto a los dispositivos conocidos. La invención permite disponer de cantidades de ADN o ARN y utilizarlas para llevar a cabo operaciones de biología molecular, siendo tales cantidades significativamente mayores con respecto a los dispositivos conocidos, pudiendo ser incluso hasta diez veces mayores. La invención permite adicionalmente reducir el número de ciclos requeridos para llevar a cabo reacciones de polimerización, o reacciones en cadena de la polimerasa, sobre muestras de ADN o ARN liberadas desde el dispositivo, ya que permite liberar desde el dispositivo de recolección una mayor cantidad de ADN o ARN disponible para estas operaciones. Finalmente, la invención puede realizarse de manera sencilla y económica.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir un hisopo flocado de recolección y de transferencia de muestras de ADN o ARN para biología molecular, comprendiendo el hisopo flocado como mínimo: un cuerpo de soporte (2), que tiene al menos una primera porción (2a) y una pluralidad de fibras (6) fijadas y dispuestas sobre la primera porción (2a) del cuerpo de soporte (2) por floculación, de modo que definan una porción flocada de recolección (3) destinada a recolectar una cantidad de la muestra para biología molecular sobre dicha porción de recolección (3), en donde las fibras (6) están dispuestas por floculación de manera ordenada y sustancialmente perpendicular al cuerpo de soporte (2); comprendiendo el proceso al menos una etapa de pretratamiento de la pluralidad de fibras (6) con un tensioactivo, y una etapa de secado de las fibras tras la etapa de pretratamiento de las fibras, realizándose la etapa de pretratamiento de la pluralidad de fibras (6) con un agente tensioactivo después de aplicar por floculación las fibras sobre el cuerpo de soporte (2) y/o antes de aplicar por floculación las fibras (6) sobre el cuerpo (2) y/o en donde el tensioactivo se añade a las fibras (6) durante la producción de las fibras (6).
2. El proceso según la reivindicación 1, en el que el tensioactivo es un tensioactivo catiónico y/o es un compuesto de amonio cuaternario y/o es una sal que tiene una parte positiva, constituida al menos por una cadena de átomos de carbono que termina con un grupo de amonio cuaternario y/o en el que el cuerpo de soporte (2) tiene una conformación alargada y/o una conformación sustancialmente similar a una barra.
3. El proceso según la reivindicación 1, en el que el tensioactivo es cloruro de benzalconio (BAC, o cloruro de alquildimetilbencilamonio, o ADBAC).
4. El proceso según la reivindicación 1, en el que el tensioactivo es una sal de amonio cuaternario o comprende una mezcla de sales de amonio cuaternario; o en el que es una mezcla de cloruros de alquibencildimetilamonio, en la que el grupo alquilo varía de octilo (C₈H₁₇-) a octadecilo (C₁₈H₃₇-).
5. El proceso según la reivindicación 1, en el que el tensioactivo se elige del grupo que comprende: cloruro de benzalconio, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB o bromuro de hexadeciltrimetilamonio), cloruro de bencetonio, cloruro de cetalconio, bromuro de laurtrimonio, bromuro de miristiltrimetilamonio, cetrimida, bromuro de cetrimonio, cloruro de cetilpiridinio y cloruro de estearalconio.
6. El proceso según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una etapa de predisposición de una solución acuosa que comprenda en la solución un porcentaje, un valor de concentración o una cantidad del tensioactivo de un 0,1 % a un 15 %, o de un 0,2 % a un 10 %, o de un 0,5 % a un 5 %, o de un 0,8 % a un 1,5 %, o de un 0,4 % a un 1,2 % en volumen o en peso, y en el que la etapa de tratamiento de la pluralidad de fibras (6) con un tensioactivo se lleva a cabo por imbibición de las fibras (6) en la solución, en donde la imbibición de las fibras (6) en la solución se lleva a cabo mediante floculación tras la aplicación de las fibras (6) sobre la primera porción (2a) del cuerpo (2).
7. El proceso según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una etapa de predisposición de una solución acuosa que comprenda en la solución un porcentaje, un valor de concentración o una cantidad del tensioactivo de un 0,1 % a un 15 % o de un 0,2 % a un 10 % o de un 0,5 % a un 5 % o de un 0,8 % a un 1,5 % o de un 0,4 % a un 1,2 % en volumen o en peso, y en el que la etapa de tratamiento de la pluralidad de fibras (6) con un tensioactivo se lleva a cabo por imbibición de las fibras (6) en la solución, en donde la imbibición de las fibras (6) en la solución se lleva a cabo mediante floculación antes de la aplicación de las fibras (6) sobre la primera porción (2a) del cuerpo (2).
8. Un hisopo flocado (1) de recolección y transferencia de muestras de ADN o ARN para biología molecular, que comprende al menos un cuerpo de soporte (2), que tiene al menos una primera porción (2a) y una pluralidad de fibras (6) fijadas y dispuestas sobre la primera porción (2a) del cuerpo de soporte (2) por floculación, de modo que definan una porción flocada de recolección (3) destinada a recolectar una cantidad de muestra para biología molecular sobre dicha porción de recolección (3), en donde las fibras (6) están dispuestas por floculación de manera ordenada y sustancialmente perpendicular al cuerpo de soporte (2); **caracterizado por que** la pluralidad de fibras (6) se tratan previamente con un tensioactivo y se secan tras la etapa de pretratamiento, durante las etapas del proceso de producción del hisopo flocado (1) de recolección y transferencia de muestras para biología molecular, en donde la porción flocada de recolección (3) comprende el tensioactivo sobre la pluralidad de fibras (6), de manera que se aumente la cantidad de ADN o ARN a liberar por el hisopo flocado de recolección y a utilizar en las operaciones de biología molecular.
9. El hisopo flocado (1) según la reivindicación 8, en el que el tensioactivo es catiónico y/o es cloruro de benzalconio (BAC) y/o en el que el tensioactivo es catiónico y es una sal que tiene una parte positiva, constituida al menos por una cadena de átomos de carbono que termina con un grupo de amonio cuaternario; y/o en el que el tensioactivo es una sal de amonio cuaternario, o en el que comprende una mezcla de sales de amonio cuaternario.
10. El hisopo flocado (1) según la reivindicación 8, en el que el tensioactivo es una mezcla de cloruros de alquibencildimetilamonio, en el que el grupo alquilo varía de octilo (C₈H₁₇-) a octadecilo (C₁₈H₃₇-); y/o en el que el tensioactivo catiónico es un compuesto de amonio cuaternario y/o se elige del grupo que comprende: cloruro de benzalconio, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB, o bromuro de hexadeciltrimetilamonio), cloruro de bencetonio,

cloruro de cetilalconio, bromuro de laurtrimonio, bromuro de miristiltrimetilamonio, cetrimida, bromuro de cetrimonio, cloruro de cetilpiridinio y cloruro de estearalconio.

- 5 11. El hisopo flocado (1) según la reivindicación 8, en el que la porción flocada de recolección (3) está configurada para recolectar una cantidad sustancialmente conocida de la muestra o para recolectar una cantidad comprendida entre 5 y 1000 microlitros o entre 10 microlitros y 500 microlitros o entre 50 y 200 microlitros o entre 80 y 120 microlitros de la muestra y/o para recolectar una cantidad de muestra de al menos 0,5 μl por mm^2 o de al menos 0,6 μl por mm^2 o de al menos 0,7 μl por mm^2 o de al menos 0,75 μl por mm^2 .
- 10 12. El hisopo flocado (1) según la reivindicación 8, en el que las fibras (6) están dispuestas sobre la primera porción (2a) del cuerpo de soporte (2) de manera sustancialmente ordenada y de manera que formen una capa sustancialmente continua sobre la porción de recolección (3) y/o las fibras (6) están dispuestas sobre la parte de recolección (3) de tal manera que definan una pluralidad de intersticios capilares (9) destinados a absorber la muestra por acción capilar y/o en el que las fibras (6) presentan un recuento de hilos comprendido entre 1,7 y 3,3 Dtex y/o una longitud comprendida entre 0,6 y 3 mm y/o en la que el cuerpo de soporte (2) tiene una conformación alargada y/o una conformación sustancialmente similar a una barra.
- 15 13. El hisopo flocado (1) según la reivindicación 8, en el que las fibras (6) están fabricadas con nailon o con un material seleccionado de: poliamida, rayón, poliéster, fibra de carbono, alginato, fibra natural o una mezcla de dichos materiales y/o en el que la porción de recolección (3) presenta una densidad superficial de las fibras (6) sobre la porción de recolección (3) comprendida entre 50 y 500 fibras por mm^2 o entre 100 y 200 fibras por mm^2 .
- 20 14. Un método para recolectar, conservar y transferir muestras de ADN o ARN para biología molecular, por medio de un hisopo flocado (1) de acuerdo con la reivindicación 8, comprendiendo el método al menos una etapa de recolección de una muestra para biología molecular sobre al menos una porción flocada de recolección (3) del hisopo flocado (1) de recolección que tiene un cuerpo de soporte (2), comprendiendo la porción flocada de recolección (3) una primera porción (2a) del cuerpo de soporte (2) y una pluralidad de fibras (6), fijadas y dispuestas sobre la primera porción (2a) del cuerpo de soporte (2) por floculación, siendo tratada previamente la pluralidad de fibras (6) con un tensioactivo o con un tensioactivo catiónico y comprendiendo adicionalmente el método una etapa de conservación de la muestra en la porción de recolección durante un periodo de tiempo.
- 25 30 35 15. El método según la reivindicación 14 para recolectar, conservar y transferir muestras de ADN o ARN y/o células que comprendan muestras de ADN o ARN y/o que comprende adicionalmente una etapa de liberación de la muestra para biología molecular desde la porción de recolección (3), con el fin de permitir llevar a cabo operaciones de biología molecular en la muestra.

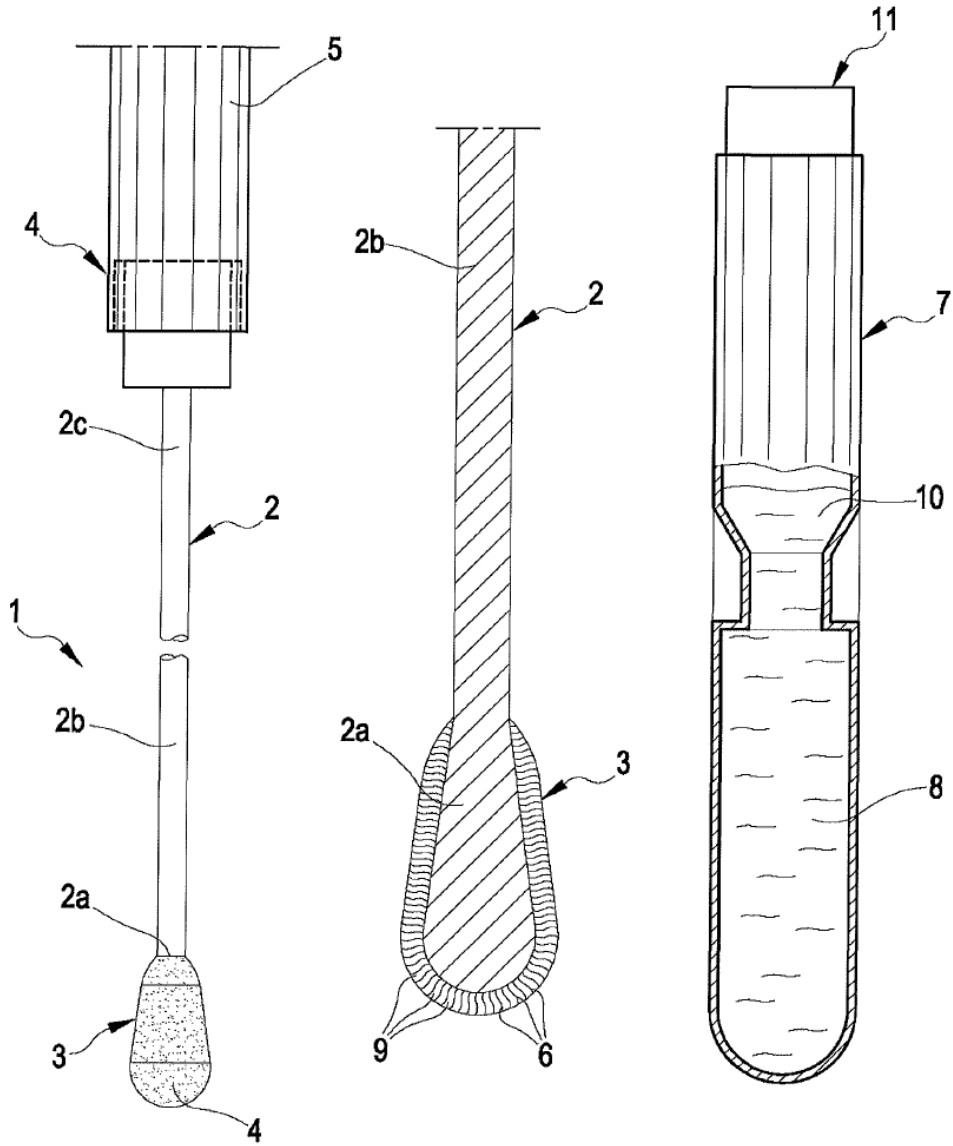


FIG.1

FIG.2

FIG.3